

ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS GRAXOS DE ÓLEO DE COCO UTILIZANDO LIPASE DE *Candida antarctica*

E. A. CARNEIRO¹, M. L. MARQUES², L. R. B. GONÇALVES²

¹Instituto Federal do Ceará

²Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: elizabetecarneiro@ifce.edu.br

RESUMO – Avaliou-se a influência dos parâmetros reacionais na esterificação dos ácidos graxos do óleo de coco com álcool etílico, visando à obtenção de biodiesel via rota enzimática utilizando lipase de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada covalentemente. Foi utilizado um suporte à base de quitosana previamente ativado com glicidol, etilenodiamina e glutaraldeído, sendo este comparado com o derivado comercial de CALB. Os seguintes parâmetros de síntese foram investigados: razão molar, temperatura e efeito da adição de zeólita. Foi avaliado o perfil de conversão ao longo do tempo de reação e a estabilidade operacional do derivado. Observou-se que quando a razão molar foi menor, maior a conversão obtida, 73,25 %. A temperatura em que o biocatalisador obteve maior conversão foi de 45 °C e na avaliação da estabilidade operacional o derivado manteve sua atividade por 10 ciclos de síntese.

1. INTRODUÇÃO

Na busca da remediação de uma série de problemas associados à produção de biodiesel, como formação de sabões no processo, elevado consumo de energia (devido à alta temperatura de reação) e produção de grande quantidade de efluentes, a utilização de enzimas como catalisadores é uma alternativa que vem sendo amplamente estudada. A síntese enzimática do biodiesel traz uma série de vantagens, o glicerol pode ser facilmente recuperado sem tratamento complexo, a temperatura de reação é mais baixa e, além disso, as enzimas podem ser facilmente recuperadas e reutilizadas (Kulkarni *et al.*, 2006).

As enzimas na forma solúvel são, normalmente, menos estáveis que os catalisadores químicos e não podem ser usadas em condições severas, pela possível desnaturação e consequente perda de atividade (Svendsen *et al.*, 1997). Desta forma, a imobilização em suportes inertes assegura o aumento da concentração de biocatalisador por volume de reator, o reuso das enzimas e minimiza o custo de separação dos produtos, desta forma superando o inconveniente econômico associado ao seu uso. A quitosana que é extraída de rejeitos da indústria pesqueira, principalmente das carapaças dos crustáceos, vem sendo bastante utilizada como suporte de baixo custo para a imobilização de enzimas (Krajewska, 2004).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de aplicação de um biocatalisador de baixo custo para a aplicação na reação de esterificação de matérias-primas com elevado teor de

ácidos graxos livres, visando à obtenção de biodiesel a partir dos ácidos graxos do óleo de coco por rota etílica. Foram avaliados diversos parâmetros na esterificação dos ácidos graxos: razão molar dos substratos, quantidade de enzima imobilizada, temperatura e efeito da retirada de água por adsorção. Após avaliação das melhores condições de síntese, foi realizada a cinética da reação e a avaliação da estabilidade operacional dos derivados obtidos através de ciclos sucessivos de esterificação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Lipase de *Candida antarctica* (CALB) na forma solúvel e imobilizada, Novozym 435 (Novozymes Latin America Ltd.-Brasil). Como suporte para imobilização foi utilizado quitosana (Polymar Ind Ltda.-Brasil) associada ao alginato de sódio, preparado na proporção quitosana 2,5 % - alginato 2,5 %, ativado com epícloridrina, segundo Adriano *et al.* (2008). Na reação de esterificação foram utilizados álcool etílico absoluto 99,5 % (v/v) da Synth (São Paulo) e o óleo de coco (*Cocos nucifera* L.) bruto foi fornecido pela FORT COCO Indústria e Comércio de Coco Ltda, Itaitinga (Ceará, Brasil). O óleo de coco utilizado foi previamente hidrolisado via ultrassom para a obtenção dos ácidos graxos, segundo metodologia proposta por Lima (2010), após a etapa de hidrólise. O índice de acidez do óleo e dos ácidos graxos obtidos foram $6,00 \pm 0,21$ mg KOH/g e $198,28 \pm 1,35$ mg KOH/g, respectivamente. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Métodos

Imobilização da enzima: A lipase foi colocada em contato com o suporte quitosana 2,5 % - alginato 2,5 %, ativado com epícloridrina (quitosana – CALB) através da solução de enzima (65 U por grama de suporte) em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10 na razão de 1/10 (m/v), rotação de 20 rpm, a 25 °C durante 5 h. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 µmol de butirato de para-nitrofenila (PNPB) por minuto (Kordel *et al.* 1991).

Índice de acidez e cálculo da conversão: A determinação da acidez do óleo de coco e de seus ácidos graxos foi efetuada usando o método AOCS 5a-40 que consiste na utilização de solução de NaOH para titulação do ácido graxo livre na amostra, segundo metodologia adotada por Moreto e Fett (1998). O índice de acidez foi quantificado de acordo com a Equação 1.

$$IA (mg KOH / g) = \frac{V \times f \times 56,11 \times M}{m} \quad (1)$$

em que: IA é o índice de acidez (mg KOH/g), V é o volume de solução de NaOH necessário para

titular a amostra (mL), f é o fator de correção da solução de NaOH, M é a molaridade da solução de NaOH ($M = \text{mol/L}$), m é a massa da amostra utilizada, 56,11 é o fator de correção com relação ao KOH.

A conversão foi calculada pelo acompanhamento da redução do índice de acidez de acordo com a Equação 2. Este cálculo foi possível, pois à medida que os ésteres vão sendo formados, a quantidade de ácidos graxos livres (AGL) diminui e, portanto, o índice de acidez decresce.

$$X(\%) = \left(\frac{IA_0 - IA_f}{IA_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

em que: X é a taxa de redução do índice de acidez na reação (%), IA_0 é o índice de acidez do ácido/óleo no início da reação e IA_f é o índice de acidez no final da reação.

Síntese dos ésteres etílicos: As reações foram realizadas em erlenmeyers de 50 mL fechados, a quantidade de biocatalisador foi de 1,0 % ($m_{\text{derivado}}/m_{\text{óleo}}$), com quantidade de enzima oferecida de 65 U/g. Os frascos foram mantidos sob agitação rotacional de 150 rpm e, inicialmente, à temperatura de 40 °C. As melhores condições obtidas para a síntese dos ésteres etílicos foram utilizadas para o estudo de estabilidade operacional dos biocatalisadores preparados.

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada, para os melhores parâmetro de síntese, através de ciclos sucessivos com duração de 24 horas da reação. Ao final de cada ciclo, o derivado foi removido do meio reacional e lavado com o solvente hexano para ser utilizado na síntese seguinte.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese de ésteres etílicos a partir dos ácidos graxos de óleo de coco

Efeito da razão molar: A Figura 1 mostra os resultados para a avaliação da influência da razão molar óleo:álcool, na conversão dos ésteres etílicos em função da quantidade de etanol presente no meio reacional. O aumento da razão molar acarreta uma diminuição na conversão obtida, sendo a conversão máxima obtida para razão molar 1:1, 73,25 % para o derivado obtido em laboratório, e 81,86 % para Novozym 435. Trubiano *et al.* (2007), na síntese de ésteres de ácidos graxos utilizando a lipase de *Candida antarctica*, verificaram o mesmo efeito para a razão molar. Provavelmente, o excesso de álcool provocou a inativação da enzima, pois esta pode sofrer inibição pelo álcool.

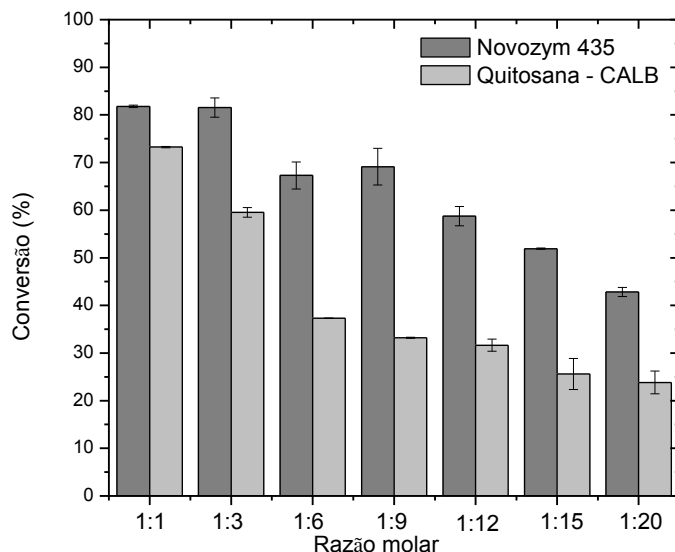


Figura 1 – Efeito da razão molar na conversão, quantidade de derivado 1,0 % (m/m), 150 rpm, temperatura de 40 °C, 8 horas de reação, Novozym 435 (■) e Qitosana - CALB (■).

Remoção da água: A adição de 20 % de zeólita ($m_{zeólita}/m_{óleo}$) no meio reacional para a reação de 8 horas e para um tempo de reação de 24 horas não resultou em aumento da conversão, como mostra a Figura 2.

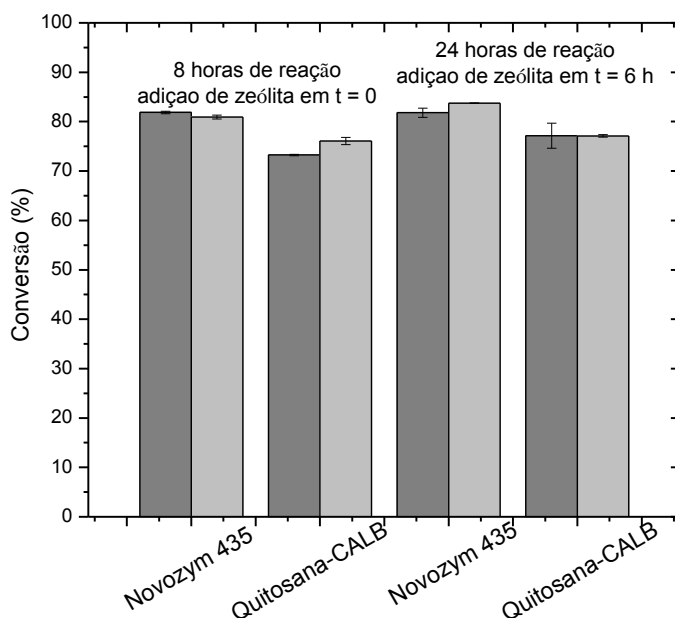


Figura 2 – Efeito da adição de zeólita na conversão, razão molar 1:1, quantidade de derivado 1,0 % (m/m), 150 rpm, temperatura de 40 °C, sem zeólita (■) e com zeólita (■).

Efeito da temperatura: Na Figura 3 são observados os resultados obtidos para o estudo do efeito da temperatura na conversão enzimática dos ésteres etílicos.

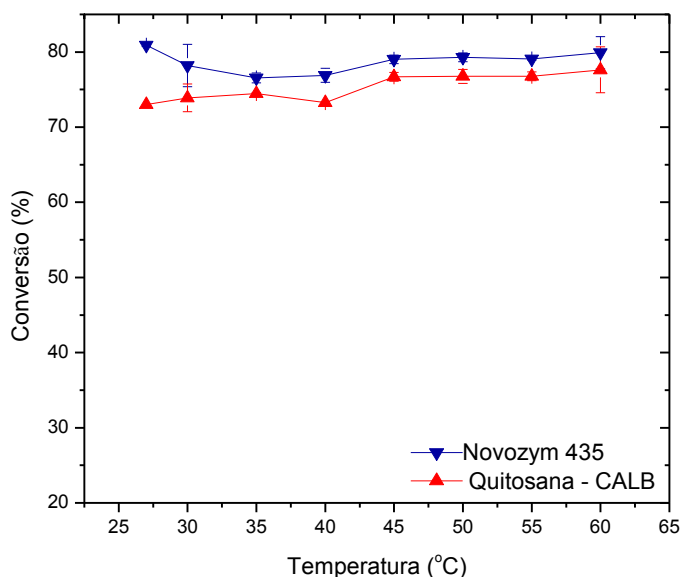


Figura 3 – Efeito da temperatura na conversão, razão molar 1:1, quantidade de derivado 1,0 % (m/m), 150 rpm, 8 horas de reação, Novozym 435 (■) e Quitosana - CALB (■).

Os resultados obtidos mostram que o derivado de CALB em quitosana apresentou um acréscimo na conversão em torno de 3 % a partir da temperatura de 45 °C com conversão em torno de 77 %, valores e perfis de conversão similares foram obtidos para o biocatalisador comercial Novozym 435, sendo para este os valores um pouco maiores (cerca de 2 %), cerca de 79 % de conversão. Os resultados obtidos mostram que a CALB mantém sua atividade catalítica em amplas faixas de temperaturas, na literatura há relatos de que se trata de uma enzima termoestável (Kirk e Christensen, 2002), e o derivado obtido em laboratório apresentou atividade e estabilidade compatíveis com o derivado comercial, nas condições avaliadas, demonstrando que o processo de imobilização conferiu uma maior proteção à molécula de proteína.

Perfil de conversão e estabilidade operacional: A Figura 4 mostra o perfil de conversão enzimática dos ésteres etílicos e a Figura 5 mostra o perfil da estabilidade operacional com relação à conversão, baseada em ciclos de síntese.

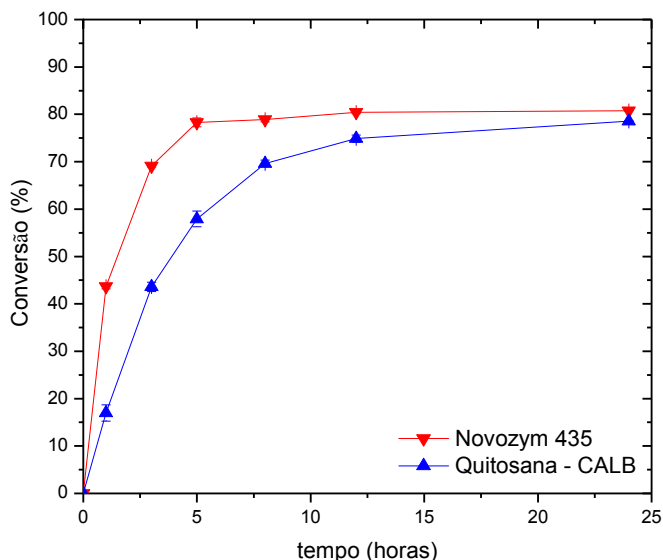


Figura 4 – Avaliação do perfil de conversão em função do tempo, razão molar 1:1, quantidade de derivado 1,0 % (m/m), 150 rpm, a 45 °C, Novozym 435 (■) e Quitosana - CALB (■).

A avaliação da conversão em função do tempo mostra que a conversão máxima para o derivado comercial, Novozym 435, é ligeiramente maior que a observada para o derivado de quitosana e os valores de conversão iniciais para o derivado obtido em laboratório foram menores, provavelmente devido à ocorrência de limitação difusional.

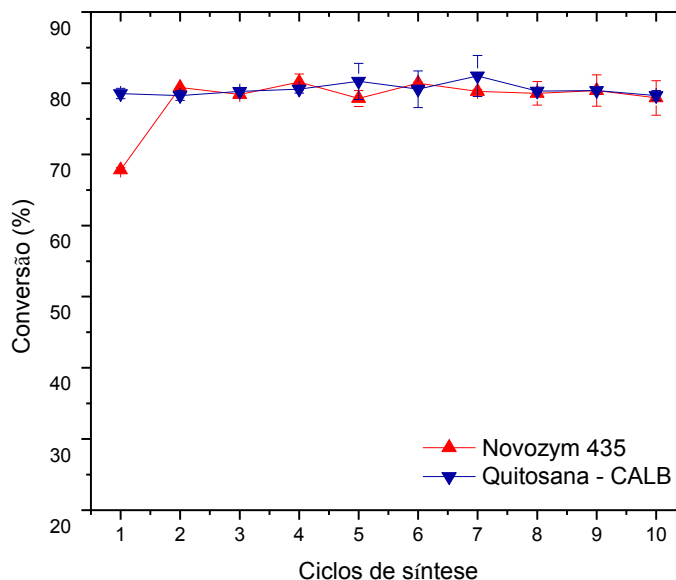


Figura 5 – Perfil da estabilidade operacional com relação à conversão, baseada em ciclos de síntese, razão molar 1:1, quantidade de derivado 1,0 % (m/m), 150 rpm, 24 horas de reação, a 45 °C, Novozym 435 (■) e Quitosana - CALB (■).

Na avaliação da estabilidade operacional o derivado de CALB obtido em laboratório e o comercial mantiveram sua atividade por 10 bateladas de síntese de ésteres de ácidos graxos.

4. CONCLUSÕES

Quanto menor a razão molar maior foi a conversão obtida, 73,25 % para o derivado de CALB obtido em laboratório. A adição de zeólita para os tempos de reação de 8 horas e 24 horas não resultou em aumento da conversão. A temperatura em que os biocatalisadores obtiveram maior conversão foram para temperaturas maiores que 45 °C. O derivado de CALB manteve sua atividade até o final de 10 ciclos.

Os resultados comprovam a viabilidade da catálise enzimática para produção de biodiesel a partir de substratos de elevada acidez livre, já que o alto custo da enzima é um fator que restringe a produção industrial de ésteres por essa rota alternativa. O derivado produzido através da imobilização covalente multipontual em quitosana obteve desempenho compatível com o derivado comercial disponível no mercado a um alto custo.

5. REFERÊNCIAS

- ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E.; GIORDANO, R. L. C. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. *Biomacromolecules*, v. 9, p. 2170-2179, 2008.
- KIRK, O.; CHRISTENSEN, M.W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin, *Org. Process Res. Dev.*, v. 6, p. 446-451, 2002.
- KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D.; SCHIMID, R. D. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp strain ATCC-21808 - purification, characterization, crystallization, and preliminary-X-ray diffraction data. *J. Bacteriol.*, v. 173, n. 15, p. 4836-4841, 1991.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 35, p. 126-139, 2004.
- KULKARNI, M.G., DALAI, A.K. Waste cooking oil – an economical source for biodiesel: a review, *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 45, p. 2901-2913, 2006.
- LIMA, L. P. *Produção de ácidos graxos assistida por ultrassom visando à produção de biodiesel*. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Depto. de Engenharia Química, UFC.
- MORETO, E.; FETT, R. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*, São Paulo: Editora Varela, 1ª ed., p. 114-133, 1998.
- SVENDSEN, A.; CLAUSEN, I.G.; PATKAR, S.A.; BORCH, K.; THELLERSEN, M.; Protein engineering of microbial lipases of industrial interest, *Method. Enzymol.*, v. 317, p. 284-340, 1997.
- TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase, *Enzyme Microb. Tech.*, v. 40, p. 716-722, 2007.