

ESTUDO DAS LIPASES *LIPOZYME RM IM*, *LIPOZYME TL IM* E *NOVOZYM 435* PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

C. M. T. SANTIN¹, D. de OLIVEIRA¹, J. V. de OLIVEIRA¹ e C. DALLA ROSA²

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

² Universidade Federal Fronteira Sul

E-mail para contato: claudiatrentin06@yahoo.com.br

RESUMO – Nos últimos anos, a pesquisa de vias alternativas para a clássica síntese alcalina de ésteres alquílicos demonstrou a capacidade das lipases para catalisar. Diante disto o objetivo deste trabalho foi à investigação e comparação do uso das lipases *Lipozyme RM IM* e *TL IM* e *Novozym 435* na produção de biodiesel em modo contínuo em reator empacotado e banho de ultrassom. Utilizou-se como substrato: óleo de soja, ácido graxo vegetal de soja e etanol. As reações de transesterificação para o óleo de soja foram realizadas a 57 °C, razão molar (óleo/etanol) 1:3, potência ultrassônica de 154W e vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 0,5 mL/min, já para as reações de esterificação com o ácido graxo vegetal utilizou-se a razão molar (carga ácida/ etanol) 1:6, vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 61,60W. Com base nos resultados obtidos comprovou-se que a *Novozym 435* é o melhor biocatalisador com conversões em ésteres etílicos de 97% para a reação de esterificação.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a pesquisa de vias alternativas para a clássica síntese alcalina ou ácida de ésteres alquílicos demonstrou a capacidade das lipases para catalisar a transesterificação de triacilgliceróis (TAN et al., 2010). A eficiência operacional e alta estabilidade de lipases na transesterificação tem sido amplamente relatado (DALLA ROSA et al., 2009; SU et al., 2009), o que demonstra a possibilidade de reciclar o enzima com a utilização de um solvente orgânico (BATISTELLA et al., 2012; YU et al., 2010) ou em sistemas sem solventes (OGNJANOVIC et al., 2009).

Na catálise enzimática, embora as taxas de conversão em ésteres alquílicos serem mais lentas em comparação com a catálise alcalina, tem recebido muita atenção, por ser uma tecnologia mais limpa, apresentar um potencial para a implementação industrial devido à simplicidade do processo de refino do produto e o uso de menor temperatura de reação. De fato, tal como mencionado por Nielsen et al., (2008), a principal vantagem de um processo enzimático de biodiesel é que os triglicéridos, bem como os ácidos graxos livres podem ser eficientemente transformado em biodiesel sob as mesmas condições amenas e o sub-produto, o glicerol, pode ser facilmente recuperados com alta qualidade, sem qualquer processo complexo. Apesar do alto custo de produção de enzimas continua a ser o maior obstáculo para a comercialização de processos catalisados por enzimas, progressos consideráveis, tais

como o uso de lipases imobilizadas comerciais e não comerciais tolerantes a solventes e novas tecnologias de imobilização, tornando possível a reutilização do catalisador, tem sido feito nos últimos anos para o desenvolvimento de sistemas de baixo custo usando catalisadores enzimáticos para a produção de biodiesel (NIELSEN et al., 2008).

Reações catalisadas por enzimas em sistemas sem solventes sob o poder de ultrassom, apesar de sua relevância científica e industrial, ainda pode ser considerado uma tecnologia nova, uma vez que apenas alguns estudos neste assunto podem ser encontrados na literatura. Kumar et al., (2011) avaliaram a transesterificação enzimática do óleo de pinhão manso com metanol em ultrassom utilizando uma lipase imobilizada de *Enterobacter aerogenes*. Os autores obtiveram a condição experimental ótima para a produção de biodiesel a partir da razão molar de 1:4 (óleo: metanol), concentração de enzima de 5 % em peso, tempo de reação de 30 min, e energia ultrassônica de 100 W/m³, com conversão de 84,5 ± 0,5 %. Note-se que os autores utilizaram metanol como substrato e nenhum trabalho foi encontrado neste assunto usando etanol como substrato em sistema livre de solvente. Batistella et al., (2012) relataram a transesterificação do óleo de soja com o etanol, utilizando dois lipases imobilizadas comerciais sob a influência de irradiação de ultrassom e de solvente orgânico. Os resultados mostraram que os altos rendimentos de reação (~ 90 % em peso) foram obtidos com irradiação (~ 100 W), e temperatura (60 °C) em um tempo de reação relativamente curto, de 4 h, usando *Lipozyme IM RM* como catalisador. No trabalho referenciado, 40 mL de n - hexano foi utilizado como solvente para cada grama de óleo usado como substrato (BATISTELLA et al., 2012).

Com base nos aspectos acima indicado, este trabalho tem como objetivo à investigação e comparação do uso das lipases *Lipozyme RM IM* e *TL IM* e *Novozym 435* na produção de biodiesel em modo contínuo em reator empacotado e banho de ultrassom.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Nas reações de transesterificação utilizou-se como substratos o óleo de soja comercial (Marca Soya) e ácido graxo vegetal de soja (lote: PA 1060.525 A12) produzido por SGS Agricultura e Indústria Ltda, em Ponta Grossa – PR, ambos sem nenhum tratamento prévio, álcool etílico (Merck, 99,9 % de pureza) e a enzima comercial *Novozym 435*, com atividade inicial de 47,9 U/g, produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macro porosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/ Araucária-PR, *Lipozyme RM IM*, produzida por fermentação submersa de *Rhizomucor miehei* e imobilizada em resina de troca iônica e a *Lipozyme TL IM*, produzida por fermentação submersa fermentação a partir de *Thermomyces lanuginosus*, imobilizada em resina.

Na quantificação dos produtos da reação foram usados padrões comerciais dos ésteres majoritários do biodiesel de soja e o padrão interno heptadecanoato de metila, com procedência Sigma-Aldrich, como solvente n-heptano (Sigma-Aldrich, 99,9% de pureza) e os gases de arraste, nitrogênio, hidrogênio e ar sintético (White Martins).

Para a determinação da atividade enzimática os seguintes reagentes/ solventes foram utilizados: acetona PA ACS (Vetec, 99,5%), álcool etílico (Merck, 99,9 % de pureza) e hexano (Nuclear, P.A). Ácido láurico (Vetec, 98% CG) e álcool n-propílico normal (Nuclear, P.A 99,5%) foram utilizados como substratos para dosagem da atividade de esterificação das lipases.

2.2 Aparato e procedimento experimental

Os experimentos para produção enzimática de biodiesel foram realizados num reator de polietileno de alta densidade com 1/16 in de diâmetro externo, espessura de 1,1 mm, diâmetro interno de 4,15mm, comprimento de 2 metros e volume de 27,05mL com alimentação da mistura reacional de óleo de soja/ ácido graxo e álcool etílico (substrato), com uso de aproximadamente 11 g de catalisador, sendo este as enzimas *Novozym 435*, *Lipozym RM IM* e *Lipozym TL IM*, um banho de ultrassom (Unique ultraSonic cleaner, modelo: USC-180A, frequência US: 40KHz, potência US: 154W).

O procedimento experimental consistiu no empacotamento do reator com a enzima sob a ação de um agitador magnético, a fim de realizar um empacotamento mais eficiente, conforme Dalla Rosa et al., (2009). Após acoplou-se o reator ao sistema reacional e imergiu-o no banho de ultrassom já a condicionado na temperatura e potência ser realizado o experimento, iniciou-se o bombeamento contínuo dos substratos óleo de soja/ ácido graxo e álcool etílico, previamente homogeneizados sob a mesma agitação durante a reação por um agitador mecânico (Marca Fisatom, Modelo 712) inserido no frasco contendo a mistura reacional, a uma dada razão molar (óleo:álcool) e vazão volumétrica de alimentação do substrato, até o completo preenchimento do sistema reacional, usando uma bomba de alta pressão para líquidos (HPLC) Digital Série III (Marca Acuflo). A bomba é utilizada para deslocar a mistura reacional para a zona de reação e manter a pressão do sistema.

O cálculo do volume do reator foi realizado através de seu diâmetro interno e comprimento utilizado. A porosidade do leito foi determinada de acordo com Dalla Rosa et al., (2009) adicionando o cômputo da porosidade interna da enzima. Neste caso, a porosidade do leito deve considerar o volume do soluto (enzimas) que ocupa o leito do reator e o volume de poros da enzima, como mostra a seguinte equação:

$$\epsilon_L = 1 - \left(\frac{V_S - V_P}{V_R} \right) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: V_S é o volume ocupado pelas enzimas no leito do reator; V_R é o volume do leito do reator; V_P é o volume de poros das enzimas que ocupam o leito do reator.

Conforme Dalla Rosa et al., (2009) para o cálculo do volume de soluto (V_S) obteve-se as seguintes informações: número de unidades de enzima em determinada massa (realizado manualmente) e diâmetro médio das partículas da enzima (calculado pela média da observação do resultado de análise de MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura).

O volume de poros (V_P) foi então multiplicado pela massa da amostra de enzima empacotada no

leito do reator. Neste caso, foi adotado como valor de volume de poros: V_{PI} = dado pela ficha técnica do fabricante da enzima (0,5 mL/g). O tempo de residência é dado pela porosidade do leito multiplicado pelo seu volume e dividido pela vazão de alimentação de substratos a serem utilizados no processo (DALLA ROSA et al., 2009).

$$\tau = \frac{\varepsilon_L \times V_R}{q} \quad (\text{Equação 2})$$

Quantificação dos ésteres etílicos: Para a quantificação de ésteres de ácidos graxos foi utilizado um cromatógrafo gasoso (GC) (Shimadzu 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar Rtx-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) nas condições cromatográficas descritas pela norma EN 14103 (2003), do Comitê Europeu para Padronizações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de biodiesel por transesterificação utilizando óleo de soja e as enzimas *Novozym 435*, *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme TL IM*

De acordo com Hsieh et al., (2006) a razão molar dos substratos normalmente é um dos parâmetros mais importantes nas reações de esterificação enzimática. Desde que a reação é reversível, um aumento na concentração de um substrato pode deslocar o equilíbrio químico, resultando em maiores conversões. Por outro lado, altas concentrações podem reduzir a taxa de reação devido ao efeito de inibição. A razão molar óleo/etanol é uma das variáveis mais importantes que afeta o rendimento da reação. A relação estequiométrica de transesterificação requer três moles de álcool e um mol de triglicerídeos para produzir os três moles de ésteres etílicos e um mol de glicerol. No entanto, a transesterificação é uma reação de equilíbrio em que uma alta proporção molar é usada para deslocar a reação para a direita, no sentido de obtenção dos produtos. Ao usar o sistema de ultrassom, a quantidade de álcool requerida pode ser reduzida (YU et al., 2010).

A influência da razão molar (1:3 e 1:13), e a potência ultrassônica (61,60 e 154 W) foram avaliadas por meio da reação de transesterificação utilizando como catalizador a lipase *Novozym 435*, manteve-se fixa a temperatura em 65 °C e a vazão de alimentação de substrato em 0,5 mL/min. A Figura 1 apresenta os resultados obtidos em relação a conversão em biodiesel.

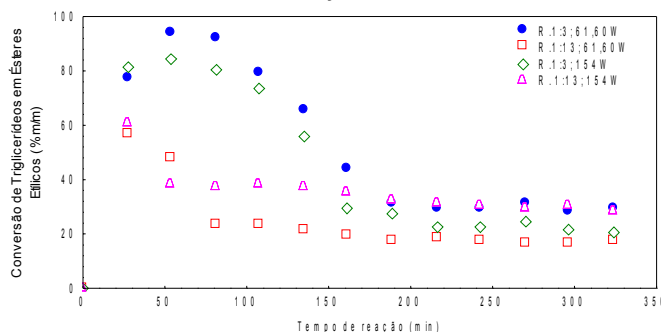


Figura 1 - Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos. Temperatura de 65 °C e vazão de

alimentação de substrato (óleo/etanol) de 0,5 mL/min.

Verifica-se, através da Figura 1, que após o segundo tempo de reação, a conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos diminuiu, de aproximadamente 97% em 54 minutos para 92% em 81 minutos e 80% em 108 minutos; provavelmente em função da formação e acúmulo de glicerol na superfície do catalisador, com isso o sítio ativo da enzima acaba ficando indisponível para o substrato. O excesso de substrato reduziu a taxa de reação devido ao efeito de inibição e a potência ultrassônica exerce pouca influência sobre a conversão em ésteres.

Com base nos resultados obtidos e em trabalhos anteriores, estudou-se a utilização das enzimas *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme TL IM*, para a produção de biodiesel utilizando a razão molar (óleo de soja: etanol) 1:3.

A Figura 2 demonstra o comportamento em termos de conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos para as enzimas *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme TL IM*.

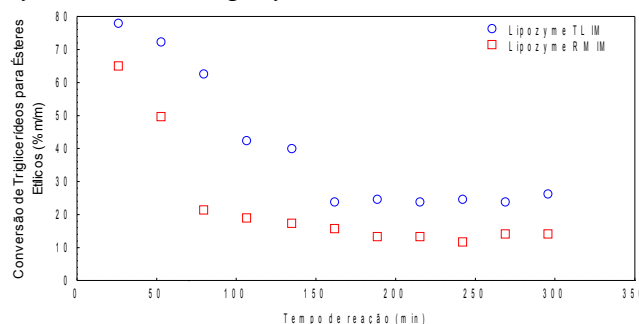


Figura 2 - Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos em modo contínuo em banho de ultrassom utilizando as enzimas *Lipozyme TL IM* e *RM IM*. Temperatura de 57 °C, razão molar (óleo/etanol) 1:3, potência ultrassônica de 154 W e vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 0,5 mL/min.

Conforme a Figura 2 verifica-se que a enzima *Lipozyme TL IM* apresentou um maior potencial para a transesterificação do óleo de soja que a *Lipozyme RM IM*, apresentando conversões de 77,30; 71,75 e 62,57% em ésteres etílicos. A *Lipozyme RM IM* apresentou conversões de 64,92; 48,97 e 21,70% em ésteres etílicos para os tempos de reação de 27, 54 e 81 minutos. Sua atividade enzimática inicial foi de 11,52 U/g e 43,84 U/g e sua atividade ao final da reação foi de 5,57 U/g e 2 U/g, para as enzimas *Lipozyme TL IM* e *RM IM*. Porém, a *Novozym 435* ainda apresenta melhores resultados em termos de conversão em ésteres etílicos.

O método para a síntese enzimática de biodiesel devido ao elevado custo do catalisador e da taxa de reação ser muito lenta não têm sido capaz de encontrar aplicação comercial. Tem sido relatado que o uso de ultrassom de baixa frequência pode ser eficaz para as operações biológicas, tais como ruptura das células microbianas, desinfecção microbiana e biológica de águas residuais (GOLE; GOGATE, 2012). Na verdade, há poucos relatos indicando a aplicação de ultrassom para a intensificação da síntese de biodiesel com base na via enzimática. O estudo comparativo de Yu et al. (2010), com a lipase *Novozym 435* mostra a produção de biodiesel utilizando a abordagem convencional e na presença de irradiação ultrassônica (banho de potência nominal de 400 W, 40 kHz),

indicou que o rendimento máximo obtido utilizando a abordagem convencional (vibrador a 200 rpm) foi de 62%, enquanto que o rendimento obtido por ultrassom aumentou para 93% sobre os tempos de reação semelhantes (12 h de operação), ele também observou que a taxa de reação é reforçada quando uma combinação de vibrações de baixa velocidade (50 rpm) e baixa frequência ultrassônica (20 kHz), utilizado o tempo de reação de apenas 4 h o rendimento é melhorado para 96%, a intensificação tem sido atribuída aos efeitos físicos do ultrassom, tais como aumento da turbulência, área interfacial resulta na eliminação da barreira de transferência de massa no meio reacional.

3.2 Produção de biodiesel por esterificação de ácido graxo utilizando como catalizador as lipases *Lipozyme RM IM* e *Novozym 435*

Tendo em vista esta estabilidade do processo de produção de biodiesel, procurou-se avaliar a conversão em ésteres com uma vazão de alimentação de 2,5 mL/min e uma razão molar (carga ácida/etanol) de 1:6, conforme apresentado na Figura 3.

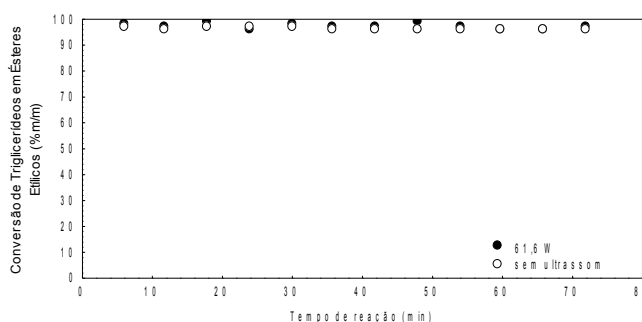


Figura 3 - Produção de biodiesel via reação de esterificação enzimática em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:6, vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 65 °C, sem potência ultrassônica e com potência ultrassônica de 61,6 W.

De acordo com a Figura 3, é possível constatar que a potência ultrassônica não exerce nenhuma influência em relação à conversão de ésteres, e com o aumento da razão molar e da vazão de alimentação observa-se uma melhor conversão em ésteres etílicos, sendo esta de 97,86% em 6 minutos de reação e de 96,97% em 72 minutos. Já a atividade enzimática ao final da reação foi de 47,25 U/g, não ocorrendo alteração na mesma, para ambas as potências.

Ao comprovar a eficácia do processo de produção de biodiesel por meio de reação de esterificação em modo contínuo utilizando reator com leito empacotado e banho de ultrassom, testou-as enzima comercial *Lipozyme RM IM* na tentativa de reduzir o custo da produção de biodiesel. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.

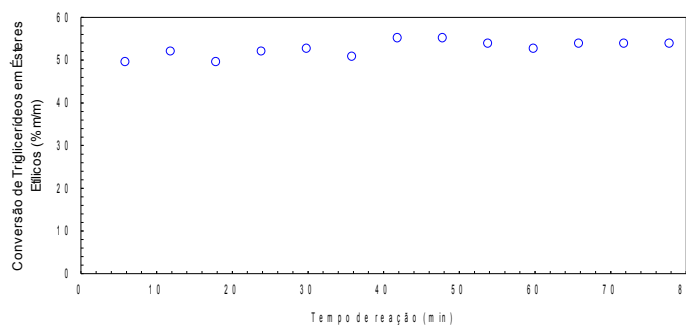


Figura 4 - Conversão de ésteres etílicos com uso da enzima *Lipozyme RM IM* como catalisador através da esterificação em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:6, vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 61,60 W.

Apesar da estabilidade da reação, demonstrada na Figura 4, a diferença na conversão em ésteres é muito grande como pode ser observado fazendo um comparativo com a Figura 3. Para a enzima *Novozym 435*, (Figura 3), obteve-se 97,86, 97,53 e 96,31% em ésteres para 6, 30 e 60 minutos, já para as mesmas condições e a enzima *Lipozyme RM IM*, (Figura 4), obteve-se 49,57, 52,60 e 52,53% de conversão em ésteres etílicos para os mesmos tempos de reação.

Em comparação com os métodos de síntese química, a produção de biodiesel catalisada por enzimas (lipases) oferece muitas vantagens, tais como uma elevada seletividade, menor consumo de energia, menos produtos secundários e resíduos, evitando formação de sabão e fácil recuperação de glicerol e de catalisadores. No entanto, o custo da lipase é o maior obstáculo para a utilização de lipases em produção de biodiesel industrial (VELJKOVIĆ et al., 2012).

Vários métodos diferentes de desenvolvimento de biodiesel, reduzindo os custos de produção de biodiesel estão sendo atualmente investigados, tal como a otimização dos fatores de processo, utilizando métodos estatísticos, o desenvolvimento de modelos de processos cinéticos, o ultrassom aplicado à reação de transesterificação, a utilização do processo contínuo e a concepção de novos tipos de reatores ultrassônicos. Uma combinação entre o ultrassom e reatores de fluxo contínuo é um caminho promissor. Espera-se que o futuro dos reatores ultrassônicos encontre-se no desenho de reatores com múltiplas frequências e transdutores baseados em funcionamento de forma contínua. Por certo, mais estudos sobre a ligação do reator com as características dinâmica de bolhas, a cavitação, a reologia da mistura de reação em diferentes aplicações de escala são necessários (VELJKOVIĆ et al., 2012).

4. CONCLUSÃO

Ao final deste trabalho conclui-se que a *Novozym 435* ainda é a melhor enzima para a produção de biodiesel quando comparada com a *Lipozyme TL IM* e *RM IM*. Para o óleo de soja o aumento da razão molar não proporcionou aumento nas conversões, já para o ácido graxo vegetal o aumento da razão molar (em relação a estequiometria reacional de 1:3 para 1:6) e a utilização do biocatalizador *Novozym 435* proporcionou conversões de 97,86% em ésteres etílicos em um tempo de apenas 6

minutos, esta conversão foi mantida durante o estudo realizado de 1 hora, tanto para a reação com 0 W e 61,60 W de potência ultrassônica comprovando assim que a potencia não interfere nas reações de esterificação, demonstrado uma alternativa promissora para a produção de biodiesel.

5. REFERÊNCIAS

- BATISTELLA L.; LERIN L.A.; BRUGNEROTTO P.; DANIELLI A.S.; TRENTIN C.M.; POPIOLSKI A.; TREICHEL H.; OLIVEIRA J.V.; OLIVEIRA D. Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system. *Ultrason Sonochem.*, v. 19, p. 452, 2012.
- DALLA ROSA, C.; MORANDIM, M.B.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V. Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids. *Bioresour. Technol.*, v. 100, p. 5818–5826, 2009.
- GOLE V.L.L.; GOGATE P.R. A review on intensification of synthesis of biodiesel from sustainable feed stock using sonochemical reactors, *Chem. Eng. Process: Process Intensification*, v. 53, p.1, 2012.
- HSIEH, H. J.; NAIR, G.R.; WU, W. T. Production of ascorbyl palmitate by surfactant-coated lipase in organic media. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 5777-5781, 2006.
- KUMAR G.; KUMAR D.; POONAM, JOHARI R.; SINGH C.P. Enzymatic transesterification of Jatropha curcas oil assisted by ultrasonication, *Ultrason. Sonochem.*, v.18, p. 923, 2011.
- MEDINA A.R.; MORENO P.A.G.; CERDÁN L.E.; GRIMA E.M. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol. Adv.*, v. 27, p. 398, 2009.
- NIELSEN, P.M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, v. 110, p. 692-700, 2008.
- OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JUGOVIC, Z. K., Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. *Bioresour. Technol.* v.100, p. 5146-5154, 2009.
- SU, E.; YOU, P.; WEI, D. In situ lipase-catalyzed reactive extraction of oilseeds with short-chained dialkyl carbonates for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 100 (23), p. 5813–5817, 2009.
- STANDARD UNE-EN 14103. Fat and oil oil derivatives: Fatty Acid Methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. *Asociación Española de Normalización y Certificación*, Madrid, 2003.
- TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnol. Adv.*, 28, 628-634, 2010.
- YU, D.; TIAN, L.; WU, H.; WANG, S.; WANG, Y.; MA, D.; FANG, X. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by *Novozym 435*. *Process Biochem.*, v. 45, p. 519–525, 2010.