

ESTUDO PRÉVIO PARA TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS EM MEIO ORGÂNICO

N. L. D. NYARI¹, A. R. PAULAZZI¹, A. M. M. FICANHA¹, A. ANTUNES¹, R. V. ZAMADEI¹, M. H. BOPSIN¹, J. ZENI¹; R. M. DALLAGO¹

¹ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões - URI- Erechim - RS,
Departamento de Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: nadialigianara@hotmail.com

RESUMO – Nos últimos anos as enzimas vêm sendo empregadas com sucesso em processos biocatalíticos, principalmente como catalisadores de síntese orgânica, sendo assim a produção enzimática de biodiesel por etanólise de óleo de soja e etanol foi estudada utilizando lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em Poliuretano (PU) como catalisador sem a adição de solvente. O efeito da temperatura (30 a 70 °C), concentração de enzima (0,1 a 0,5 g) e agitação ultrassônica (10 a 90 W) foi determinada em 60 min de reação. Em condições ótimas de reação, apresentou atividade enzimática de esterificação de 1492,184 U/g com rendimento de 2659,98 % sob uma temperatura de 70 °C, concentração de catalisador de 0,5 g e 90 W de potência.

1. INTRODUÇÃO

O uso de fontes de energia renováveis tem sido apontada como uma necessidade urgente para reduzir o efeito estufa e oferecer uma alternativa rápida e sustentável para a demanda energia que vem crescendo na sociedade moderna (Ramos et al., 2011). Atualmente as lipases cada vez mais vem sendo reconhecida como catalisadores eficientes no sentido de biotransformação de óleos e gorduras em sistemas aquosos e não aquosos, sendo tolerante à presença de óleos. Sendo assim permitem a redução de custos e investimentos com matéria-prima processada. Além de poder reduzir as etapas de processamento e de purificação de biodiesel e sub / co-produtos gerados, resultando num processo sem impacto ambiental (Gog et al., 2012).

De acordo com Adachi et al. (2013), a lipase de *Candida antarctica* B (CALB) é uma enzima muito versátil e apropriada para a produção de biodiesel. Até à data, várias pesquisas sobre a produção de biodiesel através de transesterificação de óleos foram realizados utilizando enzimas livres ou imobilizadas numa variedade de meios de solvente (solventes orgânicos, ou comprimido e fluidos supercríticos, iônico líquidos, etc.) (Du et al., 2004).

Na tentativa de ultrapassar inconvenientes associados a utilização de solventes orgânicos como meio de reação, a irradiação de ultra-sons tem sido identificado recentemente como uma nova tecnologia, principalmente quando esta associada a sistemas reacionais altamente viscosos e imiscíveis (Ji et al., 2006). O produto químico e resultante dos efeitos físicos do ultrassom, proporciona um efeito muito eficiente de agitação e aumentar as taxas de

reação (Yachmenev et al, 2004; Li et al, 2005). Neste contexto, este trabalho tem como objetivo investigar o uso da lipase de *Candida antarctica* B imobilizada em *situ* em poliuretano para produção de ésteres etílicos de ácidos graxos (biodiesel) sob irradiação ultrassônica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A enzima utilizada nesta pesquisa foi a lipase de *Candida antarctica* B (Novozyme) e os monômeros comerciais Polioli e Isocianato (Empresa Flexível Poliuretanos – Mannes). Os solventes foram acetona (FMaia), ácido Oléico (Vetec), álcool Etílico (Merck), óleo de soja comercial (Marca Soja), hexano (Nuclear, P.A) e Hidróxido de Sódio (Nuclear).

2.1 Imobilização

O procedimento de imobilização da enzima CAL B imobilizada em *situ* em espuma rígida de poliuretano (PU) foi realizada na concentração pré-estabelecida (60/40 %) descrita por Nyari (2013) onde são adicionadas 10 % da enzima diluída ao monômero (Polioli), homogeneizado e em seguida adicionado o isocianato, após 5 min (etapa de polimerização) o derivado imobilizado foi mantido por 24 horas em dessecador e posterior medida da atividade por esterificação e seu rendimento.

2.3 Otimização da produção de ésteres etílicos de ácidos graxos

Primeiramente os ensaios para produção enzimática de biodiesel foram realizados em um banho de maria segundo metodologia de Santin et al., (2013), onde realizou-se um estudo cinético prévio para determinar o melhor tempo de reação. Os experimentos foram realizados em um balão de 50 mL, onde foi colocado 0,25 % (0,25 g) (m/m) da lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em situ de suporte rígido de poliuretano (PU) (em relação à massa de substratos (óleo + etanol)) na razão molar óleo/etanol de (1:3), temperatura de 50 °C e 45 Watts de potencia ultrassônica. Esta condição foi avaliada tendo em vista resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa, a partir de óleo de soja e etanol pra a produção de biodiesel em sistema orgânico (n-hexano). Os Experimentos foram realizados nos tempos (15 a 360 minutos) de reação, na qual foi determinado pelo método de titulométrico de esterificação. Depois de fixado o tempo de reação, realizou-se um planejamento fatorial 2³, com 12 ensaios, sendo realizado triplicata no ponto central. As variáveis estudadas foram a temperatura (30 a 70 °C), concentração da enzima (0,1 a 0,5 %) (0,1g a 0,5 g) e potencia ultrassônica (0 a 100 W), sendo fixando a razão molar (óleo/etanol) em (1:3 m/v) (m/m em relação aos substratos).

Para o estudo da estabilidade operacional do catalisador imobilizado, o mesmo foi separado do meio reacional pelo método de filtração utilizando papel filtro, em seguida realizaram-se duas lavagens com 10 mL de hexano e filtrou-se a vácuo. Após cada procedimento a amostra foi submetida à rotavapor e seco em estufa a 40 °C durante 60 min e submetido a uma nova etapa de reação e medida de atividade (Santin et al., 2013).

2.4 Determinações analíticas

A Atividade Enzimática de Esterificação e Rendimento foi calculada utilizando como padrão da síntese de ésteres, onde as alíquotas de 500 μL foram retiradas do meio reacional (em triplicata) e adicionadas a alíquotas de 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) e posteriormente titulada com NaOH 0,05 M. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio (Ferraz et al., 2014). O rendimento considera a atividade total da enzima livre em solução (a qual considera o volume de extrato enzimático empregado no ensaio de imobilização) e a atividade total do imobilizado (o qual considera a massa total de imobilizado produzido) (Brígida et al., 2010). A medida de atividade da enzima foi realizada no início, antes de ser utilizada pela primeira vez, e ao final das reações com a enzima recuperada.

Os resultados foram analisados usando o software Statistica® 7.0 Statsoft Inc. e, através da análise de superfície de resposta, determinaram-se os valores ótimos destas variáveis para máxima produção de biodiesel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o objetivo investigar o uso da lipase de *Candida antarctica* B imobilizada em *situ* em poliuretano para produção de ésteres etílicos de ácidos graxos (biodiesel) sob irradiação ultrassônica, apresentou resultados significativos a partir de 30 min de reação até 120 min. Desta forma, a otimização foi realizada num tempo de 60 min, com uma razão molar do ácido/álcool (1:3 (m/v) óleo de soja + etanol), temperatura de 70 °C, concentração de catalisador imobilizada de (0,5 g) e potencia ultrassônica de (90 W), apresentando atividade enzimática de esterificação de 1492,184 U/g e rendimento de 2659,98 % (Tabela 1).

Tabela 1 - Matriz do planejamento de experimentos 2^2 com a resposta em termos de atividade enzimática de esterificação (U/g) e rendimentos da reação (%) em ésteres etílicos (% m/m) a partir da alcoólise enzimática do óleo de soja em sistema livre de solvente.

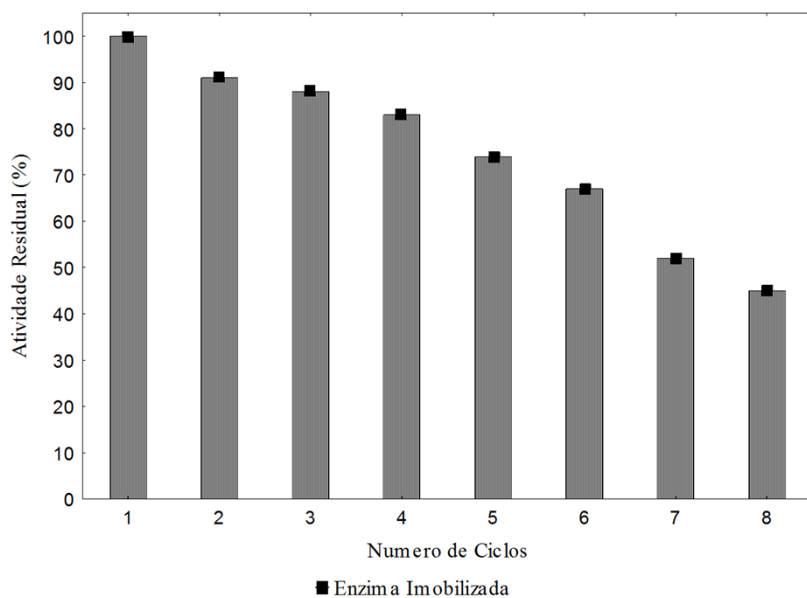
Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração de Enzima (wt%)	Potência (W)	Atv. de Esterificação (U/g)	Rendimento (%)
1	-1 (30)	-1 (0,1)	-1 (10)	226,452	249,10
2	1 (70)	-1 (0,1)	-1 (10)	691,333	1232,37
3	-1 (30)	-1 (0,1)	1 (90)	267,072	476,08
4	1 (70)	-1 (0,1)	1 (90)	675,671	1204,46
5	-1 (30)	1 (0,5)	-1 (10)	766,049	1365,56
6	1 (70)	1 (0,5)	-1 (10)	1084,647	1933,50
7	-1 (30)	1 (0,5)	1 (90)	767,644	1368,41
8	1 (70)	1 (0,5)	1 (90)	1492,184	2659,98
9	0 (50)	0 (0,25)	0 (45)	726,726	1295,47
10	0 (50)	0 (0,25)	0 (45)	711,679	1268,64
11	0 (50)	0 (0,25)	0 (45)	775,966	1383,24
12	0 (50)	0 (0,25)	0 (45)	700,543	1248,79

Resultados semelhantes encontrados por Zhu et al. (2010) onde a aplicação de ultrassom pode ser influenciar a síntese enzimática em sistemas não-aquosos, uma vez que pode aumentar a atividade e melhorar a transferência entre substrato e produto. Lee et al. (2011) investigaram o efeito da irradiação ultrassônica na produção de biodiesel a partir de óleos vegetais (soja, canola e óleo de milho) e relataram a obtenção de resultados superiores com o aumento do ultrassom, com rendimentos de 95 % utilizando 450 W em apenas 30 minutos de reação para os três óleos testados.

Diante dos estudos realizados por Paroul et al. (2010), com o objetivo principal a otimização da produção do geranil propionato num sistema isento de solvente, utilizando 10 % da lipase imobilizada comercialmente como catalisador (Novozym 435), em uma temperatura de 40 °C, e proporção molar de geraniol e ácido propiônico de 3:1, 150 rpm, obtiveram uma conversão de cerca de 93 %. Enquanto que a 60 °C em 6 horas de reação, nas mesmas condições de razão molar e agitação, obtiveram 85,8 % de conversão em geranil propionato.

A reutilização da enzima é uma questão fundamental para o processo enzimático de viabilidade e conformidade a vários ciclos de reação para a catalisador mobilizada foram tentadas. De acordo com Wang et al. (2011) o custo envolvido na imobilização de enzimas, juntamente com os ciclos de utilização deve ser tido em conta na análise da economia global de uma usina de biodiesel industrial. Em nosso estudo no decorrer de 8 ciclos contínuos uma atividade residual de 45 % em relação à atividade inicial de 1492,184 U/g (Figura 1).

Figura 1 – Avaliação dos ciclos operacionais da lipase CAL B Imobilizada em PU na produção biodiesel via esterificação enzimática.



Estes resultados mostram se superiores ao encontrados na literatura por Trentin (2013) que avaliou o uso de Novozym 435 em ciclos repetidos de metanólise de óleo de canola em

sistema livre de solvente, observou que depois de 5 ciclos de 432 horas de reação, a conversão foi mantida a 97 %, mas, infelizmente, a atividade da enzima não foi relatada em tal trabalho de investigação. Naturalmente, a estabilidade da enzima é um parâmetro e estudos adicionais relevantes devem ser realizados para melhorar a imobilização de enzimas de poliuretano para fins práticos. De fato, experiências recentes sobre a reutilização de Novozym 435 em sucessivas reações de transesterificação óleo de soja com etanol sob irradiação ultrassom mostrou uma diminuição na atividade, este fato se deve a baixa solubilidade da enzima em glicerol (mistura do produto), podendo ocorrer bloqueio na superfície da enzima, pela deposição de glicerol.

4. CONCLUSÕES

O uso do poliuretano (PU) como suporte de baixo custo para de imobilização, prova ser um material muito promissor, pois em nosso estudo o uso da lipase de *Candida antarctica* B para produção de ésteres etílicos de ácidos graxos (biodiesel) sob irradiação ultrassônica, apresentou rendimento superior a 2600 %, com atividade enzimática de esterificação de 1492,184 U/g em condições otimizadas e uma estabilidade operacional de 8 ciclos de reuso. Sugere – se que para comprovação da conversão de ésteres etílicos, seja realizado um novo estudo com outros métodos analíticos, comprovando assim o custo-benefício desse processo em grande escala, especialmente ambiente em aplicação industrial.

5. REFERÊNCIAS

- ADACHI D., HAMA S., NAKASHIMA K., BOGAKI T., OGINO C., KONDO A., Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B. *Biores. Technol.* v. 135, n. 1, p. 410-416, 2013.
- BRÍGIDA A. I. S., CALADO V. M. A., GONÇALVES L. R. B., COELHO M. A. Z. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. *Carbohydrate Polymers.* v. 79, n. 1, p. 832-838, 2010.
- DU W., XU Y., LIU D., ZENG J. Comparative study on lipase catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *J. Mol. Catal. B: Enz.* v. 30, n. 1, p. 125-129, 2004.
- FERRAZ L. I. R., POSSEBOM G., ALVEZ E. V., CANSIAN R. L., PAROUL N., DE OLIVEIRA D., TREICHEL H. Application of home-made lipase in the production of geranyl propionate by esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 2014.
- GOG A., ROMAN M., TOSA M., PAIZS C., IRIMIE F. D., Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. *Ren. Energy.* v. 39, n. 1, p. 10-16, 2012.
- JI J., WANG J., LI Y., YU Y., XU Z., Preparation of biodiesel with the help of ultrasonic and hydrodynamic cavitation. *Ultrason.* v. 44, n. 1, p. 411-414, 2006.

Lee S. B., Lee J. D., Hong I. K. Ultrasonic energy effect on vegetable oil based biodiesel synthetic process. *J. Ind. Eng. Chem.* v. 17, n. 1, p. 138-143, 2011.

LI C., YOSHIMOTO M., OGATA H., TSUKUDA N., FUKUNAGA K., NAKAO K., Effects of ultrasonic intensity and reactor scale on kinetics of enzymatic saccharification of various waste papers in continuously irradiated stirred tanks. *Ultrason. Sonochem.* v. 12, n. 1, p. 373-384, 2005.

NYARI, N. L. D., Estudo da Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B em Poliuretano. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2013.

OLIVEIRA D., FEIHRMANN A. C., RUBIRA A. F., KUNITA M. H., DARIVA C., OLIVEIRA J. V., Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. *J. Supercrit. Fluids.* v. 38, n. 1, p. 373-382, 2006.

PAROUL N., GRZEGOZESKI L. P., CHIARADIA V., TREICHEL H., CANSIAN R. L., OLIVEIRA J. V., DE OLIVEIRA D. Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. *Journal of chemical technology and biotechnology.* v. 85, n. 1, p. 1636-1641, 2010.

RAHMAN M. B. A., JUMBRI K., HANAFIAH N. A. M. A., ABDULMALEK E., TEJO B.A., BASRI M., SALLEH A. B. Enzymatic esterification of fatty acid esters by tetraethylammonium amino acid ionic liquids-coated *Candida rugosa* lipase. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* v. 79, n. 1, p. 61- 65, 2012.

RAMOS L. P., SILVA F. R., MANGRICH A. S., CORDEIRO C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. *Rev. Virtual de Química.* v. 3, n. 1, p. 385-405, 2011.

SANTIN C. M., SCHERER R. P., NYARI N. L., DALLA ROSA C., DALLAGO R. M., DE OLIVEIRA D., OLIVEIRA J. V. Batch esterification of fatty acids charges under ultrasound irradiation using candida antarctica B immobilized in polyurethane foam. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* v. 3, n. 3, p. 90-94, 2014.

TRENTIN C. M., POPIOLKI A. S., BATISTELLA L., DALLA ROSA C., TREICHEL H., OLIVEIRA D., OLIVEIRA J. V. Enzyme-catalyzed production of biodiesel by ultrasound-assisted ethanolysis of soybean oil in solvent-free system. *Ultrason. Sonochem.* v. 1, n. 1, p. 1-12, 2013.

WANG X., LIU X., ZHAO C., DING Y., XU P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase-nanoparticle biocomposite. *Biores. Technol.* v. 102, n. 1, p. 6352-6355, 2001.

YACHMENEV V. G., BLANCHARD E. J., LAMBERT A. H. Use of ultrasonic energy for intensification of the bio-preparation of greige cotton. *Ultrason.* v. 42, n. 1, p. 87-91, 2004.

ZHU K., LIU H., HAN P., WEI P. Study of ultrasound-promoted, lipase-catalyzed synthesis of fructose ester. *Frontiers of Chemical Engineering in China.* v. 4, n. 1, p. 367-371, 2010.