

Etanolise de fontes oleaginosas por catálise enzimática

Ethanolysis oil sources by enzymatic catalysis

Edu de Paula Scamilhe

Lucas Smith Pimenta

Patrícia Molgero Da Rós

Orientador: Ernandes Benedito Pereira, ernandes.pereira@unifal-mg.edu.br

Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, Campus Sede, Departamento de Alimentos e Medicamentos, Laboratório de Bioprocessos, Alfenas, Minas Gerais

Submetido em 29/04/2015

Revisado em 07/07/2015

Aprovado em 31/05/2016

Resumo: O biodiesel é um combustível renovável obtido a partir de uma reação de transesterificação química ou enzimática que produz ésteres de ácidos graxos e glicerina, na presença de um catalisador. Neste trabalho, foram utilizados diferentes óleos (soja, girassol, algodão, canola e café) com etanol, na presença da lipase AK imobilizada em POS-PVA, nas mesmas proporções estequiométricas. Todos os óleos testados apresentaram rendimento de 100% de conversão a ésteres de ácidos graxos num tempo de 12 h.

Palavras chave: etanolise. biodiesel. oleaginosas. lipases.

Abstract: Biodiesel is a renewable fuel obtained from a chemical or enzymatic reaction of transesterification to produce fatty acids and glycerin in the presence or not of a catalyst. In this work, different oils were used (soybean, sunflower, cottonseed, canola, and coffee) with ethanol in the presence of immobilized lipase AK POS-PVA, in the same stoichiometric ratios. All the oils tested showed 100% yield conversion of esters of fatty acids in a time of 12 h.

Keywords: ethanolysis. biodiesel. oilseeds. lipases.

Introdução

Os óleos vegetais foram propostos para serem usados como combustíveis para motores de automóveis no início do século XIX por Rudolph Diesel. Contudo, foi descoberto que o produto de sua transesterificação com metanol ou etanol era um combustível muito melhor devido à maior compatibilidade de suas propriedades físico-químicas, como densidade e viscosidade. Misturas de metil e/ou etil ésteres de ácidos graxos (de mais de algumas dúzias de diferentes espécies) derivados através de transesterificação de triacilgliceróis (TAGs) contidos em óleos vegetais foram chamados de Biodiesel.

De acordo com dados fornecidos pela ANP, tem sido possível adaptar motores e a rede de distribuição de combustíveis para usar o Biodiesel ao invés do petróleo. O Biodiesel é o único combustível alternativo para o diesel que satisfaz os requerimentos da EPA (Environmental Protection Agency).

O ácido graxo metil éster (FAME ou Biodiesel) é um dos promissores substitutos para os combustíveis fósseis devido aos seus benefícios ambientais e também devido à diminuição das reservas de petróleo. Comparado ao diesel fóssil convencional, o biodiesel apresenta maior taxa de biodegradação, menores emissões de CO₂, SO₂ e quase nenhum poluente particulado após sua combustão (DEMIRBAS, 2007; SHAHID e JAMAL, 2008; SHARMA et al., 2008).

O Biodiesel é conhecido como um combustível neutro quanto a emissões de carbono, pois o carbono nele presente foi originalmente fixado da atmosfera (DIZGE e KESKINLER et al., 2008).

A maneira mais comum de se produzir biodiesel é através da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais na presença de um álcool de cadeia curta. A reação pode ser álcali-catalisada, ácido-catalisada, e enzima-catalisada ou realizada sob condições supercríticas (MADRAs et al., 2004; MEHER et al., 2006; HERNANDEZ-MARTIN e OTERO, 2008; LIU et al., 2009).

O processo mais utilizado para obtenção do biodiesel é a reação de transesterificação. Consistem numa reação química dos óleos vegetais e/ou gorduras animais com o álcool (etanol ou metanol), na presença de um catalisador, da qual também se extrai a glicerina, produto com aplicações

diversas na indústria química. Além da glicerina, a cadeia produtiva do biodiesel gera uma série de outros coprodutos (torta, farelo, entre outros) que podem agregar valor e se constituir em outras fontes de rendas importantes para os produtores (<http://www.biodiesel.gov.br>).

Diversos pesquisadores têm estudado, para a obtenção de biodiesel (reação de transesterificação) utiliza como biocatalisador uma lipase comercial, a qual se tornou bastante atrativa para a produção de biodiesel, visto que o glicerol pode ser facilmente recuperado e a purificação dos ácidos graxos metil ésteres é relativamente simples (DIZGE e KESKINLER et al., 2008).

Sabe-se que enzimas como a lipase podem ser usadas para catalisar o processo de transesterificação através de sua imobilização em um suporte adequado. A vantagem da imobilização é que a enzima pode ser reutilizada sem separação. Além disso, a temperatura operacional do processo é baixa (50°C) comparada a outras técnicas. As desvantagens incluem efeitos de inibição que são observados quando metanol é utilizado e o fato de que enzimas são caras (SHIMADA et al., 2002).

A conversão enzimática é baseada no uso de lipases que, por um lado, catalisam a hidrólise de gorduras e óleos vegetais com liberação de glicerol e, por outro lado, na presença de álcoois de cadeia curta, favorecem a formação de ésteres de cadeia linear (HARI KRISHNA et al., 2001). A produção enzimática é possível utilizando lipases extras e intracelulares. Em ambos os casos, a enzima é imobilizada e utilizada, o que elimina operações subsequentes como separação e reciclagem. Vários trabalhos reportados na literatura, enzimas imobilizadas (extracelulares) ou células inteiras imobilizadas (enzimas intracelulares) são usadas para catálise. Ambos os processos são reportados como sendo altamente eficientes se comparados ao uso de enzimas livres (RANGANATHAN et al., 2008).

Baseado neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de biodiesel de diferentes fontes oleaginosas utilizando a catálise enzimática (lipase) como uma alternativa à via química.

Procedimentos Experimentais

Materiais

Foram obtidos óleos vegetais (soja, milho, girassol, canola e café) no comércio local. Os óleos foram caracterizados quanto a densidade, a viscosidade, o teor de ácidos graxos e o índice de peróxidos.

Os experimentos foram realizados com lipase comercial de *Pseudomonas fluorescens* (AK) imobilizada em suporte POS-PVA. Os demais materiais e reagentes empregados foram de grau analítico.

Determinação da composição em ácidos graxos dos óleos

Antes de iniciar a reação enzimática, é necessário que se conheça a composição em ácidos graxos dos óleos utilizados, de forma que a razão molar óleo:etanol seja corretamente aplicada, para tanto, foram utilizados dados relatados na literatura (DA RÓS, 2009), bem como, algumas análises foram realizadas em universidades parceiras especializadas nesse tipo de análise.

Determinação da razão molar óleo:etanol das reações

Sabendo a composição em ácidos graxos dos óleos, foi possível determinar a fração da massa molar do óleo composta por seus principais ácidos graxos e através deste valor, calcular a massa molar do óleo através da seguinte equação 1:

$$MM_{\text{óleo}} = 3 \cdot MM_{\text{ács.}} + 38 \quad (1),$$

sendo que é multiplicado por 3 devido aos óleos serem triglicérides (ácidos graxos presentes na molécula) e somados a 38 devido aos hidrogênios presentes nas ligações da molécula.

A razão molar utilizada foi de 1:12 (óleo:etanol), e para calcular corretamente a quantidade necessária de cada reagente levou-se em consideração a massa molar do óleo calculada e a massa molar do etanol (46g/mol). Além disso, também foi considerada a massa total da reação (30g),

sendo utilizados 3g de imobilizado enzimático (10% em relação à massa total da reação).

Preparo do suporte POS-PVA e imobilização da lipase comercial

Para melhorar a estabilidade físico-química da enzima utilizada (lipase AK de *Pseudomonas fluorescens*) realizou-se um processo de imobilização das mesmas, tendo sido utilizado o suporte híbrido polissiloxano-polivinilálcool (POS-PVA).

As pastilhas de POS-PVA foram trituradas em moinho de faca e peneiradas utilizando-se 2mesh diferentes, de 42 e 60, sendo utilizado somente o volume retido na peneira de 60 mesh. Após esta etapa, o suporte triturado é deixado durante 1 hora no shaker em contato com solução de epicloridrina 2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,5. Filtrou-se a mistura e o suporte ficou por mais 2 horas no shaker em contato com hexano na proporção de 10 mL do solvente para cada grama de suporte. Por fim, filtrou-se novamente e ao suporte foram adicionadas algumas gotas de polietilenoglicol (PEG) e as enzimas numa proporção de 0,25g para cada grama de suporte.

O derivado imobilizado preparado foi mantido em geladeira overnight e no dia seguinte o teor de umidade foi determinado. É importante que o preparado não apresente um teor de umidade elevado (~ 10% m/v) devido ao fato de as enzimas trabalharem em uma interface óleo-água, sendo que um excesso de água pode ocasionar uma perda considerável na eficiência de conversão do substrato em produto.

Determinação da atividade enzimática do preparado

A atividade enzimática do preparado foi avaliada utilizando emulsão preparada com proporções iguais de água destilada e azeite e 7% de goma arábica em relação a massa de água utilizada. O ensaio foi conduzido em triplicata, utilizando um padrão para cada amostra, titulando-se com KOH 0,02535 N. A atividade foi calculada através da equação 2:

$$\frac{(V_A - V_P) \cdot M \cdot 1000}{M_{Enz.} \cdot t} \quad (2)$$

Sendo: V_A e V_P : o volume da solução de KOH utilizado na amostra e seu respectivo padrão; M: a molaridade da solução de KOH; $M_{Enz.}$: a massa (g) de enzima utilizada na amostra; t: o tempo (min).

Parâmetros reacionais da produção de biodiesel

As reações foram conduzidas sobre agitador magnético em reatores de vidro acoplados a um banho térmico estabilizado em 45°C e a um condensador.

As reações foram conduzidas durante 72h com o objetivo de se obter um panorama melhor da conversão dos triglicerídeos em ésteres etílicos, sendo retiradas amostras aos tempos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas a partir do início das reações.

Ao término das reações foram separadas as enzimas imobilizadas, as quais foram imersas em terc-butanol afim conservá-las para uso posterior, e o biodiesel foi tratado com levatite para retirar resíduos de glicerol das amostras.

Determinação da densidade, viscosidade e viscosidade cinemática

A densidade dos óleos foi medida utilizando um densímetro eletrônico.

A viscosidade (em centiPoise) das amostras de óleo e de biodiesel foram determinadas utilizando-se viscosímetro acoplado a um computador utilizando o software Rheocalc V2.4 à temperatura de 40°C e torque entre 20-80%. Quanto a viscosidade cinemática (em centiStokes) foi calculada dividindo-se a viscosidade pela densidade do óleo ou biodiesel.

Análise cromatográfica do biodiesel

As amostras de biodiesel obtidas foram avaliadas em cromatógrafo a gás para determinar sua composição final em ácidos graxos e o rendimento da conversão.

Resultados e discussões

Principais ácidos graxos componentes dos óleos

Nas Tabelas 1 a 5 estão descritos os principais ácidos graxos componentes de cada óleo utilizado neste estudo e abaixo o cálculo da massa molar a ser utilizada para determinar a razão molar da reação.

Tabela 1. Composição em ácidos graxos do óleo de algodão.

Ác. Graxo	% (m/m)	Massa Molar	MM parcial
C _{14:0} (mirístico)	1,0	228,37	228,37
C _{16:0} (palmítico)	25,0	256,42	6410,5
C _{18:0} (esteárico)	2,8	284,47	796,516
C _{18:1} (oléico)	17,1	282,46	4830,066
C _{18:2} (linoléico)	52,7	280,44	14779,186

$$MM_{AC.} = \sum(\%_i \times Mmi) / \sum\%_i = 27044,636 / 98,6 = 274,29 \text{ g/mol}$$

$$MM_{óleo} = 3(MM_{AC.}) + 38 = 860,86 \text{ g/mol}$$

Tabela 2. Composição em ácidos graxos do óleo de canola.

Ác. Graxo	% (m/m)	Massa Molar	MM parcial
C _{16:0} (palmítico)	3,75	256,42	961,58
C _{18:0} (esteárico)	1,87	284,47	531,96
C _{18:1} (oléico)	62,41	282,46	17628,33
C _{18:2} (linoléico)	20,12	280,44	5642,45
C _{18:3} (linolênico)	8,37	278,42	2330,38
C _{20:1} (eicosenoíco)	1,54	310,52	478,20

$$MM_{AC.} = \sum(\%_i \times Mmi) / \sum\%_i = 27572,5 / 98,06 = 281,18 \text{ g/mol}$$

$$MM_{óleo} = 3(MM_{AC.}) + 38 = 881,55 \text{ g/mol}$$

Tabela 3. Composição em ácidos graxos do óleo de girassol.

Ác. Graxo	% (m/m)	Massa Molar	MM parcial
C _{16:0} (palmítico)	5,70	256,42	1461,59
C _{18:0} (esteárico)	4,79	284,47	1362,61
C _{18:1} (oléico)	15,26	282,46	4310,34
C _{18:2} (linoléico)	71,17	280,44	19958,91
C _{22:0} (behênico)	1,16	340,59	395,08

$$MM_{AC.} = \sum(\%_i \times Mmi) / \sum\%_i = 27488,53 / 98,06 = 280,32 \text{ g/mol}$$

$$MM_{óleo} = 3(MM_{AC.}) + 38 = 878,96 \text{ g/mol}$$

Tabela 4. Composição em ácidos graxos do óleo de soja.

Ác. Graxo	% (m/m)	Massa Molar	MM parcial
C _{16:0} (palmítico)	10,82	256,42	2774,47
C _{18:1} (oléico)	24,18	282,46	6829,88
C _{18:2} (linoléico)	52,72	280,44	14784,80
C _{18:3} (linolênico)	6,56	278,42	1826,44

$$MM_{AC.} = \sum(\%_i \times Mmi) / \sum\%_i = 26215,59/94,28 = 278,06 \text{ g/mol}$$

$$MM_{óleo} = 3(MM_{AC.}) + 38 = 872,18 \text{ g/mol}$$

Tabela 5. Composição em ácidos graxos do óleo de café.

Ác. Graxo	% (m/m)	Massa Molar	MM parcial
C _{16:0} (palmítico)	10,90	256,42	2794,98
C _{18:1} (oléico)	26,23	282,46	7408,93
C _{18:2} (linoléico)	51,00	280,44	14302,44
C _{18:3} (linolênico)	6,56	278,42	1826,44

$$MM_{AC.} = \sum(\%_i \times Mmi) / \sum\%_i = 26332,79/94,69 = 278,09 \text{ g/mol}$$

$$MM_{óleo} = 3(MM_{AC.}) + 38 = 872,28 \text{ g/mol}$$

Viscosidade e densidade dos óleos

A Tabela 6 mostra os resultados das análises de densidade, viscosidade (cP) e viscosidade cinemática (cSt) dos óleos e ésteres etílicos produzidos.

Tabela 6. Propriedades dos óleos e do biodiesel obtido.

Amostra	Densidade (g/mL)	Viscosidade (cP)	V. Cinemática (cSt)
Soja (óleo)	0,91	32,47	35,68
Girassol (óleo)	0,91	29,10	31,98
Canola (óleo)	0,90	33,60	37,33
Algodão (óleo)	0,91	30,25	33,24
Café (óleo)	0,91	32,98	36,24
Soja (biodiesel)	-	4,40	4,83
Girassol (biodiesel)	-	3,52	3,87
Canola (biodiesel)	-	3,59	3,99
Algodão (biodiesel)	-	3,89	4,27
Café (biodiesel)	-	4,70	5,13

Os resultados evidenciam uma conversão eficiente dos triglicérides para ésteres etílicos, pois os mesmos passaram a ter um valor de viscosidade cinemática que se enquadra em um intervalo ideal para utilização do biodiesel, entre 3,5 e 5,5 centiStokes.

Teor de umidade e atividade hidrolítica do imobilizado enzimático

A umidade do preparado foi devidamente avaliada em aparelho específico, atingindo 10,53% de umidade em relação a massa total do imobilizado, um valor dentro do que se esperava para que as enzimas trabalhassem bem na conversão e a reação ocorresse bem.

A Tabela 7 mostra os resultados da análise de atividade hidrolítica, em unidades de atividade por grama (U/g), da lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada no suporte POS-PVA.

Tabela 7. Atividade hidrolítica do derivado imobilizado.

Massa úmida				Massa seca			
A1	A2	A3	Média	A1	A2	A3	Média
1868,44	1963,10	1960,43	1930,65	1671,70	1756,38	1753,9	1727,36

A atividade da massa seca foi calculada descontando-se o teor de umidade das amostras. Os valores de atividade hidrolítica alcançado pelas enzimas imobilizadas foram bastante satisfatórios, considerando que ao serem imobilizadas uma parcela das enzimas fica inserida no suporte, diminuindo sua superfície de contato com o substrato e consequentemente sua atividade.

Análise cromatográfica dos produtos obtidos

A análise de cromatografia gasosa das amostras de biodiesel obtidas foi realizada pra determinar a conversão de cada ácido graxo presente nos óleos, de forma que foi possível acompanhar a reação ao longo do tempo, como mostrado na Figura 2, para cada um dos óleos estudados.

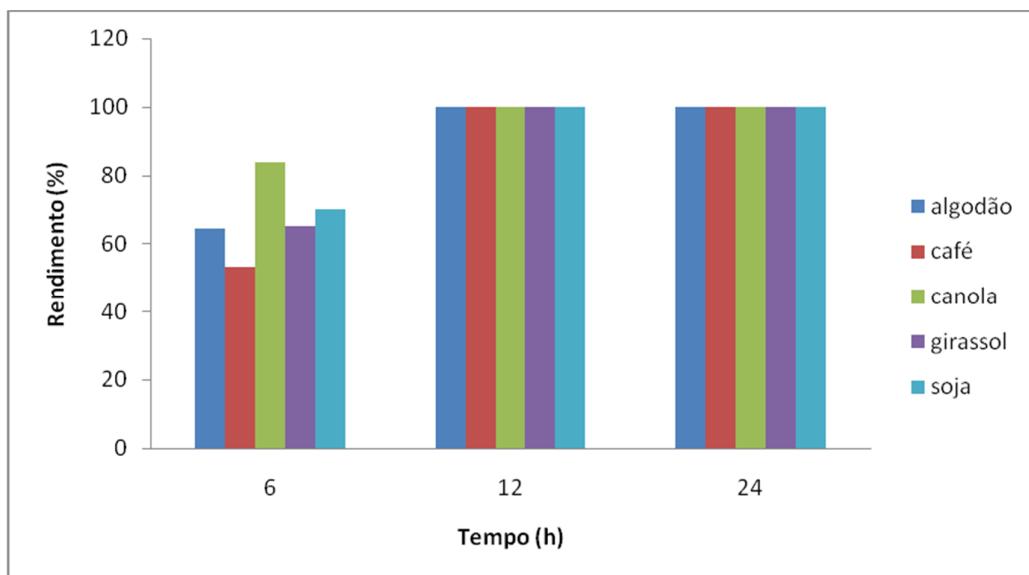


Figura 2. Rendimento da conversão dos óleos em biodiesel ao longo do tempo.

O rendimento avaliado aos tempos de 48 e 72h foi omitido, pois foi observado que aos tempos de 12 e 24h o rendimento já havia atingido 100% de conversão dos óleos em biodiesel.

Pôde-se observar um tempo e rendimento de conversão bastante satisfatório por se tratar de uma reação enzimática, destacando-se o óleo de canola que apresentou maior rendimento ao tempo de 6 horas. O óleo de café, apesar de não ter se destacado na primeira medição, também apresentou rendimento de 100% ao final de 12 horas, provando ser uma matéria prima interessante para a produção de biodiesel no Brasil.

Conclusões

Com base nos dados obtidos neste estudo, podemos afirmar com segurança que a via enzimática está muito próxima da eficiência da via química para converter óleos vegetais em biodiesel. Além disso, as vantagens observadas em um processo de catálise enzimática são muito grandes, tendo maior facilidade na separação do catalisador e dos subprodutos, maior aproveitamento dos óleos, pois as enzimas são mais específicas que os catalisadores químicos, e futuramente, espera-se que o custo deste processo se

torne menor com o reaproveitamento das enzimas imobilizadas em diversas bateladas ou processo contínuo.

Outro ponto interessante de se observar neste estudo é que a diversidade de óleos vegetais que podem ser utilizados com eficácia na produção de biodiesel é muito grande, utilizando-se o mesmo álcool e o mesmo catalisador enzimático, mostrando que uma produção em maior escala não ficaria necessariamente dependente de apenas uma espécie oleaginosa.

Agradecimentos

Ao PIBIC/ CNPq pela bolsa de Iniciação Científica, a UNIFAL-MG e a EEL/USP.

Referências

- ABRIGOR, R.D., UADIA, P.O., FOGLIA, T.A., et al. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. **Biochemical Society Transactions** (2000), Volume 28, part 6.
- BAN, K., HAMA, S., NISHIZUKA, K., KAIEDA M., MATSUMOTO, T., KONDO, A., NODA, H., FUKUDA, H, *Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 17 (2002) 157-165, 2002. 17: p. 157-165.
- D'AGOSTO, M.A. (2004) **Análise da Eficiência da Cadeia Energética para as Principais Fontes Utilizadas em Veículos Rodoviários no Brasil**. Tese de Doutorado, PET-COPPE-UFRJ, Rio de Janeiro. Apud: DERALDO, J. M. M. **BIODIESEL, A ALTERNATIVA ENERGÉTICA BRASILEIRA PARA O SETOR DE TRANSPORTES PÚBLICO E DE CARGAS**. 2006 Dissertação de Mestrado. UFRJ
- DA RÓS, P. C. M. [Etanolise de óleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de micro-ondas](#). 2009. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo (USP). Escola de Engenharia de Lorena, Lorena.
- DERALDO, J. M. M. **BIODIESEL, A ALTERNATIVA ENERGÉTICA BRASILEIRA PARA O SETOR DE TRANSPORTES PÚBLICO E DE CARGAS**. 2006 Dissertação de Mestrado. UFRJ
- DIZGE, N., KESKINLER, B., 2008. ENZYMATIC PRODUCTION OF BIODIESEL FROM CANOLA OIL USING IMMOBILIZED LIPASE. **BIOMASS BIOENERGY** 32, 1274-1278.
- FERRARI, R. A., OLIVEIRA, V. S., SCABIO, A. Biodiesel from soybean: characterization and consumption in an energy generator. **Quím. Nova**, Jan./Feb. 2005, vol.28, no.1, p.19-23. ISSN 0100-4042.
- GUIEYSSÉ, D., SALAGNAD, C., MONSANA, P., REMAUD-SIMEONA, M., *Lipase-Catalyzed Enantioselective Transesterification Toward Esters Of 2-Bromo-Tolylacetic Acids*. **Tetrahedron: Asymmetry** 14 (2003) 317-323, 2003. 14: p. 317-323.

HAAS, M.J., PIAZZA, G.J., FOGLIA, T.A., *Enzymatic approaches to production of biodiesel fuels. In: Kuo, T.M., Gardner, H.W. (Eds), Lipids Biotechnology. Marcel Dekker, New York, USA, Chapter 29. 2002*

HERNANDEZ-MARTIN, E., OTERO, C., 2008. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. *Bioresour. Technol.* 99, 277-286

LIMA, J. R. O., SILVA, R. B., SILVA, C. C. M. et al. Biodiesel from babassu (*Orbignya* sp.) synthesized via ethanolic route. *Quím.Nova*, May/June 2007, vol.30, no.3, p.600-603. ISSN 0100-4042.

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, N. 32, P. 38-46, 2004.

OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, J.V., FACCIO, C. et al. Evaluation of the influence of process variables on enzymaticalcoholysis of castor oil. *Ciênc.Tecnol.Aliment.*, Apr./June 2004, vol.24, no.2, p.178-182. ISSN 0101-2061.

PINTO, A. C., GUARIEIRO, L. L. N., REZENDE, M. J. C. et al. Biodiesel: an overview. *J. Braz. Chem. Soc.*, Nov./Dec. 2005, vol.16, no.6b, p.1313-1330. ISSN 0103-5053.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. *Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento*, v.31, p.28-37, 2003.

SHARMA, Y.C., SINGH, B., 2008. Development of biodiesel from karanja, a tree found in rural India. *Fuel* 87, 1740-1742.

SHIMADA, Y., WATANABE, Y., SAMUKAWA, T., 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 789-793

VALLIKIVI, I., LILLE, U., LOOKENE, A., METSALA, A., SIKK, P., TŌUGU, V., VIJA, H., VILLO, L., PARVE, O., *Lipase Action On Some Non-Triglyceride Substrates. Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22 (2003) 279-298, 2003. 22: p. 279-298.