

MÉTODOS BIOCATALÍTICOS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE ÓLEO DE GIRASSOL EMPREGANDO LIPASE DE *Candida antarctica*

Maiara Priscilla de Souza¹, Mariéli Milanesi Ceolin^{2*}, Rosana de Cassia de Souza Schneider^{1,2,3}, Valeriano Antonio Corbellini^{1,2,3}

¹Curso de Química Industrial, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul-RS, Brasil.

²Programa de Mestrado em Tecnologia, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul-RS, Brasil.

³Departamento de Química e Física – Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul-RS, Brasil.

*E-mail: marieliceolin@yahoo.com.br

Recebido em 21 de setembro de 2010.

Aceito em 27 de outubro de 2010.

RESUMO

A utilização de lipases nas reações de transformação de óleo vegetal alinha-se aos princípios da química verde, principalmente por serem de fontes renováveis e apresentarem grande eficiência e especificidade nas reações oleoquímicas. Dentre as lipases estudadas destaca-se a *Candida antarctica B* (Novozym ® 435) por ser comercializada já imobilizada em suporte de resina acrílica, e com a vantagem de ser reutilizada nas reações. Neste trabalho esta lipase foi testada na produção de biodiesel realizando ensaios de transesterificação enzimática com óleo de girassol em meio metanólico ou etanólico. Como principal resultado foi possível otimizar um sistema de transesterificação enzimática através de processo contínuo, obtendo alta conversão do óleo de girassol em ésteres etílicos, assim como realizando 87 ciclos com a mesma enzima sem reduzir a atividade e 224 ciclos, após a redução da atividade. Os sistemas obtidos são adequados aos objetivos e podem ser utilizados com ausência de um solvente orgânico, sendo necessário somente o excesso do álcool.

Palavras-chave: lipase, biodiesel, óleo de girassol.

1 Introdução

Inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos com testes de vários tipos de gorduras e óleos transesterificados, puros ou misturados ao diesel convencional em diferentes proporções e têm demonstrado bons resultados quando utilizados por caminhões, ônibus e tratores [1-2]. Nesse processo é imprescindível a qualidade do produto final e um dos aspectos a serem controlados e otimizados é o uso de catalisadores [3]. Através da tecnologia enzimática, podem-se obter produtos de alta qualidade de maneira limpa, atendendo às necessidades tecnológicas, de mercado e de preservação ambiental.

O processo enzimático pode ser aplicado às modificações específicas ou interconversões de estrutura química realizadas por catalisadores bioquímicos, empregando enzimas contidas em células ou isoladas. A escolha do biocatalisador ocorre entre organismos vivos, de origem animal, vegetal ou microbiana [4-5].

Desta forma, uma das alternativas tecnológicas promissoras para produção de biodiesel é a rota enzimática. Vários métodos com esta finalidade foram relatados na literatura, cabe destacar algumas pesquisas.

Segundo Dossat *et al* [6], a principal proposta do seu estudo foi à produção do oleato de butila pelo método de transesterificação num processo semi-contínuo eficiente visando uma possível utilização em escala industrial. O processo semi-

contínuo de reação de transesterificação enzimática do óleo de girassol contendo elevado teor de ácido oléico foi realizado em reator do tipo leito-fixado.

Para o processo contínuo de leito fixo foi utilizado por Nie *et al.* (2006) [7] uma série de nove colunas empacotadas com lipase de *Candida antarctica sp.* imobilizada. A planta foi operada com uma vazão de 15 L h⁻¹ dando uma produção anual de 100 toneladas. O rendimento de conversão final dos ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de óleos vegetais e óleos usados sob condições otimizadas foram de 90% e 92%, respectivamente. A vida da lipase imobilizada foi superior a 10 dias. Esta metodologia destaca-se por ser de baixa poluição ao meio ambiente, menor gasto de energia e baixo custo.

Kojima *et al*[8], publicaram um estudo sobre a produção de biodiesel, em planta piloto, a partir do resíduo de terra branqueamento obtida em processos de purificação de óleo e utilizando lipase da *Candida cylindracea*. Aproximadamente 40% do peso do resíduo é óleo vegetal, o qual foi testado como matéria-prima para produção de biodiesel. A única desvantagem do aproveitamento deste resíduo empregando processo biotecnológico foi o custo da enzima.

Pesquisadores obtiveram resultados satisfatórios da conversão enzimática do óleo de girassol em biodiesel num sistema livre de solvente utilizando a lipase imobilizada comercial da *Candida antarctica* (Novozym® 435) para sintetizar o biodiesel do óleo de girassol. As circunstâncias ótimas para o transesterificação foram encontradas: 45 °C, 3% da

enzima baseada no peso do óleo, proporção molar 3:1 álcool e óleo e sem água adicionada no sistema. Sob estas circunstâncias, > 99% da conversão do óleo ao éster metílico de ácido graxo foi conseguido após 50 h da reação, mas a atividade da lipase imobilizada foi diminuindo. A fim de melhorar a estabilidade das enzimas, Ognjanovic e colaboradores [9] utilizaram acetato de metila ao invés do metanol, tendo como resultado uma alta conversão de óleo em éster metílico de ácido graxo (95,65%) e o aumento na meia vida da lipase imobilizada em aproximadamente 20,1 vezes em comparação ao metanol. O reator de leito fixo utilizado por estes autores operou por até 72 h sem redução significativa perda na produtividade.

Com base nas pesquisas já realizadas, a proposta deste trabalho foi investigar o emprego de lipase de *Candida antarctica* B na produção de biodiesel de girassol, buscando uma configuração de equipamento que seja adequado ao uso sem solvente.

2 Parte Experimental

Para explorar a melhor configuração para a transesterificação enzimática de óleo de girassol foram realizados ensaios de bancada por sistema contínuo e por batelada. Os ensaios foram conduzidos variando as concentrações de enzima, substrato, etanol ou metanol e a presença ou não de solvente orgânico (hexano). Estas variáveis também foram aplicadas no sistema por batelada.

Os produtos obtidos nos diferentes protótipos foram analisados por cromatografia tendo como padrões o biodiesel fornecido pela BSBios (B100 - metílico) e o biodiesel produzido na planta de biodiesel da UNISC (B100-etílico).

Também foram utilizados os padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos adquiridos da Supelco denominados KIT ME10 (ésteres metílicos de ácidos graxos contendo cadeia saturada) e KIT ME14 (ésteres metílicos de ácidos graxos contendo cadeia insaturada) que foram preparados em soluções estoque, utilizando como solvente o heptano (Synth®), em concentração de 10 mg mL⁻¹.

Ensaio em batelada

Os experimentos foram realizados em escala laboratorial, com o auxílio de uma Incubadora *Shaker* MA 420 (MARCONI), a 225 rpm.

As reações de metanólise e etanólise enzimática do óleo de girassol foram realizadas na presença e ausência de solvente orgânico hexano em erlenmeyers de 125 mL com 1 g do óleo de girassol e diferentes proporções de metanol ou etanol, água e enzima em períodos de 2 a 24 horas. A enzima empregada como biocatalisador das reações de transesterificação foi a lipase *Candida antarctica* B (Novozym® 435).

As reações com solvente orgânico foram realizadas com 40 mL de hexano (Nuclear®). Após a adição dos reagentes e solvente, os erlenmeyers foram fechados e imediatamente

introduzidos no *shaker* pré-aquecidos a 55°C. A razão molar óleo-álcool (metanol ou etanol) foi calculada a partir das massas molares dos mesmos. A quantidade de enzima e de água adicionadas ao meio reacional foi definida com relação à soma das massas dos substratos álcool e óleo.

As reações foram conduzidas inicialmente com 5 e 10% de lipase e 1:10 e 1:4 de razão óleo-álcool.

Os experimentos sem a adição de hexano foram conduzidos com 20 vezes mais o volume de álcool, visando reduzir a viscosidade do meio e aumentar a homogeneidade da mistura álcool-óleo.

Ensaio em sistema contínuo

O processo contínuo de transesterificação enzimática do óleo de girassol foi realizado em dois protótipos de reatores. O estudo envolveu a preparação de ésteres metílicos e etílicos. Nos protótipos estudados, o éster e o glicerol foram recebidos no mesmo recipiente, sendo o glicerol decantado e separado.

Os protótipos testados envolveram de maneira geral o emprego de banho termostatizado, reator, bomba peristáltica, reservatório, condensador e chapa de aquecimento com agitação magnética conforme Figura 1.

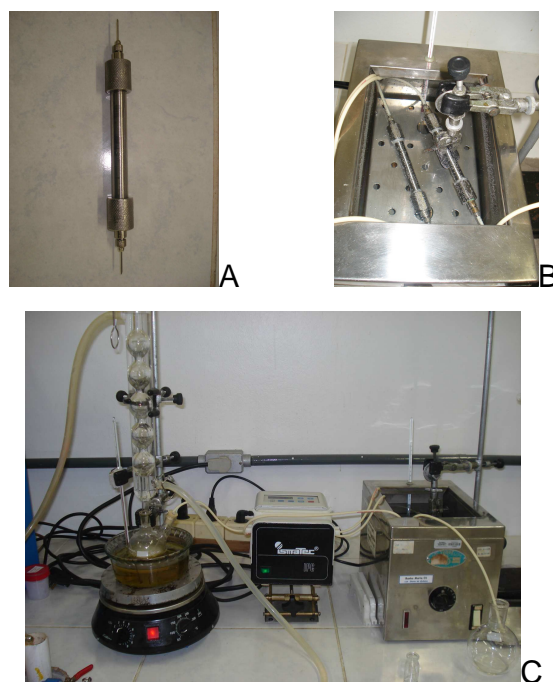


Figura 1. Protótipo de produção de biodiesel com catálise enzimática e sistema contínuo onde A) Reator tipo coluna, B) Montagem com duas colunas e C) Sistema completo.

Análise cromatográfica

O equipamento utilizado na realização deste estudo foi um cromatógrafo a gás acoplado com espectrômetro de massas (CG-EM) CG QP2010 Plus, marca Shimadzu, equipado com Injetor Automático AOC 20i.

Para as análises por CG-EM dos padrões e amostras de biodiesel foi utilizada uma coluna de ZB5 MS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm) com temperatura inicial de aquecimento de 150°C (0,1min), velocidade de aquecimento de 3°C min⁻¹ até 250°C, e de 30°C min⁻¹ até 300°C; temperatura do detector de massas, da fonte de ionização e da interface de 280°C, modo SCAN e split de 1:5, com volume de amostra ou padrão de 1µL (injetados em triplicata).

A partir da solução estoque foi preparada uma diluição de 0,1 a 1,0 mg mL⁻¹, as quais foram analisadas a fim de construir a curva analítica e identificar os compostos através das bibliotecas NIST e WILEY, bem como avaliar os tempos de retenção e o fator de resposta de cada componente das amostras de biodiesel.

A análise qualitativa foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), onde 1 gota das amostras foram diluídas em 1mL de hexano (Nuclear®), da mesma forma que o óleo de partida e o B100. O óleo, o B100 e a amostra foram aplicados na placa de CCD e eluídos com hexano (Nuclear®):acetato de etila (Vetec®) (9:1 v/v). As placas cromatográficas de sílica utilizadas no experimento apresentavam medida de 4 cm x 5,5cm (Macherey Nagel®). A revelação das substâncias separadas foi realizada em câmara de iodo. Como resultados foram observados os R_f (Fator de retenção) das amostras.

3 Resultados

3.1 Produção de biodiesel por batelada

O biodiesel produzido por batelada, após separação da glicerina, foi analisado por cromatografia sendo verificado por CCD que os produtos da reação apresentavam o mesmo R_f do biodiesel de óleo de girassol (Figura 2), obtido por catálise química em escala piloto [10].

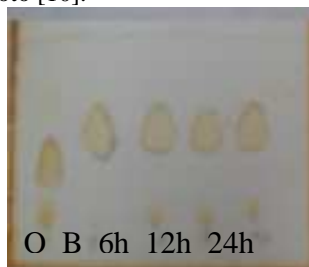


Figura 2. Cromatograma de CCD das amostras em triplicata da reação de transesterificação com metanol por sistema batelada do óleo de girassol, onde O- óleo de girassol, B- biodiesel do óleo de girassol.

Na análise por CG-EM foram identificados os picos do biodiesel de óleo de girassol produzido por etanolise e metanolise, os quais apresentaram o mesmo perfil cromatográfico que o B100-etílico e B100-metílico, respectivamente. Conforme os cromatogramas obtidos, os ésteres presentes estavam nas seguintes proporções: C16:0 – 12,35%, C18:1 – 34,4%, C18:2 – 44% e C18:0 – 2,1%.

Foi observado que, após 6 horas de reação, a conversão foi máxima para a metanolise em solvente orgânico e que sem adição de solvente a conversão foi menor que 20% para o mesmo tempo, alcançando 50% após 24 horas. Na etanolise com e sem solvente orgânico a diferença de conversão em biodiesel foi ≥ 99% em 10h. Esta reação com óleo de girassol foi mais rápida do que a obtida com soja por Rosset e colaboradores [11] empregando um volume menor de etanol em maior tempo de reação e menor temperatura.

A análise da Figura 3, a qual apresenta o gráfico dos resultados obtidos por cromatografia gasosa da reação de transesterificação por sistema batelada do óleo de girassol, indica que a conversão por etanolise ou metanolise foi mais rápida em meio com solvente orgânico. Na ausência de solvente orgânico a conversão foi maior na etanolise, uma vez que o álcool foi adicionado em dobro e apresenta maior solubilidade em óleo. Com a otimização de outras variáveis como o sistema de agitação será possível uma alta conversão em menor tempo, pois em batelada é imprescindível uma agitação uniforme e vigorosa [12].

Transesterificação em sistema contínuo

Com o protótipo laboratorial em sistema contínuo desenvolvido para transesterificação enzimática (Figura 1), os resultados foram mais satisfatórios empregando o etanol como único solvente, uma vez que a solubilidade do etanol em óleo é maior que a do metanol, sendo que o etanol já é estudado em blendas com biodiesel e diesel [13].

Considerando os estudos preliminares realizados com diferentes configurações da coluna, as quais levaram a vazamentos, dificuldades de realização em escala laboratorial e baixa conversão, o modelo apresentado na Figura 1, em aço inoxidável e com a enzima empacotada apresentou um bom potencial para a produção do biodiesel, ocorrendo conversão total do óleo de girassol em ésteres etílicos.

O fluxo dos substratos passando pela coluna foi um dos fatores otimizados. Inicialmente foram avaliados diferentes fluxos com base nas faixas permitidas para a bomba empregada no processo. Neste estudo constatou-se que a reação deveria ser conduzida na menor velocidade permitida pela bomba peristáltica utilizada, de 6 mL h⁻¹, visando um maior tempo de contato dos substratos com a enzima.

O produto obtido da reação de transesterificação foi facilmente separado do biocatalisador, sendo o glicerol (co-produto da reação) separado por decantação no reservatório final. Já o reservatório contendo os substratos em concentrações previamente definidas foi dotado de um sistema de agitação

magnética. Na transposição para escala piloto, será necessário o emprego de um sistema de agitação mecânica, mais eficiente e de um trocador de calor que evite a perda de etanol antes do substrato entrar na coluna. Após a reação, a glicerina será

separada e o etanol removido podendo ser novamente reintroduzido no sistema, evitando-se a geração de resíduos.

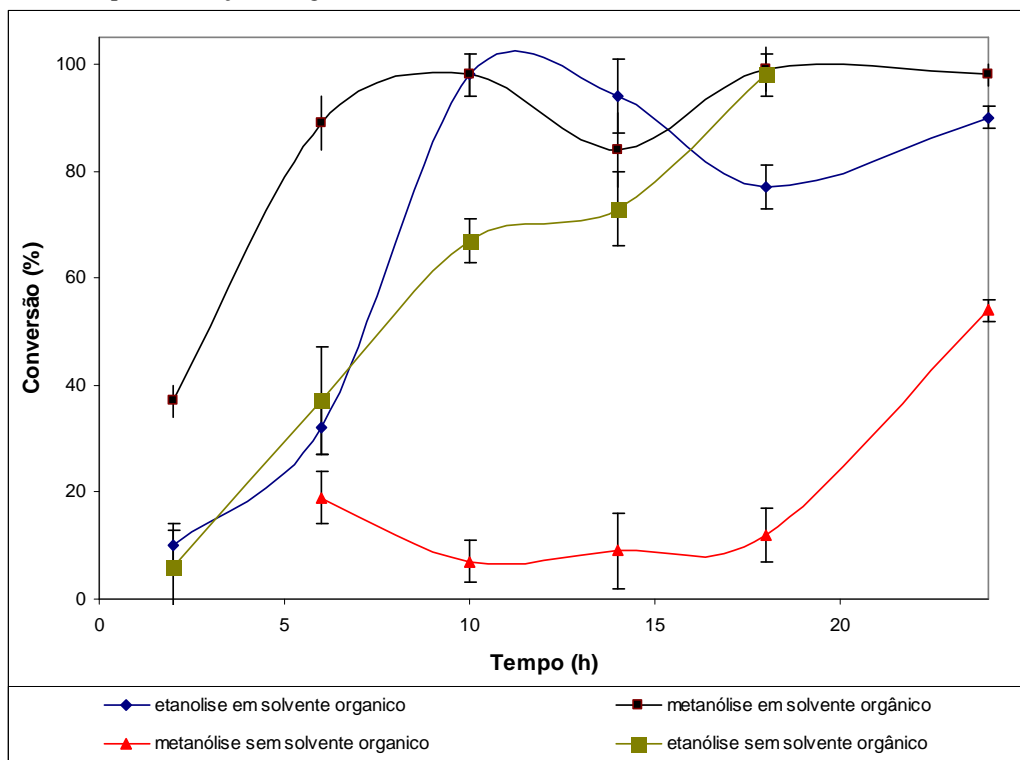


Figura 3. Grau de conversão do óleo de girassol em biodiesel por biocatálise em sistema por batelada com e sem solvente orgânico.

As reações conduzidas no sistema contínuo com um reator tipo coluna foram analisadas inicialmente por CCD conforme Figura 4, observando-se que as conversões foram totais até 16 h de reação, e no tempo restante do teste a reação foi parcial, sendo monitorada até 64 h. Este resultado se deve ao pouco tempo de contato entre a enzima e o substrato, e assim, tornou-se necessário adicionar em série, mais um reator tipo coluna no sistema. Outro aspecto relevante é a possibilidade de recirculação do produto após a separação da glicerina, completando a conversão do substrato.

Os resultados de CCD das amostras do Sistema Contínuo com 2 Reatores também estão na Figura 4. A adição de mais um reator no sistema promoveu a conversão total por maior tempo (72 h). Este sistema permaneceu ligado por 388 h obtendo conversões parciais. Durante a realização destes experimentos foram retiradas amostras em diferentes tempos, para análise da conversão. As reações foram monitoradas por CCD e CG-EM. O gráfico das conversões por etanolise enzimática utilizando o sistema com 2 reatores e para um total de 388 h de reação encontra-se representado na Figura 5.

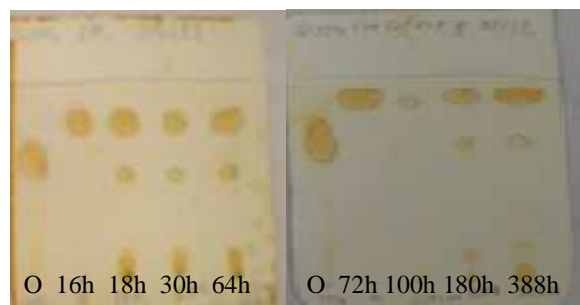


Figura 4. A) Cromatoplaca de CCD das amostras de reação de transesterificação com etanol por sistema contínuo enzimático realizado com 1 reator, onde O- óleo de girassol, B- ésteres (Biodiesel do óleo de girassol) e B) Cromatograma de CCD das amostras de reação de transesterificação por sistema contínuo enzimático realizado com 2 reatores, onde O- óleo de girassol, B- ésteres (Biodiesel do óleo de girassol).

Segundo as análises de CG-EM, as conversões obtidas com o protótipo contendo dois reatores tipo coluna até 340 h de reação indicaram que a atividade da enzima ocorreu porém com oscilações quantitativas, que podem estar relacionadas à homogeneidade das amostras.

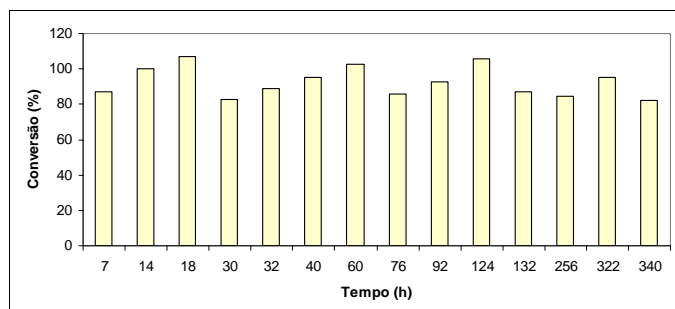


Figura 5. Gráfico das Conversões do Sistema Contínuo Enzimático utilizando 2 reatores.

Conforme o tempo utilizado para o escoamento da primeira gota no sistema utilizando lipase nova, foi possível determinar que em média um ciclo de transesterificação neste sistema foi de 75 min, fornecendo um total de 87 ciclos que a enzima permaneceu totalmente ativa, após o que perdeu parte da atividade como pôde ser constatado por cromatografia. Destaca-se também que conforme observado em CCD foi possível verificar que ainda ocorreram no mínimo 224 ciclos, os quais podem ser utilizados com recirculação por um tempo muito maior, não dimensionado neste trabalho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estes resultados demonstram que foi possível a conversão máxima do óleo de girassol em biodiesel empregando o sistema contínuo, sem adição de solvente orgânico, com fácil separação dos produtos e com o emprego de etanol. A ausência do solvente e a possibilidade de alta conversão com etanol são aspectos relevantes para que o processo de produção de biodiesel seja verdadeiramente mais limpo.

Destaca-se que a transesterificação enzimática, diferente da transformação por catálise química, contribui para minimização da geração de resíduos e aumenta o potencial de reaproveitamento em novas reações, além de contribuir para produção de substâncias de fontes renováveis que possam substituir derivados do petróleo. A enzima testada, assim como havia sido observado por outros autores, foi eficiente para produção de biodiesel, neste caso, pela rota etílica. Destaca-se o uso da Novozym 435, como lipase biocatalisadora nos sistemas contínuos, sendo uma alternativa de extrema importância, pois aumenta assim a possibilidade de reaproveitamento deste biocatalisador em outros estudos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao programa BIPPS – UNISC pelo bolsa de mestrado e ao Finep, Fapergs, CNPq e SCT-RS pelo auxílio financeiro.

BIOCATALYTIC METHODS IN THE SUNFLOWER BIODIESEL PRODUCTION BY *Candida antarctica* LIPASE

ABSTRACT: The use of lipases in reactions of transformation of vegetable oil is against the principles of green chemistry, mainly because they are renewable and have a high efficiency and specificity in oleochemical reactions. Among the lipases studied stands out mainly *Candida antarctica* B (Novozym® 435) and being marketed already immobilized in support of acrylic resin, has the advantage of being reused in the reactions. It was possible to optimize a system of transesterification by a continuous process, with which it was possible maximum conversion of substrate (sunflower oil) in ethyl esters, and perform 87 cycles with the same enzyme without reducing the activity and 224 cycles, after the reduction of the activity. The system obtained are adequate to objectives and can be used in absence of organic solvent, it is only need the alcohol excess.

Keywords: lipase, Biodiesel, sunflower oil

Referências

- [1] Ramos, L. P. et al., Química Nova 23 (4), 531-537, **2000**.
- [2] Faber, K. Biotransformations in organic chemistry. 3^o Edition; Springer-Verlog; New York; **1997**.
- [3] Schuchardt, U. et al., 1998 Journal of Brazilian Chemical Society 9, 199-210, **1998**.
- [4] Ramos, L. P. et al. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 31, 28-37, **2003**.
- [5] Marder, F. et al. Tecno-Lógica, 12 (2), 56-64, **2008**.
- [6] Dossat V., Combes D., Marty A.; Enzyme and Microbial Technology, 25 (3-5), 194-200, **1999**.
- [7] Nie K. et al, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 43, (1-4), 142-147, **2006**.
- [8] Kojima S., Park E., Sato M., Kojima S.; Bioresource Technology, 99 (8), 3130-3135, **2008**.
- [9] Ognjanovic, N., et al. Bioresource Technology, 100 (21), 5146-5154, **2009**.
- [10] Porte, A. F. et al., Fuel 89, 3718–3724, **2010**
- [11] Rosset, I.G. et al., Applied. Catalysis. A: Genera., doi:10.1016/j.apcata.2010.10.035, **2010**.
- [12] G. Kafuku, M. Mbarawa Applied Energy, 87, 2561–2565, **2010**.
- [13] Kwanchareon, P., Luengnaruemitchai, A., Jai-In, S., Fuel, 86, 1053–1061, **2007**.