

SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS PROVENIENTE DE ÓLEO DE COCO BRUTO CATALIZADO POR LIPASE *Burkholderia Cepacia* IMOBILIZADA EM AEROGEL MODIFICADO.

César de Almeida Rodrigues (1); Milena Chagas Lisboa (2); Silvana Mattedi (3); Álvaro Silva Lima (4); Cleide Mara Faria Soares (5).

(1), (2), (4), (5), *Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa / Laboratório de pesquisa em Alimentos; Avenida Murilo Dantas, 300; 49032-490; Aracaju; Sergipe; Brasil*

(3) *Universidade Federal da Bahia, Departamento de Engenharia Química*

(1) *cesaralmeidar@gmail.com; (2) milena.chagaslisboa@hotmail.com; (3) smattedis@gmail.com; (4) aslima2001@yahoo.com.br; (5) cleide18@yahoo.com.br;*

Resumo:

A biotecnologia tem atraído bastante atenção nas reações de síntese orgânica, como a de ésteres etílicos devido a aplicação enzimas imobilizadas em suportes projetados com características promissoras, tornando o biocatalisador mais eficiente, podendo substituir os catalisadores químicos obtendo o mesmo produto com menor consumo de energia, estabilidade e permitindo a sua reutilização para aplicações sucessivas na indústria. O biodiesel é uma alternativa energética, por ser um combustível renovável e biodegradável constituído de uma mistura de ésteres etílicos, obtidos da reação de transesterificação do óleo derivado de gordura animal ou vegetal com álcool etílico. Como uma alternativa para diminuir o custo do processo, o uso de óleo sem refino vem atraído bastante atenção por conter menores concentrações de ácidos graxos livres em relação ao óleo reusado. Desta maneira o presente estudo tem como objetivo avaliar a produção de ésteres etílicos utilizando a lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica aerogel (BI-Controle) e em aerogel modificado com líquido iônico (BI-LI) utilizando óleo de coco bruto como fonte de triglicerídeos, avaliar os benefícios da modificação do biocatalisador e a viabilidade do uso do óleo bruto. As reações catalisadas em regime batelada em diferentes tempos em um sistema isento de solvente na razão molar de 1:7 (óleo:álcool), posteriormente purificando e analisado em CG-MS. O melhor tempo reacional foi 144 horas utilizando o BI-LI (60% de conversão). Deste modo a produção de biodiesel por via enzimática do óleo de coco bruto demonstra um potencial promissor a ser investigado com mais afinco passível de otimização.

Palavras-chave: Biodiesel, Lipase, aerogel, líquido iônico.

Introdução

O petróleo é um elemento de influência nas relações geopolíticas contemporâneas desde quando se tornou a matriz energética básica da sociedade industrial e um elemento fundamental para o funcionamento da economia moderna. Considerando-se o petróleo um recurso natural não-renovável,

o biodiesel é uma alternativa energética, por ser um combustível renovável e biodegradável, podendo substituir o diesel mineral sem necessidade de nenhuma modificação nos motores já existentes (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

De modo geral, o biodiesel é um biocombustível oriundo da biomassa ambientalmente correta, constituído de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos da reação de transesterificação do triglicerídeo derivado de gordura animal ou vegetal com um álcool de cadeia curta. (QUESSADA, 2007).

Estima-se que para a produção de biodiesel utilizando óleo de soja como matéria prima, 88% do custo total da produção é proveniente da fonte de triglicerídeos utilizada (HAAS *et al.*, 2006; Di Serio *et al.*, 2005). Desta maneira, a busca por novas opções de matérias-primas é bastante promissora, na qual, o uso de o óleo vegetal bruto destaca-se por apresentar uma baixa quantidade de ácidos graxos livres quando comparados a matéria-prima de resíduos reciclados, que podem causar a saponificação da reação, fazendo-se necessário o uso de uma maior quantidade de catalisador encarecendo o processo (CESARINI *et al.*, 2013).

Pode-se dizer que o processo de síntese de biodiesel por transesterificação é relativamente simples, mas requer rigor com as características das matérias primas, sobretudo se o objetivo for comercializar um biodiesel que efetivamente atenda às exigências legais do país e do mercado internacional. (DANTAS *et al.*, 2006). As condições reacionais de uma conversão de biodiesel abaixo de 98% indicam a presença de impurezas no produto final, como monoglicerídeos (MG), diglicerídeos (DG), triglicerídeos não convertidos, ácidos graxos livres e glicerol. (WAWRZYNIAK *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2008).

O método padrão na indústria para transformar óleo em biodiesel é a transesterificação catalisada por alcalinos. No entanto, alguns problemas foram descritos, como a baixa qualidade do glicerol produzido pela falta de seletividade do catalisador, a necessidade de operações de alto custo para recuperação e purificação do biodiesel e a geração de grandes quantidades de efluentes alcalinos poluentes durante a inativação do catalisador (SANDOVAL *et al.*, 2017).

Para superar esses problemas, os catalisadores químicos podem ser substituídos por catalisadores enzimáticos que são altamente seletivos e podem atuar a temperaturas mais baixas e condições de pressão normal. Essas propriedades permitem um menor consumo de energia do que nos processos

catalisados por produtos químicos e a formação de produtos em rendimentos mais altos, uma vez que não ocorrem reações secundárias indesejáveis. Além disso, em processos catalisados por lipase, podem ser utilizadas matérias-primas de diferentes origens e de baixa qualidade (por exemplo, teor de ácidos, gorduras livres e água). Na presença de gordura, as lipases podem converter ácidos graxos livres em ésteres por esterificação e por transesterificação (NIELSEN *et al.*, 2008). As principais razões pelas quais as lipases ainda não são amplamente utilizadas na indústria são o elevado custo, o tempo de reação mais longo e conseqüentemente menor produtividade, em comparação com os catalisadores alcalinos. Uma estratégia essencial para reduzir o custo do processo enzimático é a reutilização múltipla do biocatalisador que pode ser conseguido através do uso de enzimas imobilizadas. Quando são utilizadas lipases imobilizadas, o fim da reação é facilmente controlado pela remoção do biocatalisador do meio reacional por filtração ou centrifugação e é observada separação de fase de maneira mais fácil devido à ausência de emulsificação. São necessárias menos operações unitárias, ou seja, com uma redução subsequente nos volumes de efluentes gerados (BAJAJ *et al.*, 2010).

Alguns estudos demonstraram que a atividade enzimática de biocatalisadores imobilizados em aerogel modificado com líquido iônico apresentam melhores resultados. Deve-se ressaltar que utilizando líquidos iônicos para a modificação do aerogel permite o aumento dos poros e assim uma subsequente melhora na penetração da lipase em seu interior, e dessa forma tornando possível o aumento da carga enzimática oferecida, permitindo uma melhor eficiência reacional (BARBOSA *et al.*, 2016; LISBOA *et al.*, 2017).

Portanto, o presente estudo tem como objetivo de realizar um estudo preliminar visando a avaliação da produção de ésteres etílicos utilizando a lipase *Burkholderia cepacia* (LBC) imobilizada em sílica aerogel (BI-Controle) e em aerogel modificado com líquido iônico (BI-LI) aplicado em reações de transesterificação em óleo de coco bruto.

Materiais e Métodos

A lipase *Burkholderia cepacia* (LBC) foi adquirida comercialmente da empresa Sigma Co, St. Louis, MO, EUA, com atividade média de 2901,25 U/g enzima (sólido em pH 7,0) e teor de proteína de 0,0725 mg/mg sólido determinados experimentalmente de acordo SOARES *et al.*, (1999) e BRADFORD (1976), respectivamente. O precursor utilizado para a obtenção da sílica foi o tetraetilortossilicato-TEOS ($C_8H_{20}O_4Si$) com pureza de 98%, adquirido da Sigma Aldrich Co

(Milwaukee, WI, EUA), enquanto que o líquido iônico prótico C5 (Pentanoato N-metilmonoetanolamônio), gentilmente cedido pela Dr^a Silvana Mattedi do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal da Bahia. O substrato para a reação de transesterificação para obtenção de ésteres etílicos foi o óleo de coco bruto adquirido na região comercial local e misturado com o etanol. Todos os demais reagentes utilizados são de grau analítico.

- Imobilização da LBC por adsorção física

O biocatalisador imobilizado foi preparado por adsorção física de acordo com BARBOSA *et al.*, (2016), onde 10 ml de hexano foram incubados com 1 g do suporte por 15 min, em seguida adicionando 10ml de solução enzimática por 3 horas. A suspensão enzima:suporte foi incubada por 24 h a 4°C. O biocatalisador foi recuperado por filtração a vácuo e estocado a 4°C.

- Produção de ésteres etílicos por transesterificação

As reações foram catalisadas pela LBC imobilizada em aerogel modificado (BI-LI) e não modificado por líquido iônico (BI-Controle) em regime batelada em diferentes tempos reacionais (12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas). Os experimentos foram conduzidos em frascos hermeticamente fechados imersos em banho termostatzado com agitação a 150 rpm, empregando-se óleo de coco bruto como fonte de triglicerídeos e etanol como álcool na proporção de 1:7 proporcionando 5 g de substrato à 40°C, contendo 20% m/m de biocatalisador em um sistema isento de solvente de acordo com o proposto por OLIVEIRA *et al.*, 2014. Purificando e diluindo as amostras provenientes das reações de transesterificação em regime batelada para a injeção em CG-MS. Ao final da reação a mistura foi centrifugada por 2 minutos para separação do produto. As amostras foram lavadas com solução saturada de NaCl para remoção do glicerol formado. Os ésteres etílicos de ambas as fases (aquosa e orgânica) foram extraídas com Hexano. A fase orgânica foi purificada com Na₂SO₄ anidro. Os ésteres etílicos formados foram analisados por cromatografia gasosa (Shimadzu GC 2010) equipado com o detector de massa GCMS-QP2010 Plus e coluna ZB-5MS. As curvas de calibração foram construídas a partir de ésteres etílicos convencionais usando Heptanoato de metila como padrão interno (250 ppm).

Resultados e Discussão

Na Fig. 1 é demonstrado bateladas de transesterificação do óleo de coco bruto com etanol em tempos reacionais entre 12-144h. Todas as outras possíveis variações de condições reacionais utilizadas como referência (Razão molar, temperatura, carregamento de biocatalizador oferecido) foram mantidas constantes de acordo com OLIVEIRA *et al.*, (2014), visando avaliar o efeito do tempo para depois determinar a possibilidade da variação dos demais fatores.

A partir das conversões demonstradas para cada biocatalisador usado, pode-se observar a melhora na conversão devido a modificação do aerogel com líquido iônico (BI-LI), com valores superiores à do BI-Controle. Desta maneira, pode-se concluir que a modificação tornou o biocatalisador mais eficiente, tornando o sítio ativo mais exposto devido ao aumento da área superficial do suporte, e conseguinte melhora da exposição da interface da lipase com o substrato (BARBOSA *et al.*, 2016).

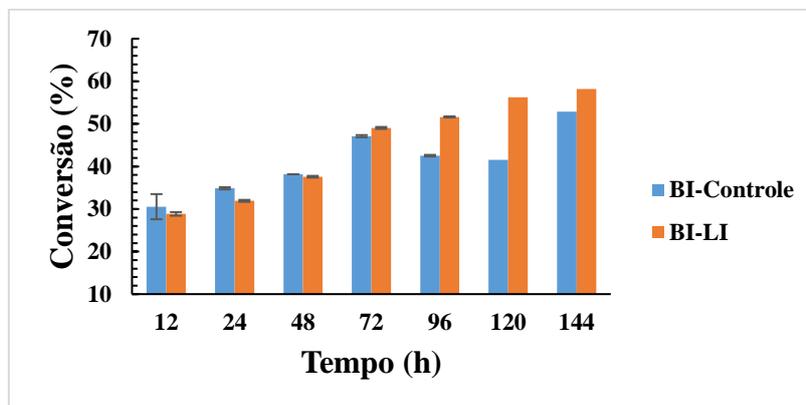


Fig. 1: Conversões de ésteres etílicos em reações de transesterificação em regime batelada com óleo de coco bruto e etanol em diferentes tempos (12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas) utilizando os biocatalisadores imobilizados.

Até o presente momento, não existe dado publicado para a aplicação utilizando óleo de coco bruto. Logo, os dados de conversão exibidos na Fig. 1 serão comparados aos processos que utilizam óleo de coco refinado. Nota-se que a maioria dos estudos utilizaram uma metodologia de superfície de resposta para otimização de seus resultados, abrindo possibilidades para a melhoria dos resultados ilustrados na Fig.1. TUPUFIA *et al.*, (2013) e WOO *et al.*, (2016) utilizaram ultrassom para amplificar os resultados de conversão de ésteres etílicos, onde na reação em batelada (convencional), atingiu uma conversão próxima de 80% enquanto que em meio reacional utilizando ultrassom, foi necessária apenas 3h para atingir 92% de conversão.

A partir desses dados, de fato convém utilizar a ferramenta planejamento experimental para variação dos parâmetros reacionais, para determinar a melhor região de conversão do óleo de coco bruto, para que a mesma possa ter uma faixa de conversão em torno de 98%, que é um valor exigido pela norma para considerar a mistura de ésteres etílicos como biocombustível viável para aplicação industrial.

Conclusões

Para a produção de biodiesel a partir da transesterificação utilizando o BI-LI com mistura etanol/óleo de coco bruto, selecionou o melhor tempo reacional de 144 horas.

Nessas condições obteve-se um teor de ésteres de quase 60% e é possível, observar um rendimento de conversão de ésteres satisfatórios para o período em que se encontra o projeto, tornando promissor a aplicação do BI-LI.

Irão ser feito ajustes nas condições experimentais buscando melhorar a vida operacional otimizando as condições de reação, sendo assim uma opção sustentável, atingindo o grau de pureza exigido pela norma. Uma vez que, a produção enzimática mostrar um grande potencial, se levar em consideração o crescimento econômico no futuro próximo.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro das agências brasileiras de pesquisa CAPES, FAPITEC/SE, FAPESB/SECTI e CNPq (Processos: 160335/2017-5; 306640/2016-3).

Referências

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. v. 62, p. 9–14, 2010.

BARBOSA, A. S., LISBOA, J. A., SILVA, M. A., CARVALHO, N. B., PEREIRA, M. M., FRICKS, A. T., SOARES, C. M. The novel mesoporous silica aerogel modified with protic ionic liquid for lipase immobilization. Química Nova, v. 39, n. 4, p. 415-422, 2016.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CESARINI S.; DIAZ P.; NIELSEN P. M. Exploring a New, Soluble Lipase for FAMES Production in Water-Containing Systems Using Crude Soybean Oil as a Feedstock. *Process Biochemistry*, 48(3), p. 484–87, 2013.

DANTAS, M. B.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, F. C.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G. Obtenção de Biodiesel através da Transesterificação do Óleo de Milho: Conversão em Ésteres Etfílicos e Biodiesel BR, v. 1, p. 236–240, 2006.

DI SERIO, M., TESSER, R., DIMICCOLI, M., CAMMAROTA, F., NASTASI, M., & SANTACESARIA, E. (2005). Synthesis of biodiesel via homogeneous Lewis acid catalyst. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 239(1-2), 111-115

FREITAS, L., SANTOS, J. C., BARCZA, M. V., & DE CASTRO, H. F. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel: síntese enzimática de monolaurina por esterificação. *Quim. Nova*, v. 32, n. 9, p. 2277-2281, 2009.

HAAS, M. J., MCALOON, A. J., YEE, W. C., & FOGLIA, T. A. (2006). A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresource technology*, 97(4), 671-678.

LISBOA MC, RODRIGUES CA, BARBOSA AS, MENDONCA FMR, MATTEDI S, MENDES AA, DARIVA C, FRANCESCHI E, LIMA AS, SOARES CMF, Isotherm adsorption studies in the immobilization of lipase from Burkholderia cepacia on chemically modified silica aerogel particles. In: XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos e XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Aracaju. v. 2, 2017.

MONTEIRO, M.R.; AMBROZIN, A.R.P.; LIÃO, L.M.; FERREIRA, A.G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta*, 77(2), p. 593-605, 2008.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 110, n. 8, p. 692–700, 2008.

OLIVEIRA D. S., FONSECA X. D. FARIAS S, P. N., BEZERRA V. S., PINTO C. H. C., SOUZA L. D., SANTOS A. G. D., MATIAS L. G. O. Obtenção do biodiesel através da transesterificação do óleo de moringa oleífera lam. *HOLOS*, Ano 28, Vol 1, 2012.

OLIVEIRA, M.V.S.; DA RÓS, P. C. M.; MATTEDI, S.; DE CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; LIMA, Á.S. Transesterification of babassu oil catalyzed by *Burkholderia cepacia* encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive. *Acta Scientiarum. Technology*, 36(3), 2014.

QUESSADA, T. P.; Obtenção de Biodiesel a partir de óleo de Soja e Milho Utilizando Catalisadores Básicos e Ácido. Londrina-PR. 2007.

SANDOVAL, G.; CASAS-GODOY, L.; BONET-RAGEL, K.; RODRIGUES, J.; FERREIRA-DIAS, S.; VALERO, F. Enzyme-Catalyzed Production of Biodiesel as Alternative to Chemical-Catalyzed Processes: Advantages and Constraints. *Current Biochemical Engineering*, v. 4, n. 2, 2017.

SOARES, C. M., DE CASTRO, H. F., DE MORAES, F. F., & ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 79, n. 1, p. 745-757, 1999.

TUPUFIA, S.C.; JEON, Y. J.; MARQUIS, C.; ADESINA, A. A.; ROGERS, P. L. Enzymatic conversion of coconut oil for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*, 106, p. 721-726, 2013.

WAWRZYNIAK, R.; WASIAK, W.; FRACKOWIAK, M. Determination of methyl esters in diesel oils by gas chromatography-validation of the method. *Chemical Papers-Slovak Academy of Sciences*, 59 (6B), p. 449, 2005.

WOO, C.; KOOK, S.; HAWKES, E. R.; ROGERS, P. L.; MARQUIS, C. Dependency of engine combustion on blending ratio variations of lipase-catalysed coconut oil biodiesel and petroleum diesel. *Fuel*, 169, p.146-157, 2016.