

## ESTUDO DO COMPORTAMENTO DA LIPASE COMERCIAL LIPOZYME RM IM EM REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE BIODIESEL

**Erika C. G. Aguiéiras\***

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, 21949-909 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

**Susana L. Souza e Marta A. P. Langone**

Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, 20550-013 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 14/6/12; aceito em 29/11/12; publicado na web em 28/2/13

STUDY OF IMMOBILIZED LIPASE LIPOZYME RM IM IN ESTERIFICATION REACTIONS FOR BIODIESEL SYNTHESIS.

The aim of this work was to study monoalkyl ester synthesis catalyzed by immobilized lipase Lipozyme RM IM via the esterification reaction. Yields of over 90% were obtained with butanol in esterification reactions with oleic acid. In the reactions with deodorizer distillates of vegetable oils and butanol, the conversion obtained was greater than 80% after 2.5 h. For the esterification reaction of palm fatty acid deodorizer distillate (PFAD) and butanol, seven reuse cycles of Lipozyme RM IM were carried out and the final conversion was 42% lower than the initial conversion.

Keywords: lipase; monoalkyl esters; biodiesel.

### INTRODUÇÃO

Atualmente a demanda energética mundial é suprida principalmente por fontes não renováveis como petróleo, carvão e gás natural.<sup>1</sup> Entretanto, questões econômicas e ambientais relacionadas à emissão de gases de efeito estufa, aumento nos preços e esgotamento das reservas de combustíveis fósseis têm motivado a pesquisa por rotas alternativas de energia em substituição às fontes fósseis. Nesse contexto, a produção de biodiesel vem recebendo destaque como uma alternativa promissora em substituição ao diesel fóssil e se tornando prioridade nas estratégias de políticas energéticas a nível nacional e global.<sup>2</sup> O biodiesel é constituído por uma mistura de ésteres monoalquílicos obtida a partir de óleos vegetais ou gordura animal e é caracterizado por ser um biocombustível atóxico e biodegradável.<sup>3</sup> As propriedades físicas e químicas do biodiesel são similares às do diesel de petróleo e sua queima resulta em menor emissão de materiais particulados, CO, hidrocarbonetos aromáticos e SO<sub>x</sub>.<sup>4</sup>

A rota convencional de produção de biodiesel consiste na transesterificação de óleos vegetais com metanol ou etanol por catálise homogênea alcalina (NaOH ou KOH), com geração de glicerol como subproduto.<sup>1</sup> Esse processo apresenta algumas desvantagens como: dificuldades de recuperação do glicerol e do catalisador, necessidade de tratamento dos efluentes alcalinos gerados e grande quantidade de água requerida nas etapas de purificação do produto. Além disso, os óleos vegetais utilizados no processo devem conter baixos teores de ácidos graxos livres (< 0,5%) para evitar a formação de sabões, que aumentam a viscosidade do produto e dificultam ainda mais as etapas de purificação do biodiesel.<sup>5,6</sup> Desta forma, o custo associado aos óleos refinados utilizados no processo é relativamente alto, respondendo por 70 a 80% do preço final do biodiesel, o que dificulta sua competitividade no mercado frente ao diesel fóssil.<sup>4,6</sup>

Como alternativa ao processo convencional, diversos trabalhos vêm investigando a possibilidade do emprego de matérias-primas de baixo custo com altos teores de ácidos graxos livres para a síntese de ésteres monoalquílicos em reações de esterificação com formação de

água como subproduto.<sup>6-9</sup> Dentre as matérias-primas com potencial aplicação para a síntese de ésteres monoalquílicos, destacam-se os destilados de desodorização provenientes do refino de óleos vegetais (DDOs). O aumento da demanda mundial por óleos vegetais refinados tem resultado em um grande volume desses subprodutos. Dessa forma, é de suma importância o estudo de rotas para mitigação dos impactos negativos decorrentes do descarte desses resíduos no meio ambiente, a partir do aproveitamento de seus constituintes para a geração de coprodutos de maior valor agregado.<sup>10</sup>

Os destilados de desodorização, além de ricos em compostos de alto valor agregado como tocoferóis, squaleno e esteróis, também possuem grandes quantidades de ácidos graxos livres que podem ser convertidos em ésteres monoalquílicos (biodiesel).<sup>7,11</sup> Nesse caso, o emprego de lipases (triacilglicerol éster hidrolases - EC 3.1.1.3), que são capazes de catalisar as reações de transesterificação dos triacilgliceróis e de esterificação dos ácidos graxos livres presentes na matéria-prima, é ideal. A utilização desses biocatalisadores permite que as reações sejam conduzidas em condições reacionais brandas de temperatura e pressão e resulta em menor geração de produtos secundários e efluentes, uma vez que lipases são catalisadores altamente seletivos.<sup>4,12</sup> Além disso, a utilização de lipases imobilizadas oferece a vantagem de separação e recuperação do catalisador no fim do processo e sua posterior reutilização.

Dessa forma, o aproveitamento dos DDOs para a síntese enzimática de biodiesel possibilita reduzir os custos da produção desse biocombustível, devido à utilização de uma matéria-prima barata, agrega valor ao resíduo e possibilita produzir biodiesel através de uma tecnologia “limpa” e ambientalmente compatível.

Esse trabalho teve como objetivo investigar a síntese enzimática de ésteres monoalquílicos a partir de reações de esterificação entre os destilados de desodorização dos óleos de soja (DDOS) e de palma (DDOP) com alcoóis de cadeia curta. As matérias-primas utilizadas foram escolhidas por se tratarem de resíduos de grande disponibilidade no país, uma vez que o Brasil se encontra entre os maiores produtores mundiais de óleo de soja e de palma. Além disso, o comportamento da lipase comercial empregada, Lipozyme RM IM, frente a alguns parâmetros reacionais, como seletividade em relação

\*e-mail: erikaaguieiras@gmail.com

ao álcool e aos ácidos graxos predominantes no DDOS e no DDOP e concentração de biocatalisador, também foi avaliado. A influência do tamanho da cadeia do álcool na estabilidade da lipase foi investigada a partir da reutilização do biocatalisador em reações de esterificação entre os alcoóis etanol e butanol com os ácidos oleico e palmítico e com os subprodutos DDOS e DDOP.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiais

O destilado de desodorização do óleo de soja (DDOS) e o destilado de desodorização do óleo de palma (DDOP), provenientes do refino destes óleos, foram cedidos pela Piraquê S.A. (Brasil). A lipase comercial Lipozyme RM IM (lipase 1,3 específica de *Mucor miehei*, imobilizada em resina de troca iônica) foi gentilmente doada pela Novozymes Latin America Ltda. (Araucária, PR, Brasil). A atividade de esterificação da enzima foi de 1909  $\mu\text{mol}$  de ácido/min g de enzima, determinada de acordo com o método descrito em Corrêa *et al.*<sup>13</sup> Ácido oleico extra puro, ácido palmítico P.A., butanol P.A., hexano P.A. e etanol P.A. foram obtidos da Merck (SP, Brasil). Hidróxido de sódio P.A., ácido esteárico puro e acetona P.A. foram obtidos da Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, Brasil).

### Caracterização dos subprodutos DDOS e DDOP

A caracterização das matérias-primas foi feita de acordo com as metodologias oficiais da AOCS.<sup>14</sup> A determinação da acidez e do índice de acidez foi realizada de acordo com o método Te 1a-64. As análises de índice de iodo e de umidade foram feitas conforme os métodos Cd 1d-92 e Ca 2e-84, respectivamente. A análise da composição química em ácidos graxos presentes nos subprodutos DDOS e DDOP foi realizada por cromatografia em fase gasosa segundo o método Ce 1f-96, utilizando um cromatógrafo 6890N a gás com detector tipo ionização de chama (FID) e coluna capilar SP 2340 (60 m x 0,25 mm de interno).

### Reação de esterificação

As reações de esterificação foram conduzidas em reator batelada fechado, com capacidade de 15 mL, provido de condensador e de agitação magnética. O sistema reacional consistiu na mistura dos reagentes e da enzima imobilizada. A temperatura do meio reacional foi mantida constante através da circulação de etileno glicol pela camisa do reator. O progresso das reações foi acompanhado através de titulometria de neutralização ou cromatografia em fase gasosa.

### Reação de esterificação com os ácidos graxos puros

#### *Efeitos do tipo de ácido graxo*

As reações de esterificação entre os ácidos graxos (ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico) e etanol foram conduzidas a 80 °C para completa fusão dos ácidos saturados, com teor de lipase de 3% (m/m), na razão molar dos reagentes igual a 1 e com o etanol adicionado em três etapas (0, 30 e 60 min). O acompanhamento das reações foi feito por titulometria de neutralização para determinação do consumo de ácidos graxos no meio.

#### *Efeitos do tipo de álcool e da concentração de biocatalisador*

Os efeitos da concentração de Lipozyme RM IM (1,5; 3; 5; 7 e 9 %/m/m) e do tipo de álcool (etanol e butanol) nas reações de esterificação com os ácidos palmítico e oleico foram investigados empregando-se razão estequiométrica dos reagentes (razão molar

ácido graxo/álcool = 1). As reações com ácido oleico foram conduzidas a 40 °C e com ácido palmítico a 70 °C. O acompanhamento das reações foi feito por cromatografia em fase gasosa.

#### *Reutilização da lipase Lipozyme RM IM*

As reações de reutilização da lipase comercial Lipozyme RM IM foram conduzidas com teor de lipase de 3% (m/m), razão estequiométrica dos reagentes (razão molar ácido graxo/álcool = 1), a 40 ou a 70 °C para os ácidos oleico e palmítico, respectivamente. Ao término de cada batelada, a enzima foi inicialmente separada do meio reacional por decantação, lavada com 10 mL de hexano e filtrada a vácuo. A enzima recuperada foi mantida em dessecador durante 24 h para secagem e, então, reutilizada em uma nova reação em batelada.

### Reação de esterificação com o destilado de desodorização do óleo vegetal (DDOS e DDOP)

#### *Efeitos do tipo de álcool*

As reações de esterificação para síntese de biodiesel foram conduzidas com 1,75 g de etanol ou 2,63 g de butanol adicionados de forma escalonada (0 e 30 min), 8 g de DDOS ou DDOP, a 50 e 60 °C, respectivamente. O teor de Lipozyme RM IM empregado foi de 3% (m/m). O acompanhamento das reações foi feito por titulometria de neutralização para determinação do consumo de ácidos graxos no meio.

#### *Reutilização da lipase Lipozyme RM IM*

As reações de reutilização da lipase comercial Lipozyme RM IM na esterificação dos ácidos graxos livres presentes no DDOS e DDOP foram conduzidas com 8 g de DDO, adição do álcool em 2 etapas ( $t = 0$  e 30 min), 3% (m/m) de Lipozyme RM IM a 50 e 60 °C para DDOS e DDOP, respectivamente. Após cada reação em batelada, a lipase foi recuperada do meio reacional, lavada com 10 mL de hexano e filtrada a vácuo. A enzima recuperada foi mantida em dessecador durante 24 h para secagem e, então, reutilizada em uma nova reação em batelada.

### Titulometria de neutralização

O progresso das reações de produção de biodiesel a partir de DDOS e DDOP foi acompanhado a partir da quantificação dos ácidos graxos livres presentes no meio reacional. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do meio reacional, em duplicata, foram dissolvidas em 40 mL de acetona/etanol 1:2 e tituladas contra uma solução de NaOH a 0,02 mol L<sup>-1</sup>, empregando-se titulador automático Mettler modelo DL25.

### Análise cromatográfica

O progresso das reações de esterificação dos ácidos oleico e palmítico com os alcoóis etanol e butanol foi acompanhado por cromatografia gasosa a partir da análise de amostras do meio reacional (20 mL, em duplicata) coletadas ao longo do processo. A quantificação foi realizada em cromatógrafo a gás Varian, modelo CP 3380, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar CP WAX 52 CB de 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  a partir da metodologia descrita por Vieira *et al.*<sup>15</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização dos subprodutos DDOS e DDOP

Os resultados de composição química em relação aos resíduos de ácidos graxos presentes nas matérias-primas utilizadas estão apresentados na Tabela 1. No DDOS, pode ser observada predominância

dos ácidos oleico (24%), palmítico (31%) e esteárico (24%). Já no DDOP foi observado um maior percentual de ácido palmítico (46%), seguido dos ácidos oleico (37%) e linoleico (9%).

**Tabela 1.** Composição em ácido graxos do DDOS e DDOP

Ácido graxo	DDOS (%)	DDOP (%)
Ácido caprílico (C8)	-	-
Ácido cáprico (C10)	0,1	0,1
Ácido láurico (C12)	0,1	0,3
Ácido mirfístico (C14)	0,7	0,9
Ácido palmítico (C16)	<b>31</b>	<b>46</b>
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,2	0,3
Ácido esteárico (C18)	<b>24</b>	6
Ácido oleico (C18:1)	<b>24</b>	<b>37</b>
Ácido linoleico (C18:2)	6	<b>9</b>
Ácido linolênico (C18:3)	0,3	0,3
Ácido araquídico (C20)	0,4	0,3
Ácido gadoleico (C20:1)	-	0,1
Ácido be-hênico (C22)	0,3	-
Ácido lignocérico (C24)	-	-
Outros ácidos graxos	1	0,1
Ácidos graxos saturados	56	53
Ácidos graxos monoinsaturados	24	37
Ácidos graxos poli-insaturados	7	10
Total isômero <i>trans</i>	12	0,2

De acordo com os resultados obtidos, as matérias-primas utilizadas apresentam composição de ácidos graxos interessante para a obtenção de ésteres monoalquílicos para aplicação como biodiesel, com presença de ácidos graxos saturados e monoinsaturados em proporções equilibradas, como observado pela análise de composição química.

Os resultados das análises de determinação da acidez, do índice de acidez, do índice de iodo e da umidade no DDOS e DDOP estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Análise físico-química do DDOS e DDOP

Análise	DDOS	DDOP
Acidez (% ácido oleico)	72,6	96,3
Índice de acidez (mg KOH/g amostra)	144,4	191,5
Índice de iodo (% do iodo absorvido)	58,8	63,8
Umidade (% m/m)	0,17	0,70

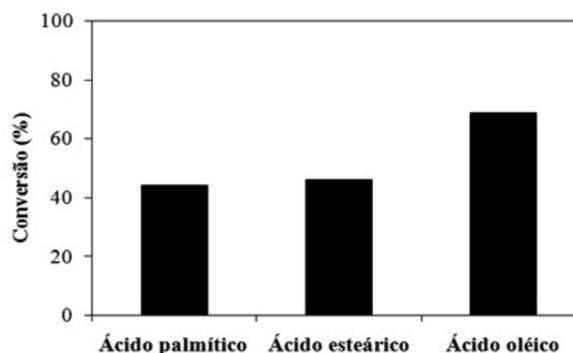
Pode ser observado que ambos, DDOS e DDOP, apresentaram acidez elevada, podendo ser utilizados para obtenção de ésteres monoalquílicos a partir de reações de esterificação. O índice de iodo, indicativo do grau de insaturação nas moléculas, apresentou valores similares para ambas as matérias-primas. É reconhecido que, quanto maior for o grau de insaturação do biodiesel, menor será a sua estabilidade oxidativa, acarretando em polimerização e formação de depósitos de "goma", o que prejudica as aplicações industriais do biocombustível.<sup>16</sup> Entretanto, cabe ressaltar que, de acordo com a resolução nº 14 da ANP, de 11/05/2012, não existe um limite de índice de iodo máximo especificado.

O teor de água na matéria-prima desempenha papel importante em reações de esterificação catalisadas por lípases, uma vez que essas enzimas requerem uma interface óleo-água para que ocorram as mudanças conformacionais da molécula necessárias para a exposição e reestruturação do sítio ativo.<sup>17</sup> Por outro lado, um excesso de água no meio pode promover a reação reversa de hidrólise dos produtos formados. No caso das reações de síntese de biodiesel a partir de matérias-primas com altos teores de ácidos graxos livres, as taxas de conversão são favorecidas quando um menor teor de água

está presente no meio. Os resultados obtidos mostram que ambas as matérias-primas apresentaram baixos teores de água (inferiores a 1%), o que é interessante para aplicação em reações de esterificação.

### Efeitos do tipo de ácido graxo

Tendo em vista a composição dos subprodutos DDOS e DDOP, o efeito do tipo de ácido graxo foi avaliado em reações de esterificação entre os ácidos graxos de maior predominância nos destilados de desodorização (oleico C18:1, palmítico C16 e esteárico C18) e etanol. Os resultados estão apresentados na Figura 1, onde é possível observar que a lipase Lipozyme RM IM exibiu preferência pelo ácido graxo insaturado (69% de conversão). A conversão dos ácidos graxos saturados foi praticamente igual (44 e 46% para os ácidos palmítico e esteárico, respectivamente).



**Figura 1.** Efeito do tipo de ácido graxo na conversão em ésteres após 2,5 h de reação dos ácidos graxos com etanol, adicionado em três etapas (0,46 g a cada 30 min), razão estequiométrica dos reagentes ( $R = 1$ ), a 80 °C, com 3% (m/m) de lipase. Conversão determinada por titulometria de neutralização

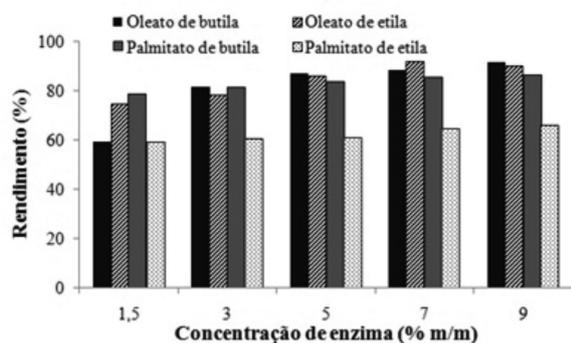
### Reações de esterificação entre os ácidos oleico e palmítico: efeitos do tipo de álcool e da concentração de biocatalisador

Os ácidos oleico e palmítico foram escolhidos para o estudo do comportamento da lipase Lipozyme RM IM frente a alguns parâmetros reacionais por serem os ácidos predominantes nas matérias-primas (DDOS e DDOP). Os alcoóis selecionados foram etanol, devido à sua obtenção a partir da biomassa e sua ampla disponibilidade no Brasil, e butanol, por ser menos polar e promover menor desativação da enzima durante a reação de síntese dos ésteres alquílicos.<sup>6,8,18</sup>

Como mostrado na Figura 2, o efeito da concentração de enzima sobre o rendimento foi positivo para as sínteses dos ésteres de ácido oleico, como esperado. Embora o aumento da concentração de 3 para 9% (m/m) tenha promovido aumento nas taxas iniciais das reações, após 2 h de reação os rendimentos obtidos foram próximos. Dessa forma, o aumento no teor de Lipozyme RM IM não justificaria o emprego dessa grande quantidade de lipase. Para os ésteres de ácido palmítico, o aumento da concentração de lipase de 3 para 9% (m/m) promoveu aumento de apenas 5% no rendimento após 2 h de reação. Com relação ao tipo de álcool, observou-se que as menores conversões foram obtidas nas reações com ácido palmítico e etanol, o que pode ser atribuído aos efeitos sinérgicos da maior temperatura (70 °C) e do álcool mais polar sobre o biocatalisador. A concentração de 3% (m/m) foi escolhida para os ensaios posteriores de reutilização da enzima.

### Reutilização da lipase nas reações com ácido oleico ou palmítico com etanol ou butanol

Considerando-se que uma das grandes desvantagens da catálise enzimática é o custo do biocatalisador, a reutilização da Lipozyme



**Figura 2.** Efeito da concentração de Lipozyme RM IM no rendimento em éster após 2 h de reação na síntese de oleato de butila e de etila (a 40 °C) e de palmitato de butila e de etila (a 70 °C), empregando razão estequiométrica dos reagentes ( $R = 1$ ). Rendimento determinado por cromatografia em fase gasosa

RM IM foi estudada nas reações de síntese dos ésteres monoalquílicos derivados dos ácidos palmítico e oleico com os alcoóis etanol e butanol. Os resultados estão apresentados na Figura 3, onde se pode observar que rendimentos superiores a 80% foram obtidos até a 7ª reação em batelada com ácido oleico e butanol. Na 10ª reutilização, o rendimento obtido após 2,5 h de reação foi 68% do rendimento obtido na 1ª reação em batelada. Portanto, a estabilidade operacional da lipase comercial Lipozyme RM IM foi elevada para a síntese de oleato de butila. No entanto, quando o álcool empregado foi etanol, observou-se uma queda contínua no rendimento com o número de reutilizações, sendo o rendimento da 10ª reutilização igual a apenas 10% do rendimento na 1ª reação em batelada.



**Figura 3.** Reutilização da lipase Lipozyme RM IM nas reações de síntese de oleato de butila e de etila (a 40 °C) e de palmitato de butila e de etila (a 70 °C), empregando razão estequiométrica dos reagentes ( $R = 1$ ) e 3% (m/m) de enzima. Rendimento determinado por cromatografia em fase gasosa

Segundo Al-Zuhairat *et al.*,<sup>19</sup> a principal desvantagem do emprego de alcoóis de cadeia curta em reações de esterificação catalisadas por lipases é a inativação da enzima causada por esses substratos. De acordo com os autores, a inibição da enzima pelo álcool afeta diretamente a possibilidade de reutilização do biocatalisador. Além dos efeitos diretos do álcool sobre a lipase, fenômenos de dissociação e dissolução do suporte no meio na presença do álcool também estão relacionados à perda de atividade do biocatalisador imobilizado.<sup>20</sup>

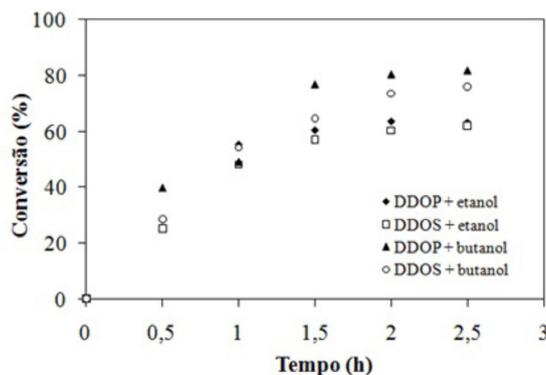
Para as sínteses conduzidas com ácido palmítico, o decréscimo no rendimento das reações foi mais evidente. O rendimento alcançado na 1ª reutilização da lipase na síntese de palmitato de butila foi de apenas 26% do rendimento obtido na 1ª batelada (83%). Para a síntese de palmitato de etila não foi observada formação de éster após a 1ª reação em batelada. A eficácia da enzima decaiu na 2ª batelada (1ª reutilização), o que pode ser atribuído à perda de atividade catalítica

da enzima devido aos efeitos combinados da exposição ao etanol e à alta temperatura (70 °C).

Watanabe *et al.*<sup>21</sup> investigaram a reação de esterificação de ácidos graxos presentes no óleo residual de atum com metanol empregando Novozym 435 como catalisador. Após 4 reutilizações da enzima, foram obtidas reduções maiores nas conversões a 50 °C em relação às atingidas nas temperaturas menores (20, 30 e 40 °C), devido ao sinergismo entre os efeitos do metanol e da temperatura sobre a lipase. Resultados semelhantes foram obtidos por Ghamgui *et al.*<sup>22</sup> na síntese de oleato de butila catalisada pela lipase imobilizada de *Rhizopus oryzae*. A reação forneceu 73% de rendimento por 6 utilizações consecutivas. O declínio na atividade da enzima após o 7º experimento em batelada foi atribuído à dissociação da enzima do seu suporte, após usos repetidos.

### Reações de esterificação com DDOS ou DDOP e etanol ou butanol

A lipase comercial Lipozyme RM IM foi utilizada em reações de esterificação dos ácidos graxos presentes nos DDOs com os alcoóis etanol e butanol. Baseado em resultados de trabalhos anteriores, o álcool foi adicionado no meio em etapas para evitar os efeitos de desativação do mesmo sobre a enzima.<sup>9</sup> Os resultados foram expressos em termos de conversão dos ácidos graxos livres e, de acordo com os dados apresentados na Figura 4, pode-se observar que as curvas de conversão dos ácidos graxos com o tempo apresentaram perfis semelhantes para os substratos utilizados como matéria-prima. Quando o álcool utilizado foi butanol foram obtidas conversões de 82 e 76% para DDOP e DDOS, respectivamente. Cabe ressaltar que as conversões foram obtidas em tempos curtos de reação (2,5 h). O emprego de etanol promoveu menores conversões (63%) para ambas as matérias-primas, resultados similares aos obtidos por Souza *et al.*<sup>9</sup> e Corrêa *et al.*<sup>13</sup>



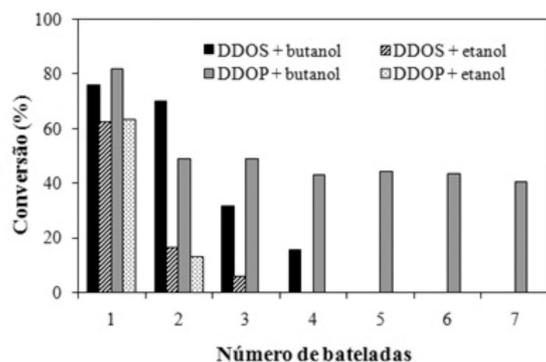
**Figura 4.** Conversão dos ácidos graxos em função do tempo nas reações de esterificação de 8 g de DDOS e DDOP, com 1,75 g de etanol ou 2,63 g de butanol adicionado em duas etapas (0 e 30 min), 3% (m/m) de Lipozyme RM IM a 50 ou 60 °C para DDOS e DDOP, respectivamente. Conversão determinada por titulometria de neutralização

Wang *et al.*<sup>7</sup> utilizaram uma mistura de Novozym 435 e Lipozyme TL IM na metanólise do destilado DDOS e obtiveram 84% de ésteres metílicos após 12 h de reação. Du *et al.*<sup>23</sup> obtiveram 95% de rendimento após 10 h na metanólise do DDOS catalisada pela Novozym 435.

### Reutilização da lipase comercial

A reutilização da lipase Lipozyme RM IM também foi avaliada nas reações de esterificação dos ácidos graxos livres presentes no DDOS e DDOP com etanol e butanol. Os resultados estão

apresentados na Figura 5. Na 1ª reação com etanol, foram obtidos 62% de conversão dos ácidos graxos presentes no DDOS, sendo observada redução para 6% de conversão após a 2ª reutilização da lipase. Nas reações com butanol, a conversão em ésteres butílicos obtida na 1ª reação foi superior a 75%, com redução nas conversões ao longo das reutilizações da lipase. Após a 3ª reutilização, foram obtidas conversões de 16%. Foram encontrados resultados similares nas reações entre DDOP e butanol, com conversão de 82% na 1ª reação e de 40% após a 7ª reutilização. No entanto, quando etanol foi empregado a conversão reduziu de 63 para 13% na 1ª reutilização da lipase.



**Figura 5.** Reutilização da lipase Lipozyme RM IM nas reações de esterificação do DDOS (50 °C) e DDOP (60 °C) com 1,75 g de etanol ou 2,63 g de butanol adicionado em duas etapas (0 e 30 min) e 3% (m/m) de enzima. Conversão determinada por titulometria de neutralização

Os resultados evidenciaram mais uma vez os efeitos de desativação pelo álcool de cadeia mais curta sobre a lipase. Além disso, nas reações com DDOP e butanol, a lipase pôde ser reutilizada mais vezes em relação às reações conduzidas com DDOS e butanol. Esses resultados podem estar relacionados à composição química do DDOP, que apresenta um maior percentual de ácidos graxos insaturados em relação ao DDOS (Tabela 1). Assim como observado nas reações de reutilização da lipase com os ácidos oleico e palmítico, em que foi possível reutilizar a enzima por mais ciclos nas reações com ácido oleico, a presença de um maior teor desses ácidos insaturados no DDOP também proporcionou a reutilização da lipase por mais ciclos.

Li et al.<sup>24</sup> reportaram que a lipase imobilizada de *Penicillium expansum* manteve 68% de atividade residual após 10 reações em batelada entre óleo residual de acidez elevada (27% de acidez) e metanol. A estabilidade da lipase foi maior no óleo residual em relação ao óleo refinado, o que foi atribuído ao fato do álcool ser mais solúvel em ácidos graxos, o que reduz sua concentração no microambiente da lipase. A reutilização das lipases imobilizadas Lipozyme TL IM e Novozym 435 na reação de alcoólise do destilado de desodorização de óleo de soja (DDOS) com metanol a 40 °C foi investigada por Wang et al.<sup>7</sup> Após 120 ciclos (60 dias) não foi observada variação significativa no rendimento em ésteres metílicos. No entanto, todas as reações foram conduzidas na presença de *t*-butanol. Segundo os autores, a presença de *t*-butanol aumentou a solubilidade do metanol na mistura reacional, fazendo com que a lipase mantivesse elevada atividade mesmo na presença do substrato polar (metanol).

## CONCLUSÕES

Neste trabalho foi estudada a síntese de ésteres monoalquílicos

(biodiesel) a partir de reações de esterificação catalisadas pela lipase comercial Lipozyme RM IM. Após 2 h de reação, rendimentos superiores a 90% foram obtidos nas sínteses de oleato de etila e butila. A enzima manteve 68% do rendimento obtido na 1ª reação em batelada após 10 reutilizações nas sínteses de oleato de butila. Nas reações de esterificação dos ácidos graxos presentes nos destilados de desodorização dos óleos de soja e palma foram obtidas conversões superiores a 75% após 2,5 h quando foi utilizado butanol e de 63% quando o álcool empregado foi etanol. A enzima foi mais estável e manteve-se mais ativa nas reações com DDOP. A maior estabilidade da enzima nas reações com ácidos graxos puros em relação às reações com os resíduos (DDOS e DDOP) pode estar relacionada à presença de componentes nos resíduos que podem promover em alguma extensão a inibição do biocatalisador.

## REFERÊNCIAS

- Jegannathan, K. R.; Eng-Seng, C.; Ravindra, P.; *Ren. Sust. Energy Rev.* **2011**, *15*, 745.
- Bajaj, A.; Lohan, P.; Jha, P. N.; Mehrotra, R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *62*, 9.
- Tan, T.; Lu, J.; Nie, K.; Deng, L.; Wang, F.; *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 628.
- Robles-Medina, A.; González-Moreno, P. A.; Esteban-Cerdán, L.; Molina-Grima, E.; *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 398.
- Marchetti, J. M.; Miguel, V. U.; Errazu, A. F.; *Ren. Sust. Energy Rev.* **2007**, *11*, 1300.
- Talukder, Md. M. R.; Wu, J. C.; Nguyen, T. B. V.; Fen, N. M.; Melissa, Y. L. S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *60*, 106.
- Wang, L.; Du, W.; Liu, D.; Li, L.; Dai, N.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *43*, 29.
- Shimada, Y.; Watanabe, Y.; Sugihara, A.; Tominaga, Y.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *17*, 133.
- Souza, M. S.; Aguiéiras, E. C. G.; Silva, M. A. P.; Langone, M. A. P.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *154*, 253.
- Dumont, M. J.; Narine, S. S.; *Food Res. Int.* **2007**, *40*, 957.
- Gunawan, S.; Kasim, N. S.; Ju, Y. H.; *Sep. Purif. Technol.* **2008**, *60*, 128.
- Castro, H. F.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 146.
- Corrêa, I. N. S.; Souza, S. L.; Catran, M.; Bernardes, O. L.; Portilho, M. F.; Langone, M. A. P.; *Enzyme Research* **2011**, *2011*, 1.
- Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*; AOCS: Champaign, 5<sup>th</sup> ed., 1998.
- Vieira, A. P. A.; Silva, M. A. P.; Langone, M. A. P.; *Lat. Am. Appl. Res.* **2006**, *36*, 283.
- Knothe, G.; *Fuel Process. Technol.* **2007**, *88*, 669.
- Noureddini, H.; Gao, X.; Philkana, R. S.; *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 769.
- Antczak, M. S.; Kubiak, A.; Antczak, T.; Bielecki, S.; *Ren. Energy* **2009**, *34*, 1185.
- Al-Zuhair, S.; Jayaraman, K. V.; Krishnan, S.; Chan, W.; *Biochem. Eng. J.* **2006**, *30*, 212.
- José, C.; Bonetto, R. D.; Gambaro, L. A.; Torres, P. G.; Foresti, M. L.; Ferreira, M. L.; Briand, L. E.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *71*, 95.
- Watanabe, Y.; Shimada, Y.; Baba, T.; Ohyagi, N.; Moriyama, S.; Terai, T.; Tominaga, Y.; Sugihara, A.; *J. Oleo Sci.* **2002**, *51*, 655.
- Ghamgui, H.; Karra-Chaabouni, M.; Gargouri, Y.; *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 355.
- Du, W.; Wang, L.; Liu, D.; *Green Chem.* **2007**, *9*, 173.
- Li, N. W.; Zong, M. H.; Wu, H.; *Process Biochem.* **2009**, *44*, 685.