



PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR BIOCATALÍSE UTILIZANDO MÉTODO ALTERNATIVO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EM HIDROGEL

Fernanda Marder, Mariéli Milanese Celin, Mariele da Silva Mazuim, Rosana de Cassia de Souza Schneider, Marilda Teixeira Macagnan, Valeriano Antônio Corbellini*

Departamento de Química e Física – Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC – RS

*E-mail: valer@unisc.br

Recebido em 12 de setembro de 2008.

Aceito em 30 de dezembro de 2008.

Resumo

A sociedade vem buscando alternativas para reduzir o processo de destruição ambiental instalada no planeta, porém, a partir do século passado, uma nova visão sobre o uso indiscriminado dos recursos ambientais passou a ser discutido levando a utilização de tecnologias alternativas de produção de combustíveis mais limpos, como o biodiesel, produzido a partir de óleos vegetais. Os processos enzimáticos constituem-se numa alternativa de produção, por serem métodos biotecnológicos e menos impactantes ao meio ambiente, apresentando até então, elevado custo de produção. Com o objetivo de diminuir custos e aumentar a eficiência investigou-se a imobilização das enzimas por método alternativo e o emprego destes biocatalisadores na produção de biodiesel. A imobilização da lipase PS Amano foi realizada utilizando esferas formadas pela hidratação de hidrogéis comerciais em solução aquosa contendo a enzima. Com a enzima imobilizada realizou-se a transesterificação, na qual obteve-se conversões em ésteres metílicos com rendimento de até 70%, em solvente orgânico, no tempo de 24h, temperatura de 55°C, 100 rpm e 40 esferas de hidrogel com enzima imobilizada. O método de transesterificação enzimática com as enzimas imobilizadas em hidrogéis apresentou-se como uma tecnologia alternativa e promissora para a obtenção de biodiesel.

Palavras chave: biodiesel, hidrogel, PS Amano, biocatalisadores.

INTRODUÇÃO

A maior parte de toda a energia consumida provém do petróleo, do carvão e do gás natural. Essas fontes são limitadas e com previsão de esgotamento, tornando, portanto, o emprego de fontes alternativas de energia um empreendimento [1].

O diesel tem uma função essencial na economia industrial de um país, sendo usado em automóveis, ônibus urbanos, locomotivas, geradores elétricos, etc. O consumo de diesel em países desenvolvidos tem aumentado continuamente durante as últimas décadas. Um combustível de diesel alternativo deve ser tecnicamente viável, economicamente competitivo, ambientalmente aceitável e

com disponibilidade [2]. Consideradas estas exigências, os triacilgliceróis de óleos vegetais ou gorduras animais e seus derivados podem ser considerados como alternativas viáveis para produção de combustíveis substitutos ao diesel [3-6].

O biodiesel é derivado de fontes renováveis, biodegradável, não-tóxico e com baixo perfil de emissão comparado ao diesel de petróleo [7]. É obtido comumente a partir de uma reação química denominada transesterificação, pela mistura de óleos vegetais ou gorduras animais com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador, tendo como co-produto da reação o glicerol. Pode ser obtido também pelo processo de esterificação [8-10].

Os primeiros motores tipo diesel foram por injeção indireta. Tais motores eram alimentados por petróleo, óleos vegetais e até mesmo por óleos de peixe. Entre 1911 e 1912, Rudolf Diesel fez a seguinte afirmação: “O motor a diesel pode ser alimentado por óleos vegetais, e ajudará no desenvolvimento agrário dos países que vierem a utilizá-lo. O uso de óleos vegetais como combustível pode parecer insignificante hoje em dia. Mas com o tempo irão se tornar tão importante quanto o petróleo e o carvão são atualmente”[10-11].

No entanto, décadas depois é que os motores inventados por Diesel começaram a ser abastecidos com óleo diesel derivado de petróleo. Isto explica porque os motores a diesel não necessitam modificações para funcionarem com o biodiesel, fabricado a base de óleos vegetais ou gorduras animais [11].

Foi constatado, porém, que a aplicação direta dos óleos vegetais nos motores é limitada por algumas propriedades físicas e químicas dos mesmos, principalmente sua alta viscosidade, a acidez, a baixa volatilidade, os ácidos graxos livres contidos nos óleos, a presença de gomas, a deposição de carbonos e o caráter poliinsaturado, que acarretam em alguns problemas aos motores, bem como em uma combustão incompleta[12-13].

Visando reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, diferentes alternativas têm sido consideradas, tais como diluição, microemulsão com metanol ou etanol, craqueamento catalítico e reação de transesterificação com

metanol ou etanol [14-16]. Entre essas alternativas, a transesterificação tem se apresentado como a melhor opção, visto que o processo é relativamente simples promovendo a obtenção de um combustível cujas propriedades são similares às do óleo diesel [1, 17-20].

O uso de óleos vegetais ou gorduras animais encontra-se registrado na "Environment Protection Agency – EPA" dos Estados Unidos da América como combustível e como aditivo para combustíveis e pode ser usado puro (B100), em mistura com o diesel de petróleo a 20% (B20), ou numa proporção baixa como aditivo de 1 a 5%. O uso está associado à substituição de combustíveis fósseis em motores de ciclo diesel, sem haver a necessidade de nenhuma modificação no motor [21-24].

O biodiesel possui algumas características que representam vantagem sobre os combustíveis derivados do petróleo. Essas vantagens incluem em nível de Brasil, a redução à dependência de importação de petróleo, a ausência praticamente completa de enxofre e de compostos aromáticos, a presença de maior ponto de fulgor, alto número de cetano, a maior disponibilidade de matérias primas em uma grande variedade de fontes renováveis de rápida biodegradabilidade e ausência de problemas para transporte e estocagem. Além disso, seqüestra mais gás carbônico da atmosfera durante a sua produção do que emite quando está sendo queimado, ajudando, com isto, a aliviar o crescente conteúdo de gás carbônico da atmosfera [17, 25-26].

O uso de biodiesel em misturas de até 3 % ocasiona um aumento da lubrificidade, e com isto, pode prolongar a vida da máquina, diminuir a frequência de substituição de peças e reduzir sensivelmente as emissões de particulados e fumaça [27-28].

O biodiesel pode ser produzido como um combustível de alta qualidade para motores de ignição por compressão e é amplamente aceito, particularmente quando misturado ao combustível convencional. No entanto, apresenta menor energia do que o diesel convencional, o que ocasiona um aumento em torno de 6% no consumo e maior preço e, os tipos de biodiesel comumente usados, possuem um desempenho de fluxo a frio inadequado durante o inverno [28-29].

A melhora da estabilidade oxidativa e das propriedades de baixa temperatura permanecem como desafios técnicos. A maioria das emissões liberadas, como material particulado, hidrocarbonetos e monóxido de carbono, com exceção dos óxidos de nitrogênio (NOx) estão sendo reduzidas pelo uso de biodiesel [30-33]. Assim, a redução de NOx nas emissões gasosas é outro desafio técnico que enfrenta o biodiesel, especialmente em função da regulamentação cada vez mais rigorosa para o controle de emissões, afetando os motores diesel e ficando mais efetiva nos próximos anos [34].

A utilização de biodiesel como combustível vem apresentando um potencial promissor no mundo inteiro devido à sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, e à sua utilização como fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros

derivados do petróleo. No entanto, a comercialização do biodiesel ainda apresenta alguns obstáculos como o preço da matéria-prima e os custos operacionais [35-38].

Tais obstáculos podem ser superados se o processo de recuperação e aproveitamento dos subprodutos (glicerina e catalisador) for otimizado levando, a produção de biodiesel a um custo competitivo com o preço comercial do óleo diesel, ou seja, aquele verificado nas bombas dos postos de abastecimento [22].

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 [33,39].

Nesse processo é imprescindível a qualidade do produto final e um dos aspectos a serem controlados e otimizados é o uso de catalisadores. Catalisadores são compostos capazes de aumentar a velocidade da reação, participando efetivamente do processo sem alterar a proporção entre reagentes e produtos, sofrendo alterações de sua estrutura química, mas retornando a sua forma original no final da reação [40], podendo ser químicos ou enzimáticos.

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 [41]. Estes biocatalisadores são proteínas que possuem um alto poder catalítico, têm alto grau de especificidade por seus substratos; aceleram reações químicas específicas e, em alguns casos, podem funcionar tanto em soluções aquosas quanto em solventes orgânicos [40, 42].

Existem vários fatores que podem influenciar a ação das enzimas como biocatalisadores; entre estes podem ser citados a temperatura, o pH, as interações químicas do fluido, os agentes químicos e as irradiações. Altas temperaturas provocam a desnaturação das enzimas, por alterar as ligações químicas que mantêm a sua estrutura tridimensional [40].

A aplicação das enzimas como biocatalisadores em processos industriais tem aumentado gradativamente. Entre os processos de maior interesse, estão as reações de hidrólise, síntese e transesterificação de lipídios [43]. As enzimas de origem vegetal ou microbiana são obtidas com maior facilidade que as de origem animal, sendo que as de maior interesse comercial são as enzimas microbianas devido ao curto período de desenvolvimento, à grande variedade de processos metabólicos e à infinidade de microrganismos presentes na natureza passíveis de serem testados, além de modificarem e degradarem moléculas orgânicas complexas [44].

Muitos estudos foram realizados a respeito de alcoólises enzimáticas de triacilgliceróis para a produção de biodiesel, utilizando vários tipos de óleos e gorduras. Alguns desses resultados encontram-se na Tabela I. De um modo geral, percebe-se que a transesterificação dos triacilgliceróis utilizando enzimas ou células imobilizadas é mais eficiente do que o uso de enzimas não imobilizadas, apresentando um bom rendimento em menor tempo de reação tanto em sistemas com ou sem solventes orgânicos.

1.1 Alcoólise enzimática

A transesterificação é o processo mais utilizado, atualmente, para a produção de biodiesel. Consiste numa reação química dos óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois de cadeia curta, como etanol ou metanol, na presença de um catalisador, da qual se obtêm os ésteres e o glicerol. A reação de transesterificação é acelerada pela catálise ácida, básica ou enzimática. A utilização da lipase como biocatalisador na produção de biodiesel tem um grande potencial comparado com os métodos químicos, porque não exige operações complexas para recuperação do glicerol e eliminação do catalisador, além de evitar etapas de purificação [45].

As vantagens ambientais do processo enzimático comparado ao químico são evidentes, pois requerem menor gasto energético com temperatura elevadas, os produtos são mais facilmente recuperados e a quantidade de glicerina, subproduto do processo, é melhor separada. O custo das lipases é consideravelmente maior que dos catalisadores químicos, entretanto o procedimento de imobilização da lipase facilita uma posterior reutilização do biocatalisador, podendo tornar o processo economicamente mais viável [46].

O processo geral da reação de transesterificação é normalmente uma seqüência de três etapas consecutivas e reversíveis, em que um éster é transformado em outro pela mudança na porção alcóxi (radical alquila ligado ao átomo de oxigênio, RO-). Na primeira etapa, as moléculas de triacilglicerol são convertidas em diacilglicerol, depois em monoacilglicerol e, finalmente, na última etapa, o glicerol é obtido. Os álcoois que podem ser utilizados neste tipo de reação são metanol, etanol, propanol, butanol, álcool amílico, entre outros. Entretanto, devido às propriedades conferidas ao produto, o metanol e o etanol estão entre os principais agentes de transesterificação e são os mais freqüentemente empregados no processo [47-48].

Destaca-se que produzir biodiesel por etanólise, que usa o etanol, não é um processo tão simples quanto realizar a transformação com o uso do metanol, denominado metanólise. Uma dificuldade no processo de etanólise é a necessidade de se utilizar o etanol anidro, pois o uso do etanol hidratado reduz o grau de conversão da reação, levando à reversibilidade de reação [49]. Outro problema importante a ser destacado é a maior dificuldade de

separação dos produtos, ésteres etílicos e glicerol, porém é ambientalmente atrativo por ser renovável e não tóxico [50 - 52].

A conversão na transesterificação enzimática tem resultados promissores, conforme apresentado na Tabela 1, onde com os substratos etanol e óleo de pinhão manso e utilizando a lipase imobilizada de *B. cepacia* foi possível uma taxa de conversão de 98 % em 8 horas de reação. [55] Nouredini et al. [19] investigou esta mesma lipase livre e imobilizada em processos de transesterificação de óleo de soja com metanol e etanol. A lipase imobilizada, além de apresentar melhores resultados, foi constantemente mais ativa do que a livre e também mais estável, apresentando maiores condições de reutilização no processo e perdendo pouca atividade quando submetida a usos repetitivos.

A partir da década 80 houve um crescente interesse na utilização de técnicas de imobilização de enzimas que visam minimizar os efeitos causados pelo seu uso em ambientes adversos, como solventes orgânicos, variações no pH, altas temperaturas, a diminuição do custo por análise, aumentando a rapidez e a exatidão dos processos utilizados [60]

Segundo Neto (p. 47) [61] a imobilização de enzimas é um método a ser explorado e consiste no confinamento das mesmas em um determinado material. Este processo pode ocorrer de diferentes maneiras. No caso de lipases, numerosos métodos de imobilização são viáveis, cada um envolvendo diferentes graus de complexidade e eficiência. Os vários métodos usados podem ser subdivididos em duas categorias principais: método químico, quando ligações covalentes são formadas com a lipase, e o método físico, quando interações fracas ou retenção mecânica é utilizada. No método químico, a lipase é fixada no suporte por ligação covalente com formação de ligação cruzada. No método físico a lipase pode ficar retida ou microencapsulada no interior de um gel insolúvel, fibras porosas ou materiais adsorventes. A recuperação de lipases imobilizadas depende da meia vida da enzima, que após certo tempo precisa de purificação antes de ser reutilizada.

As técnicas mais utilizadas de imobilização são a de inclusão ou microencapsulação através do confinamento dos biocatalisadores em polímeros insolúveis formando filmes, ou em microcapsulas. A enzima não interage quimicamente com o polímero, evitando assim, a desnaturação da mesma [19].

Segundo Dalla-Vecchia [62], o procedimento de adsorção de uma enzima consiste em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas e vários materiais podem ser utilizados para essa imobilização, dependendo de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo.

Tabela 1 - Sistemas biocatalíticos utilizados para produção de biodiesel.

Biocatalisadores	Agente microbiano	Solvente	Óleo	Álcool	Rendimento (%)	Tempo (h)	Fonte	Fonte
Lipase bruta	<i>Cryptococcus spp</i>	n-hexano	arroz	Metanol	86	120	[53]	[53]
	<i>Bacillus sp</i>	Hexano	ácido oléico	Metanol	51	16	[54]	[54]
Lipase livre	<i>Burkholderia cepacia</i>	Água	soja	Metanol	40	1	[19]	[19]
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Água	soja	Etanol	35	1	[19]	[19]
	<i>Burkholderia cepacia/ celite</i>	Livre	pinhão-manso	Etanol	98	8	[55]	[55]
	<i>Bacillus sp</i> / sefarose 4B ativada	Hexano	ácido oléico	Metanol	60	16	[56]	[56]
	<i>Burkholderia cepacia</i> / matriz de filossilicato sol-gel	Livre	gordura	Metanol	98	48	[57]	[57]
Lipase imobilizada	<i>Candida antarctica</i> / matriz de filossilicato sol-gel	Livre	gordura	Metanol	60	48	[57]	[57]
	<i>Burkholderia cepacia</i> /silica	Água	soja	Metanol	67	1	[19]	[19]
	<i>Burkholderia cepacia</i> /silica	Água	soja	Etanol	65	1	[19]	[19]
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Hexano	soja	Metanol	86	72	[58]	[58]
Sistema celular íntegro	<i>Rhizopus oryzae</i>	Livre	soja	Metanol	72	72	[59]	[59]
	<i>Rhizopus oryzae</i>	terc-butanol	soja	Metanol	90	24	[59]	[59]

Estudos mostram que várias lipases produzidas por diferentes organismos como *Mucor miehei* e *Candida rugosa* são utilizadas para atuarem como biocatalisadoras na produção de biodiesel e oportunizam a recuperação do catalisador, eliminando os problemas de separação, índice de acidez e teor de sódio, além de atender uma nova era de química verde, minimizando os impactos causados ao meio pelos resíduos que o processo gerou [63].

Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas na busca por um método adequado para a produção de biodiesel, entre os quais está a produção de biocatalisadores utilizando bucha vegetal (*Luffa cylindrica*), e diversos polímeros sintéticos e naturais têm sido utilizados, como o poli(óxido de etileno), poli(álcool vinílico), carboximetilcelulose, alginato de sódio e quitosana.[19,56].

Neste trabalho buscaram-se a imobilização da enzima PS Amano em hidrogéis (polímero absorvente) e aplicação desta na produção de biodiesel de óleo de girassol. Destaca-se que esta proposta busca a obtenção de biodiesel por processos enzimáticos que levem a um menor impacto

ambiental, e que atualmente não estão sendo utilizados industrialmente devido ao elevado custo.

1 MATERIAIS E MÉTODOS

A produção de enzima imobilizada e de biodiesel por biocatálise foi realizada no Laboratório de Oleoquímica da Universidade de Santa Cruz do Sul – LAOL-UNISC, empregando óleo de girassol bruto obtido de um projeto de incentivo a produção de girassol no Vale do Rio Pardo – RS, desenvolvido pela Associação de Fumicultores do Brasil - AFUBRA e pela UNISC.

1.1 Reagentes

Hexano, metanol e acetato de etila foram utilizados da marca Merck e conforme recebidos. Todos os outros reagentes químicos foram utilizados grau analítico e sem tratamento. Para análise cromatográfica foram utilizados padrões de ésteres metílicos (todos acima de 99% de pureza)

da Supelco e como padrão interno foi utilizado o heptadecanoato de metila da Sigma. O óleo de girassol utilizado nas reações de transesterificação foi extraído por prensagem de grãos de girassol cultivados na região do Vale do Rio Pardo. Para a imobilização foram utilizados hidrogéis da marca Rainbow mud(2,3mm) comercializados na região para o cultivo de plantas ornamentais. A enzima PS Amano pura foi doada pela Amano Corporation.

1.2 Hidratação dos hidrogéis

Primeiramente foi realizado um estudo para avaliar a taxa de crescimento das esferas de hidrogel em água deionizada. Os diâmetros das esferas hidratadas foram aferidos com um paquímetro a cada hora de imersão até um total de 10h. Para tanto, cada esfera foi colocada em um copo de becker com 100 mL de água deionizada.

2.3 Imobilização da enzima PS nas esferas de hidrogel

Para o experimento as esferas de hidrogel foram imersas em soluções de enzima preparadas em concentrações de 80 mg mL⁻¹, por 1h, a 30°C, em *shaker* com agitação orbital (Marconi) com 70 rpm. As esferas assim obtidas foram denominadas HG-PS (Figura 1). Após a imobilização, parte das esferas foram desidratadas a 37 °C por 36h em estufa. As esferas assim obtidas foram denominadas HG-PS-D. O mesmo procedimento de imobilização foi realizado com a substituição da água por uma solução 1:9 de metanol-água deionizada e as esferas obtidas deste processo foram denominadas HGM-PS.

Para avaliar a alterações na massa do hidrogel durante a reação de transesterificação, foi realizado a pesagem das esferas de hidrogel antes e após a transesterificação.

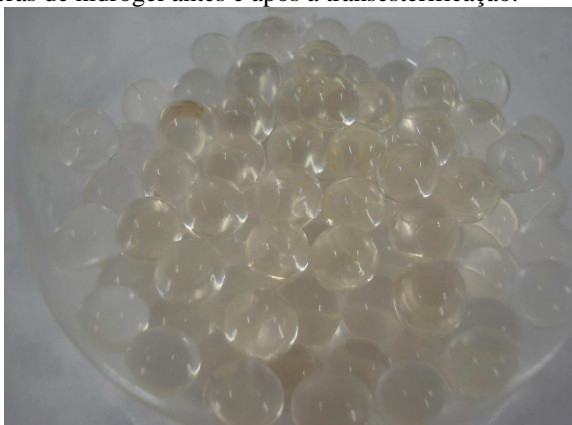


Figura 1 – Esferas de hidrogel com enzima imobilizada.

1.3 Transesterificação enzimática

A transesterificação enzimática do óleo de girassol foi realizada com a enzima PS Amano imobilizada no hidrogel. As condições experimentais utilizadas na reação de transesterificação foram definidas a partir de resultados prévios obtidos com óleo de mamona [64] e girassol [65]. Assim foram selecionadas a temperatura de 55°C, tempo de reação de 24h, 1:6 proporção de óleo-metanol e 100 rpm.

A reação foi realizada com 1 g de óleo de girassol em erlenmeyer fechado de 125 mL, com a adição de 40 mL de hexano e 10 a 40 esferas de enzima imobilizada em hidrogel (2 a 10g) (HG-PS e HGM-PS). Com as esferas desidratadas após imobilização também foram utilizadas 10, 20 e 40 esferas (0,1 a 0,4g) (HG-PS-D).

Após a reação, o meio reacional foi filtrado para separação das esferas e o solvente foi removido por rotaevaporação. Os produtos de reação foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD) e quantificados por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

1.3.1 Análise por Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Para a análise quantitativa 100 mg de amostra foi diluída em 5 mL de hexano e analisada por CG-EM. No Cromatógrafo QP2010 – Plus foi utilizado uma coluna RTX 5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O injetor estava a 280 °C e a interface a 280 °C. A programação da coluna foi de 150 °C por 1 min e aquecimento até 280 °C (5°C min⁻¹) permanecendo nesta temperatura por 5 min. O volume de amostra injetado foi de 1µL e o injetor estava no modo *split* 1:5. O detector foi empregado no modo scan e com 0,7 kV de energia.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Imobilização da enzima em hidrogel

No estudo preliminar da taxa de crescimento das esferas de hidrogel foi possível identificar que com 1 h de imersão em água as esferas triplicam o seu tamanho, sendo suficiente para a retenção da enzima em sua superfície como mostra a figura 1. Com esta alta taxa de hidratação com 1 h de imersão, foi realizada a imobilização da enzima PS Amano.

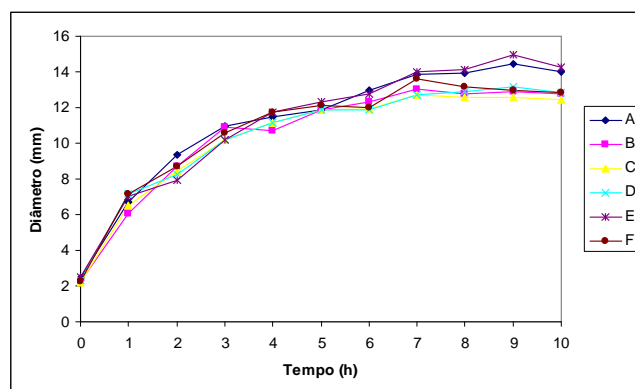


Figura 2 - Representação gráfica do crescimento das 6 esferas de hidrogel (A a F), com relação ao diâmetro da esfera hidratada

Observa-se pela Figura 2 que a hidratação realizada no período de 1 h é suficiente para que haja absorção da enzima

em uma camada superficial. Destaca-se que a produção de esferas maior que 8 mm tem uma área superficial maior de enzima imobilizada, no entanto, estas esferas exigem maior quantidade de solvente no meio reacional.

Outro aspecto relevante no emprego de hidrogel para a imobilização da enzima é que o crescimento das diferentes esferas é uniforme nas primeiras horas, conforme observa-se nos desvios padrões menores entre o tamanho destas seis esferas para um mesmo tempo de crescimento.

3.2 Transesterificação

Para todos os experimentos de transesterificação realizados com as enzimas imobilizadas foi realizada a análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e evidenciado que a conversão foi parcial dos triacilgliceróis em ésteres metílicos.

Um aumento da conversão foi observado com o aumento do tempo de reação e com a quantidade de biocatalisador empregada, alcançando-se conversões de aproximadamente 70%. Resultados similares foram alcançados por Nouredini et al [66] que obtiveram 67% de conversão com a mesma lipase, porém imobilizada em suporte sol-gel hidrofóbico. A conversão observada na transesterificação do óleo de girassol foi registrada na figura 3.

A reação apresentou maior conversão quando a enzima imobilizada foi desidratada (HG-PS-D) ou quando no processo de imobilização foi utilizado a enzima em solução 1:9 de metanol e água (HGM-PS).

Observa-se que a transesterificação é observada a partir de 18 h de reação e que em trabalhos futuros é importante analisar o produto obtido após 24h de reação, pois conforme a Resolução 7/2008 da Agência Nacional do Petróleo, o teor de ésteres no biodiesel deve ser maior que 96,5%.

Com relação a conversão obtida com as esferas desidratadas (HG-PS-D) observa-se que a remoção da água do hidrogel após a absorção da enzima não possibilita a reversibilidade da reação de transesterificação o que pode ter sido responsável pela conversão obtida com 24h de reação no estudo 5.

A adição de metanol na etapa de imobilização da enzima também levou a uma alta conversão com 24 h, uma vez que, o metanol também é substrato para a reação de transesterificação do óleo de girassol.

Para os três sistemas estudados, observa-se que existe uma diferença de massa entre as esferas antes e depois do seu emprego como biocatalisadores, ou seja, ocorreu um equilíbrio dos produtos do interior da esfera com o meio reacional o que sugere-se que seja solubilização de álcool e água, pois álcool do meio reacional pode ser absorvido pelo hidrogel, assim como, o álcool que está no hidrogel pode migrar para o meio reacional e solubilizar no óleo [67-68] conforme observa-se pelas massas das esferas após as reações de transesterificação (Figura 4).

Tabela 2- Média e desvio padrão do crescimento das seis esferas de hidrogel em água.

Tempo (h)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Média(mm)	2,33	6,79	8,58	10,50	11,32	11,98	12,30	13,33	13,25	13,50	13,19
Desvio Padrão (mm)	0,12	0,44	0,49	0,38	0,41	0,21	0,47	0,57	0,65	0,95	0,74

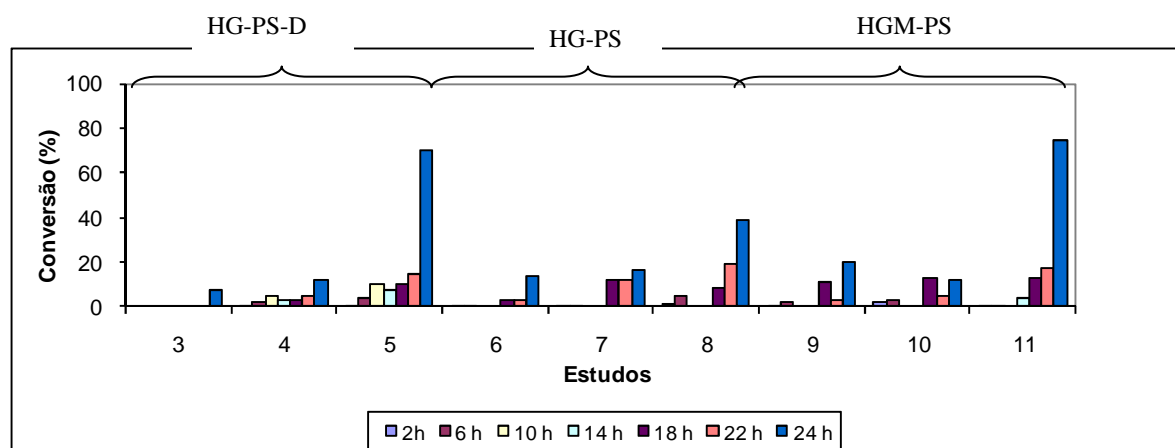


Figura 3 – Conversão das amostras na transesterificação realizada com enzima PS imobilizada em hidrogel (Estudos 3, 6 e 9 com 10 esferas; Estudos 4, 7, 10 com 20 esferas e Estudos 5, 8 e 11 com 40 esferas)

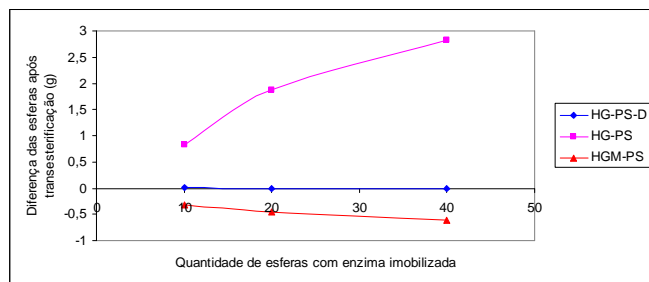


Figura 4 – Diferença de tamanho das esferas de hidrogel com enzima imobilizada após a transesterificação.

Assim, supõe-se que haja uma migração de metanol para o meio reacional, sendo utilizado na reação de transesterificação, reduzindo a massa das esferas após a reação (HGM-PS). Por outro lado, a massa das esferas hidratadas com solução aquosa de enzima (HG-PS) após a transesterificação revela um aumento da massa das mesmas, o que também leva a propor que tenha ocorrido a absorção de álcool, pelo hidrogel, do meio reacional, uma vez que este álcool está em excesso.

Desta forma, no sistema aquecido durante a reação de transesterificação, constata-se que é possível a formação de um equilíbrio de solubilização água – álcool e álcool – óleo, o que pode ou não beneficiar a conversão, uma vez que o álcool é solúvel em água e pouco solúvel em óleo e éster.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A imobilização de enzimas em hidrogel poderá ser uma possível alternativa para a produção de biodiesel por processo enzimático, sendo que apresentou resultados satisfatórios, principalmente com 24 horas de reação. Os sistemas estudados podem ser modificados quanto a presença de metanol na etapa de imobilização, tempo de reação e quantidade de enzima. Da mesma forma, com a enzima imobilizada em hidrogel, seguida de desidratação, há a possibilidade de conversão, do óleo em éster e, assim, com a imobilização da enzima em hidrogel têm-se dois caminhos alternativos para a produção de biodiesel.

BIODIESEL PRODUCTION BY BIOCATAVSIS USING ALTERNATIVE METHOD FOR LIPASE IMMOBILIZATION IN HDRIGEL

ABSTRACT: The society has been looking for alternatives in order to stop the process of environmental destruction installed in the world, however, starting from last century, a new vision on the indiscriminate use of the environmental resources started to be discussed leading to the use of new technologies of production of cleaner fuel, as the biodiesel, produced from vegetable oils. The enzymatic processes are a production alternative, for they are methods with losses reduction and larger efficiency, presenting however, high production cost. With the objective of reducing costs and increasing the efficiency we have searched the enzymes immobilization through alternative

method and to use them as biocatalysts in the biodiesel production. The immobilization of the lipase PS Amano was accomplished in spheres formed by the hydration of commercial hydrogel in aqueous solution containing the enzyme. With the immobilized enzyme it was accomplished the transesterification, in which it was obtained conversions in methyl esters of up to 70%, in organic solvent, with 24h, 55°C, 100 rpm and 40 hydrogel spheres with immobilized enzyme. The method comes as a promising alternative technology for the biodiesel obtaining.

Keywords: biodiesel, hydrogel, PS Amano, biocatalysts

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Programa FAP-UNISC, Fapergs, Finep, CNPq e a Amano Corporation pela doação da lipase.

REFERÊNCIAS

- [1] SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, M. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 9, p. 199-210, 1998.
- [2] SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Energy Reviews, Vol. 4, p. 111-133, 2000.
- [3] SHAY, E. G. Biomass & Bioenergy, Vol. 4, p. 227-242, 1993.
- [4] SCHWAB, A. W.; BAGBY, M. O.; FRIEDMAN, B. Fuel, Vol. 66, p. 1372-1378, 1987.
- [5] FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 63, p. 1375-1380, 1986.
- [6] FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 61, p. 1638-1643, 1984.
- [7] KRAWCZYK, T. J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 7, n. 8, p.: 801-815, 1996.
- [8] Garcia, C. M.; Teixeira, S.; Marciniuk, L. L.; Schuchardt, U., Bioresource Technology Vol 99, n.14, p. 6608-6613, 2008.
- [9] SCHULER, A.; *Produção de Biodiesel e Controle de Qualidade por Cromatografia*, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Química. Disponível em: <[http://www.perkinelmer.com.br/home/seminarios/Biodiesel %20-%20prof.%20Schuler.pdf](http://www.perkinelmer.com.br/home/seminarios/Biodiesel%20-%20prof.%20Schuler.pdf)>. Acesso em: 28 maio 2007.
- [10] MEHER, L.C.; D. SAGAR, V.; NAIK, S.N. Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.
- [11] Revista Biodiesel BR. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/motor-diesel/motor-diesel.htm>>. Acesso em: 28 maio 2007.
- [12] FUKUDA, H., KONDO, A., NODA, H. Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.
- [13] ENCINAR, J. M. et al. Industrial & Engineering Chemistry Research, Vol. 38, n. 8, p. 2927-2931, 1999.



- [14] DUNN, R. O.; J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 79, p. 915-920, 2002.
- [15] NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. M.; Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Vol. 19, p. 28-31, 2001.
- [16] DORADO, M. P. et al. Trans. ASAE, Vol. 45, p. 525-529, 2002.
- [17] ENCINAR, J. M. et al., Energy & Fuels, Vol. 19, p. 443-450, 2002.
- [18] AGARWAL, A. K.; DAS, L. M. J. Eng. Gas Turb. Power - T. ASME, Vol. 123, p. 440-447, 2001.
- [19] NOUREDDINI, H.; HARKEY, D.; MEDIKONDURU, V. A. J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 75, p. 1775-1783, 1998.
- [20] DORADO, M. P. et al. Energy Fuels, Vol. 17, p. 1560-1565, 2003.
- [21] KNOTHE, G. J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 79, p. 847-854, 2002.
- [22] RAMOS, L. P. et al. Quím. Nova, Vol. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.
- [23] LUE, Y. F.; YEH, Y. Y.; WU, C. H. J. Environ. Sci. Health, Part A – Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng., Vol. 36, p. 845-859, 2001.
- [24] HAAS, M. J. et al. Energy Fuels, Vol. 15, p. 1207-1212, 2001.
- [25] BAGLEY, S. T. et al. Environ. Sci. Technol., Vol. 32, p. 1183-1191, 1998.
- [26] PETERSON, C. L. et al. Applied Eng. in Agric., Vol. 13, n. 1, p. 71-79, 1997.
- [27] BOEHMAN, A. L.; SONG, J; ALAM, M., Energy & Fuels, Vol. 19, p. 1857-1864, 2005.
- [28] LOTERO, E. Jr. et al., Ind. Eng. Chem. Res., Vol. 44, p. 5353-5363, 2005.
- [29] SERDARI, A.; LOIS, E.; STOURNAS, S. Ind. Eng. Chem. Res., Vol. 38, p. 3543-3548, 1999.
- [30] DUNCAN, J. *Costs of Biodiesel Production*. Report Prepared Energy Efficiency and Conservation Authority, May 2003.
- [31] KNOTHE, G.; KRAHL, J.; VAN GERPEN, J. eds. *The History of Vegetable Oil – Based Diesel Fuels*. In: *The Biodiesel Handbook*; AOCS Press: Champaign, IL, 4-8, 2005.
- [32] MITTELBACH, M.; REMSCHMIDT, C. *Biodiesel – The Comprehensive Handbook*; Karl-Franzens University: Graz, Austria, 2004.
- [33] MCCORMICK, R. L.; ALLEMAN, T. L. *Chapter 7.1: Effect of Biodiesel Fuel on Pollutant Emissions from Diesel Engines*. In KNOTHE, G.; KRAHL, J.; VAN GERPEN, J. eds. *The Biodiesel Handbook*; AOCS Press: Champaign, IL, 165-174, 2005.
- [34] KNOTHE, G.; SHARP, C. A.; RYAN, T. W. Energy & Fuels, Vol. n. 20, p. 403-408, 2006.
- [35] HARTEN, B.; A&G, 13, 98, 2003. Citado por FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. da S.; SCABIO, A. Quím. Nova, Vol. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.
- [36] MASJUK, H.; SAPUAN, M. S.; J. Am. Oil Chem. Soc., 12, 609, 1995. Citado por FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. da S.; SCABIO, A. Quím. Nova, Vol. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.
- [37] STOUMAS, S.; LOIS, E.; SERDARI, A.; J. Am. Oil Chem. Ed.Society, Vol. 12, n. 436, 1995.
- [38] MA, F.; L. CLEMENTS, D.; HANNA, M. A., Ind. Eng. Chem. Res., Vol. 37, p. 3768-3771, 1998.
- [39] FERRARI, R. A. et al. *Anais do Simpósio Tendências e Perspectivas da Oleoquímica e Petroquímica*, Rio Grande, Brasil, 2002.
- [40] BORZANI, W. et al. *Biotecnologia Industrial. Fundamentos*. 1; Ed Edgard Blücher Ltda., 2001.
- [41] PEREIRA, R. S. *Química Nova*, Vol. 18, n. 5, p. 452-459, 1995.
- [42] LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. 2001.
- [43] HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 39, n. 235-251, 2005.
- [44] CONTI, R. de; RODRIGUES, J.A. R.; MORAN, P.J.S. *Química Nova*, Vol. 24, n. 5, p. 672-675, 2001.
- [45] BAN, K. et al. W. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 8, p. 39-43, 2000.
- [46] VILLENEUVE, P. et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 9, p. 113-148, 2000.
- [47] DARNOKO, D.; CHERYAN, M. J. *Am. Oil Chem. Soc*, 77, 1263-1267, 2000.
- [48] MARCHETTI, J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 11, p. 1300-1311, 2005.
- [49] MA, F.; HANNA M. A. *Bioresouce Technology*, Vol. 70, p. 1-15, 1999.
- [50] NETO, P. R. C. et al. *Química Nova*, Vol. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.
- [51] FUKUDA, H., KONDO, A., NODA, H. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 92, p.405-416, 2001.
- [52] MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Vol. 32, p.38-46, 2004.
- [53] SEBRÃO, D. *Química Nova*, Vol. 30, n. 5, p. 1182-1187, 2007.
- [54] KAMINI, N.R.; IEFUJI, H. *Process Biochemistry*, Vol. 37, p. 405-410, 2001.
- [55] DOSANJH, N. S.; KAUR, J. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 36, p. 7-12, 2002.
- [56] SHAH, S.; GUPTA, M.N. *Process Biochemistry*, Vol. 42, p. 409-414, 2007.
- [57] DOSANJH, N. S.; KAUR, J. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 36, p. 7-12, 2002.
- [58] HSU, A. et al. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 36, p. 181-186, 2002.
- [59] ZENG, J. et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 43, p. 15-18, 2006.

[60] LI, W.; DU, W.; LIU, D. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 45, p. 122-127, 2007

[61] NETO, P. R. C. Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. 2002. 133 f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Química – Mestrado e Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, 2002.

[62] DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. *Química Nova*, Vol. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

[63] SILVA, I. R. B.; XAVIER, C. H.; OLIVEIRA, M. T. B.; SOUSA, E. M. B. D.; PEDRINI, M. R. S. . Produção de Biocatalisadores Utilizando Bucha Vegetal (*Luffa cylindrica*) como Suporte Para Biomassa Produtora de Lipase e Óleo de Mamona Como Fonte de Carbono. In: I Congresso da rede de tecnologia de biodiesel, 2006, Brasília. Anais em cd ROM

[64] SCHNEIDER, R. C. S. Extração, caracterização e transformação do óleo de rícino. 2003. 214 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em

Química – Mestrado e Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

[65] SCHNEIDER, R. C. LARA, L. R. S. CEOLIN, M. M. SCHMATZ, W. L. CORBELLINI, V. A. Produção de biodiesel em sistema enzimático e contínuo. XXXI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Aidis. Argentina, 2008

[66] NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. *Bioresource Technology*, Vol. 96, p.769-777, 2005.

[67] MA, F.; CLEMENTS, L.D.; HANNA, M.A. *Ind Eng Chem Res* 1998;37:3768–71.

[68] DAMBISKI, L. Síntese de biodiesel de óleo de nabo forrageiro empregando metanol supercrítico. Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação Em Engenharia Mecânica E De Materiais – PPGEM, UFPR, 2007.