

**USO DE LIPASES COMBINADAS PARA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS**Francisco Thálysson Tavares Cavalcante <sup>1</sup>, Katerine da Silva Moreira <sup>2</sup>, Maria Cristiane Martins de Souza <sup>3</sup>, José Cleiton Sousa dos Santos <sup>4</sup>**RESUMO**

O biodiesel uma alternativa mais ambientalmente e socialmente viável aos combustíveis fósseis tradicionais. Várias matérias-primas podem ser usadas para sintetizá-lo, dentre elas, a gordura animal, aproveitando-se um resíduo. A utilização de lipases para substituir catalisadores químicos, seria outra forma de deixar a síntese de biodiesel mais limpa. As lipases em especial, catalisam inúmeras reações e apresentam várias seletividades. Além disso, utilizá-las de forma combinada aumenta a produtividade do processo. Este trabalho tem como objetivo otimizar a combinação de lipases e os parâmetros reacionais na produção de biodiesel a partir de resíduos de óleo de frango, utilizando delineamento experimental. Foi realizado um estudo das propriedades físico-químicas da gordura de frango, que apresentou todos os parâmetros dentro do esperado pela literatura. Em seguida, realizaram-se combinações diferentes de 3 lipases (TLL, RML e Novozyme 435) para se determinar a melhor combinação para a síntese de biodiesel. Os parâmetros usados para as sínteses foram de Razão molar 6:1 (etanol:óleo); temperatura de 40 °C, massa de catalisador de 10% (da massa de substrato), água adicionada de 2,5 (de massa do substrato) e o tempo de reação foi de 24 horas. Obtiveram-se, portanto, resultados bons nas diferentes proposições, e aguarda-se por mais recurso para a finalização delas.

**Palavras-chave:**

Biocatálise. Lipases combinadas. Engenharia enzimática.

---

<sup>1</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, Discente, e-mail: thalysson.cavalcante13@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento sustentável, Discente, e-mail: katerinegce@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, Docente, e-mail: mariacristiane@unilab.edu.br

<sup>4</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento sustentável, Docente, e-mail: jcs@unilab.edu.br

## INTRODUÇÃO

Como já se sabe, o biodiesel é um biocombustível, criado como uma alternativa aos combustíveis fósseis tradicionais (GEBREMARIAM; MARCHETTI, 2018). Pode ser usado em sua forma pura, ou misturado em diferentes proporções com o diesel fóssil (MAZIVILA, 2018). Além de ter origem renovável, o biodiesel apresenta muitas vantagens em relação ao diesel mineral, destacando: A presença mínima de compostos sulfurados e aromáticos em sua composição, a menor emissão de material particulado, a possibilidade de desenvolvimento regional, seu alto ponto de fulgor e número de cetano (ATABANI et al., 2012. KADIR et al., 2018. TIWARI et al., 2018. SURESH et al., 2018). De acordo com o relatório da Rede de Políticas de Energia Renovável (REN 21) de 2016, os maiores produtores de biodiesel do mundo foram os EUA, Brasil e Alemanha, com 4,8, 4,1 e 2,4 bilhões de litros, respectivamente (REN 21, 2016).

As matérias-primas mais utilizadas para a produção de biodiesel são óleos comestíveis, correspondendo a mais de 95% da produção total (AHMADI et al., 2011), e isso foi responsável por muitos problemas, como na manutenção da biodiversidade e especialmente na segurança alimentar (BRENNAN; OWENDE, 2010). Embora não seja considerada uma fonte renovável, a gordura animal pode ser utilizada para produzir biodiesel, tendo um papel ambiental importante, devido ao uso de um resíduo, que é um poluente de grande demanda bioquímica de oxigênio (KRAUSE, 2008. KIRUBAKARAN; ARUL, 2018).

Uma alternativa mais ambientalmente responsável na síntese do biodiesel seria a utilização de catalisadores enzimáticos, que têm, entre muitas vantagens, a possibilidade de reutilização do catalisador, as condições de reação mais brandas, a não produção de resíduos químicos ou sabões (TACIAS- PASCACIO et al., 2017. VESCOVI et al., 2016. POURZOLFAGHAR et al., 2016. LÓPEZ et al., 2014. SANGALETTI et al., 2013. SOUZA, 2013). Neste contexto, as lipases são as enzimas mais utilizadas na indústria, devido à sua grande variedade de reações catalisadas, oferecendo altas atividades catalíticas e diferentes tipos de seletividades, tais como regioseletividade (especificidade para grupos éster carboxílicos primários ou secundários em diferentes posições), (especificidade para um determinado ácido graxo ou grupo de ácidos graxos) e enantioseletividade (capacidade de distinguir entre dois enantiômeros em um substrato racêmico) (MEHRASBI et al., 2017. HASAN et al., 2006. KAPOOR; GUPTA, 2012).

Novozym®435 é uma lipase não específica produzida a partir de *Candida antarctica* B e imobilizada em resina acrílica (YU et al., 2010). Esta enzima exibe um grau muito alto de especificidade de substrato, regio e enantioselectividade (GOSWAMI; GOSWAMI, 2006. LE JOUBIOUX et al., 2013. WANG et al., 2013). Lipozyme® TL IM é uma lipase 1,3 específica originária de *Thermomyces lanuginosus* e imobilizada em um suporte de sílica gel não compressível. Ele pode reorganizar ácidos graxos em diferentes posições (especialmente em sn-1 e sn-3) e exibe um alto rendimento de migração de acila com alguns tipos de óleos devido à interação entre a enzima e a sílica (WANG; ZONG, 2008. DU et al., 2005). Lipozyme® RM IM é também uma lipase 1,3 específica, mas é originária de *Rhizmucor miehei* que é imobilizada em um transportador de resina. É um catalisador altamente eficaz na modificação de gorduras e óleos (RODRIGUEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Recentemente foi comprovado que a combinação de lipases (como um coquetel) é uma estratégia eficaz para aumentar as taxas de conversão e produtividade em diferentes reações devido às diferentes especificidades das individuais, permitindo múltiplas superfícies de contato (POPPE et al., 2018. AMOAH et al., 2016. QIAO et al., 2016. ALVES et al., 2014).

De acordo com o que foi apresentado, este trabalho tem como objetivo otimizar a combinação de lipases e os parâmetros reacionais na produção de biodiesel a partir de resíduos de óleo de frango, utilizando delineamento experimental.

## METODOLOGIA

### Caracterização físicoquímica do óleo

**Índice de acidez**

O índice de acidez foi medido por titulação com NaOH 0,1 M, usando 2g de gordura de frango, 20 mL de uma solução neutralizada de álcool-éter (1:2) e 3 gotas de fenolftaleína. Então, foi calculado pela equação 6:

$$A = v \cdot f \cdot 5,61 / P$$

Onde IA é o índice de acidez, v é o volume de NaOH usado na titulação (ml), f é o fator de correção da solução de NaOH e P é a massa da amostra (g) (LUTZ, 1985).

**Estabilidade oxidativa**

A estabilidade oxidativa muda de acordo com a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados presente no óleo. Este ensaio foi feito segundo a norma (EN14214 2003).

**Índice de saponificação**

Índice de saponificação é dado pela quantidade de hidróxido de potássio necessária para saponificar 1 g de óleo, e depende da composição de ácidos graxos. 4 g da amostra foram adicionadas em 50 ml de uma solução alcoólica de KOH (4% m/v). Um branco também foi preparado. Os erlenmeyers foram conectados a condensadores e foram fervidos por 3 horas. 3 gotas de fenolftaleína foram adicionadas e as soluções foram tituladas com HCl 0,5 M. O índice de saponificação foi calculado a partir da equação 7:

$$IS = (28,95 \cdot f \cdot (B - A)) / P$$

Onde IS é o índice de saponificação, f é o fator de correção da solução de HCl, B é o volume usado na titulação do branco (ml), A é o volume de titulação usado na amostra com óleo (mL) e P é a massa da amostra (g). (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 1990).

**Densidade e viscosidade**

Densidade é a razão entre massa e volume da substância. Foi medida pela norma NBR 14065. Já a viscosidade, foi medida segundo a norma ASTM D445.

**Determinação da melhor combinação de lipases**

Para determinar a melhor combinação de lipases para a reação de transesterificação, um design experimental de 3 fatores e análise de superfície triangular foram realizados. Os 10 pontos são mostrados na Tabela 1. As condições reacionais foram: Razão molar 6:1 (etanol:óleo); temperatura de 40 °C, massa de catalisador de 10% (da massa de substrato), água adicionada de 2,5 (de massa do substrato) e o tempo de reação foi de 24 horas.



### Reações de transesterificação

As reações de transesterificação foram realizadas em erlenmeyers de 50 mL, contendo a melhor combinação de lipases e as quantidades apropriadas de óleo, etanol, temperatura, massa de catalisador e quantidade de água de acordo com o planejamento experimental.

### Análise de cromatografia gasosa

A análise foi feita segundo a norma (EN 14103). Um cromatógrafo gasoso GC-FID da VARIAN, modelo 450-GC equipado com uma coluna CP-Wax 52 CB (30m x 0,32mm x 0,25  $\mu$ m). A temperatura do injetor e detector foram mantidas a 250 ° C e o aquecimento do forno foi dado da seguinte forma: até 60° C em 2 minutos, seguido por um aquecimento de 10 ° C/ m até 200 ° C, em seguida à 5 ° C/ min até 240° C, temperatura que foi mantida por 7 minutos. Uma solução padrão interno de metilnonadecanoato 10 mg/ mL foi preparada pesando-se 100 mg de metilfenidato em um frasco de 10 mL e então diluído até a marca com heptano. Em seguida, foi medido 51 mg da amostra em um vial de 2 mL tampado, e então 1 mL de solução padrão foi adicionado. A mistura foi homogeneizada por 2 minutos. Uma alíquota de 1 $\mu$ L dessa solução foi injetada no cromatógrafo. Após a injeção, todas as áreas dos picos foram comparadas para cálculo da conversão e o resultado foi expresso pela quantidade de ésteres totais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização físico-química do óleo

A tabela 7 apresenta os resultados alcançados na caracterização físico-química do óleo de frango:



Conforme pode ser observado, todos os parâmetros medidos para o óleo se enquadram dentro valores encontrados na literatura. Destaque nas boas: estabilidade oxidativa e viscosidade cinemática medidas.

## CONCLUSÕES

Neste foi possível avaliar a gordura de frango como um resíduo com ótimas características para a síntese de biodiesel. Além de se colocar em prática um conceito que vem ganhando destaque nas publicações de engenharia e enzimática: a combinação de lipases.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à UNILAB, pelo fomento do projeto. Ao professor Aluísio e técnicos do ICEM pela disponibilização de equipamentos e ajuda, bem como a própria técnica do IEDS pelo suporte. Agradecimentos ao NUTEC e ao professor Felipe Maia pela receptividade e pela realização ou

acompanhamento de alguns procedimentos.

## REFERÊNCIAS

- 1] ALPTEKIN, Ertan; CANAKCI, Mustafa. Optimization of pretreatment reaction for methyl ester production from chicken fat. **Fuel**, v. 89, n. 12, p. 4035-4039, 2010.
- ALVES, Joana S. et al. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts. **RSC Advances**, v. 4, n. 14, p. 6863-6868, 2014.
- AMOA, Jerome et al. Lipase cocktail for efficient conversion of oils containing phospholipids to biodiesel. **Bioresource technology**, v. 211, p. 224-230, 2016.
- ATABANI, Abdelaziz E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070-2093, 2012
- BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.
- [4] CHIU, Ming Chih; GRIMALDI, Renato; GIOIELLI, Luiz Antonio. Fracionamento a seco da gordura de frango em escala piloto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 421-434, 2007.
- DU, Wei et al. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1-6, p. 68-71, 2005.
- [2] FAYYAZI, E. et al. An ultrasound-assisted system for the optimization of biodiesel production from chicken fat oil using a genetic algorithm and response surface methodology. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 26, p. 312-320, 2015.
- GEBREMARIAM, S. N.; MARCHETTI, J. M. Economics of biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 168, p. 74-84, 2018
- .GOSWAMI, Amrit; GOSWAMI, Jonali. DMSO-triggered enhancement of enantioselectivity in Novozyme [435]-catalyzed transesterification of chiral 1-phenylethanol. **Tetrahedron letters**, v. 46, n. 25, p. 4411-4413, 2005.
- HASAN, Fariha; SHAH, Aamer Ali; HAMEED, Abdul. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1.: **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**, 3. ed. Sao Paulo: IMESP, 1985. p. 245-246.
- KADIR, Wan Nadiyah Amalina et al. Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 171, p. 1416-1429, 2018.
- KAPOOR, Manali; GUPTA, Munishwar Nath. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.
- KIRUBAKARAN, M.; SELVAN, V. Arul Mozhi. A comprehensive review of low cost biodiesel production from waste chicken fat. **Renewable and Sustainable Energy reviews**, v. 82, p. 390-401, 2018.
- [6] KOSTECKA, Magdalena et al. Properties and oxidative stabilities of enzymatically interesterified chicken fat and sunflower oil blend. **Journal of oleo science**, v. 62, n. 11, p. 893-900, 2013.
- KRAUZE, Laíza Canielas. Desenvolvimento do processo de produção de biodiesel de origem animal. 2008. 147f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2008.
- LE JOUBIOUX, Florian et al. The control of Novozym® 435 chemoselectivity and specificity by the solvents in acylation reactions of amino-alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 95, p. 99-110, 2013.
- [5] METROHM, A. G. Oxidative stability of oils and fats-Rancimat method. **Metrohm application bulletin No**, v. 204, p. 1-4, 1993.
- [3] PANNEERSELVAM, Selva Ilavarasi; PARTHIBAN, R.; MIRANDA, Lima Rose. Poultry fat—a cheap and viable source for biodiesel production. In: **Proceedings of the 2nd International Conference on Environmental Science and Technology IPCBEE**. Singapore: IACSIT Press. 2011. p. V1.



- POURZOLFAGHAR, Hamed et al. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 245-257, 2016.
- QIAO, Hanzhen et al. Optimisation of combi-lipases from *Aspergillus niger* for the synergistic and efficient hydrolysis of soybean oil. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 5, p. 772-780, 2017.
- RAMOS, Luiz P. et al. Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis. Rev. **Virtual Quim**, v. 9, p. 317-369, 2017.
- REN21, Renewables et al. Global status report. **REN21 secretariat**, Paris, 2016.
- RUEDA, Nazzoly et al. Reactivation of lipases by the unfolding and refolding of covalently immobilized biocatalysts. **RSC Advances**, v. 5, n. 68, p. 55588-55594, 2015.
- SANGALETTI, Naiane et al. Enzymatic transesterification of soybean ethanolic miscella for biodiesel production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 11, p. 2098-2106, 2013.
- SOUZA, Maria Cristiane Martins de. Imobilização de lipase de *Candida Antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres. 2013. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2013.