

Mohamed Ziad Dabaja
Universidade Federal de Alfenas
spfc_mohamed@hotmail.com

Bárbara de Mello Bizzo
Universidade Federal de Alfenas
barbarabizzo@outlook.com

Ernandes Benedito Pereira
Universidade Federal de Alfenas
ernandes.pereira@unifal-mg.edu.br

SÍNTESE DE BIODIESEL A PARTIR DO ÓLEO DE AÇAÍ EMPREGANDO LIPASE COMERCIAL IMOBILIZADA EM SUPORTE DE BAIXO CUSTO

RESUMO

Para suprir a crescente demanda mundial energética, em um contexto de grandes preocupações sobre as questões ambientais e a escassez das reservas dos combustíveis fósseis e, além do interesse pela independência energética, investe-se na pesquisa e em formas alternativas de energia. Dentre essas alternativas, o biodiesel destaca-se por ser um combustível renovável produzido utilizando-se fontes naturais. As análises da matéria-prima, como a densidade, a viscosidade e a massa molar média, foram realizadas previamente ao processo de síntese. Este trabalho consiste na produção de biodiesel a partir de óleo de açaí empregando lipase comercial imobilizada em suporte de baixo custo. A síntese de biodiesel alcançou um rendimento de 51,49% em 12h de reação.

Palavras-chave: Biodiesel. Lipase AK. Óleo de açaí. Polihidroxibutirado (PHB).

THE PRODUCTION OF BIODIESEL FROM ACAI OIL EMPLOYING COMMERCIAL LIPASE IMMOBILIZED IN LOW COST SUPPORT

ABSTRACT

To meet the growing world energy demand, in a context of great concerns about environmental issues, the shortage of fossil fuels' reserves, and also with interest in energy independence, there is a large investment in researches and developments of alternatives for energy supply. Among the alternatives, biodiesel stands out because of its characteristics, for example, it is made from renewable raw material, is biodegradable. Raw material characterization, such as acidity index, density, viscosity and average molar mass were carried out before the synthesis process. This work consists of the production of biodiesel from açaí oil using commercial lipase immobilized in support of low cost. The biodiesel synthesis achieved a yield of 51.49% in 12 hours of reaction.

Keywords: Biofuel. Lipase AK. Açaí oil. Polyhydroxybutyrate (PHB).

Recebido em: 05/02/2017 - Aprovado em: 16/07/2018 - Disponibilizado em: 15/12/2018

1. INTRODUÇÃO

Já faz um tempo que o cenário mundial está voltado para o desenvolvimento de novos combustíveis capazes de suprir a demanda mundial energética. Com o aumento acelerado da população mundial e, conseqüentemente, alto consumo de energia, as principais fontes energéticas (reservas de petróleo) estão se esgotando cada vez mais rápido. Em razão desta situação o biodiesel vem sendo uma das principais alternativas para a solução deste irreversível problema. O biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e sua queima é mais limpa que o diesel (MOTHÉ, 2005). Sua constituição é uma mistura de ésteres etílicos ou metílicos extraídos de ácidos graxos, obtidos pela transesterificação de quaisquer triglicerídeos com álcool de cadeia curta (metanol ou etanol). Pode ser obtido a partir de óleos vegetais, gorduras animais ou qualquer outra fonte de ácidos graxos (OSAKI, 2008). Além disso, o biodiesel apresenta uma série de vantagens técnicas em relação ao diesel mineral: prolonga a vida do motor, apresenta melhor lubrificidade, baixo risco de explosão, biodegradável, e, é claro, a baixa emissão de gases poluentes durante sua queima. Entretanto, o biodiesel também apresenta suas desvantagens, possuindo maior viscosidade e alto custo para sua produção (MOTHÉ, 2005). Em virtude da maior quantidade de vantagens financeiras e ambientais é que hoje, pode se substituir diesel por biodiesel.

O Brasil é considerado hoje um dos países com maior potencial para a produção do biodiesel devido suas ótimas condições

climáticas e grande área territorial. Entretanto, dois fatores dificultam o progresso do biodiesel no Brasil e no mundo: a redução no preço do petróleo e seu elevado custo de produção. Além disso, o Brasil possui um programa nacional que permite a substituição total ou parcial, do diesel presente em grande parte da frota veicular nacional (KOHLHEPP, 2010). Basicamente, o biodiesel é obtido a partir de uma reação de transesterificação química ou enzimática. Este processo consiste na conversão de triglicerídeos a ésteres de ácidos graxos e glicerina, através da reação com álcoois, na presença ou não, de um ácido ou de uma base forte ou enzima. Como produtos finais são obtidos os ésteres (biodiesel) e a glicerina (BRANCO, 2007). A transesterificação pelo processo químico é mais simples, rápida e com alto rendimento, entretanto, ao final do processo, o catalisador utilizado permanece misturado com a glicerina e dificulta a sua separação e purificação. Já na produção via enzimática, o biocatalisador pode ser reutilizado e o produto apresenta maior pureza. Também se deve atentar quanto ao tipo de álcool (etanol ou metanol) utilizado no processo. O etanol é o mais adequado por ser independente do petróleo, é menos tóxico e apresenta menor custo financeiro (NASCIMENTO, 2001). Portanto, este trabalho teve como objetivo principal estudar a síntese de biodiesel utilizando a reação de transesterificação enzimática catalisada por lipase comercial imobilizada em suporte de baixo custo, a partir do óleo de açaí e álcool de cadeia curta (etanol).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Lipase de *Pseudomonas fluorescens* (AK) e o polihidroxibutirato (PHB) de grau de pureza analítico foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. Quanto ao substrato foi utilizado o extrato de óleo de açaí que foi adquirido de uma empresa comercial. Como materiais de partida foram utilizados: solventes (acetona, álcool etílico, hexano, éter); sais (fosfato bibásico e monobásico de potássio, periodato de sódio); ácidos (sulfúrico, nítrico, fosfórico); bases (hidróxido de potássio e de sódio); emulsificantes (goma arábica em pó); indicadores (fenolftaleína, azul de bromotimol); entre outros reagentes necessários para as reações enzimáticas.

Tratamento do Suporte PHB e Imobilização da Lipase AK por Adsorção Física

Na primeira etapa do experimento, pesou-se 1g de PHB em tubo falcon, em seguida foram adicionados 10 mL de álcool anidro. A mistura foi homogeneizada e colocada em shaker a 25°C/ 30 min, numa agitação de 125 rpm. Após 30 minutos, foi feita a filtração a vácuo da solução de PHB e álcool, lavando com 250 mL de água destilada. Numa segunda etapa, o suporte previamente tratado foi colocado novamente em outro tubo falcon com 20 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM e pH 7,0. A esta solução foram adicionados diferentes carregamentos de lipase AK (5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg). Após essa etapa, foi colocado em shaker orbital, a 150 rpm e 25°C em processo overnight. Após 12h de contato, realizou a filtração a vácuo dessa solução, estocando o filtrado e também o

sobrenadante para posterior análise da atividade hidrolítica e proteína.

Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade enzimática da lipase nas formas livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise da emulsão de 50g de azeite de oliva e 50g de solução de goma arábica a 7% (m/m), conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH (0,02M), utilizando fenolftaleína como indicador. Em frascos de erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 5 mL da emulsão, 4,9 mL de solução tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0 e adicionados 0,1g do derivado imobilizado ou 0,1 mL de sobrenadante ou da enzima livre. Os frascos foram incubados a 37°C por 5 min, em banho termostaticado com agitação de 200 rpm. Após o período de incubação, a reação foi paralisada com a adição de 10 mL de uma solução de etanol/acetona (1:1). Em seguida, titularam-se todas as amostras contidas nos erlenmeyers com uma solução de KOH 20 mM, utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade internacional (UI) de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio.

Propriedades catalíticas da lipase livre e imobilizada

A lipase na forma livre e imobilizada foi caracterizada quanto à sua atividade total em função do pH e da temperatura mantendo fixo a concentração da enzima e agitação. A influência do pH e da temperatura na atividade da lipase

livre e imobilizada foram estudadas utilizando-se a reação de hidrólise na faixa de pH entre 4 a 8, e na temperatura de 35 a 60°C. O objetivo deste conjunto de testes foi determinar a melhor combinação das variáveis para a obtenção máxima de ácidos graxos livres (AGL). As reações de hidrólise foram realizadas de acordo com metodologia de Soares et al. (1999).

Caracterização da matéria-prima e do produto formado (biodiesel)

Densidade

As densidades foram medidas em temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e para tal, as amostras foram pesadas em balões volumétricos de 10 mL. Após a pesagem, a densidade foi determinada utilizando a relação entre massa medida (em balança analítica com quatro casas de precisão) e o volume do balão utilizado (previamente aferido com água bidestilada à temperatura de 25°C). O procedimento de medida para todas as amostras foi realizado em triplicata, obtendo um valor de densidade média e seu respectivo desvio padrão (σ). Paralelamente foi feita uma medição com o picnômetro (BROCK et al, 2008). Os picnômetros foram calibrados com água e posteriormente utilizados na determinação das densidades das amostras de biodiesel em triplicata.

Viscosidade

Para a determinação da viscosidade do óleo de açaí e do biodiesel (monoésteres de ácidos graxos) foi utilizado um viscosímetro da marca Brookfield. O instrumento é equipado com cilindros de diâmetros diferentes (spindles),

em que é utilizado o cilindro adequado conforme a viscosidade do fluido.

Reação de transesterificação enzimática do extrato de óleo de açaí em etanol

Baseado em trabalhos já realizados em nosso grupo de pesquisa para a produção de biodiesel, foi adotada uma razão molar 1:9 de óleo de açaí/ álcool em um meio reacional de 30g (m/m). Para isto foi necessário quantificar os ácidos graxos que compunham os óleos em análise. Conhecida a quantidade de ácidos graxos, selecionaram-se aqueles com maiores concentrações para determinar a concentração molar de ácidos graxos e dos óleos.

Cada reação foi conduzida sobre agitador magnético em reatores de vidro acoplados a um banho térmico e a um condensador, controlando os fatores de cada ensaio (temperatura, massa de enzima, massa de óleo e massa de etanol). As reações foram monitoradas durante 12 h para se ter um panorama melhor da conversão dos triglicerídeos em ésteres etílicos, sendo retiradas amostras aos tempos de 6 e 12 h. As amostras provenientes de cada ensaio foram armazenadas no freezer. Ao final dos ensaios as amostras foram enviadas para análise de viscosidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do Óleo de Açaí em Ácidos Graxos

Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triglicerídeos e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes. Os óleos e gorduras naturais podem ser o único

constituente de um produto ou podem fazer parte da mistura de diversos constituintes em um composto. Existem casos, entretanto, que se torna necessário modificar as características desses materiais, para adequá-los a uma determinada aplicação. Portanto, o setor industrial de óleos e gorduras tem desenvolvido diversos processos para manipular a composição das misturas de triglicerídeos (CASTRO et al., 2004). A composição em ácidos graxos de uma determinada matéria prima lipídica é dependente do tipo de espécie de oleaginosa e influenciada por fatores climáticos e regionais.

As composições em ácidos graxos de óleo de açaí são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição do óleo de açaí

Ácido Graxo	% (m/m)	Massa Molar	MM parcial
Palmítico	22,0	256,42	5641,24
Palminolêico	2,00	254,40	508,80
Esteárico	2,00	284,47	568,94
Oléico	60,00	282,46	16947,60
Linolêico	12,00	280,44	3365,28
Araquídico	2,50	282,55	706,37

$$MM_{AC} = \frac{\sum(\%_i \times M_{mi})}{\sum\%_i} = \frac{27738,23}{100,5} = 276,00 \text{ g/mol};$$

$$MM_{\text{óleo}} = 3(MM_{AC}) + 38 = 866,00 \text{ g/mol}$$

Com relação à composição em ácidos graxos (Tabela 1), os perfis de ácidos graxos das amostras indicam uma composição bem diversificada que permitirá verificar a atuação dos catalisadores em termos de seletividade de reação. Além disso, a estrutura molecular dos ésteres alquílicos varia segundo as características estruturais dos ácidos graxos dos óleos vegetais precursores do biodiesel. O tamanho e o número de insaturações da cadeia carbônica são também fatores determinantes de algumas propriedades do biodiesel. Pode observar que a elevação do número de cetano, calor de combustão e dos

pontos de fusão e ebulição do combustível são reflexos do aumento do comprimento da cadeia carbônica dos ésteres. O aumento do número de insaturações ocasiona uma diminuição da estabilidade oxidativa, além de diminuir também os valores do calor de combustão, do número de cetano e dos pontos de fusão e ebulição.

De acordo com a Tabela 1, a maior proporção em ácidos graxos foi de 60% de ácido oléico. Essa característica do óleo de açaí pode facilitar a reação de transesterificação, pois os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que interagem mais eficaz e efetivamente com o agente acilante e com o catalisador.

De acordo com Knothe (2005), a determinação da composição em ácidos graxos das diversas matérias primas influencia na qualidade do biodiesel gerado. Algumas das características estruturais que influenciam nas propriedades do biodiesel originado são: o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a presença de ramificações.

Caracterização do Biocatalisador

Determinação do Teor de Proteína

O conteúdo de proteína da lipase solúvel foi determinado pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976) e o valor encontrado para a lipase AK na sua forma livre foi de 68 mg de proteína/g de pó.

Efeito do carregamento inicial de proteína

O efeito de carregamento inicial de proteína foi estudado com o intuito de obter um biocatalisador com alta retenção de proteína e atividade catalítica. Conforme estudos realizados por Dabaja et al. (2013) e Bezerra et al. (2013), o

carregamento com maior atividade e máxima concentração de enzima foi uma concentração de 30 mg delipase AK/g de PHB e atividade hidrolítica específica atingiu 190,80 U/g, conforme Figura 1.

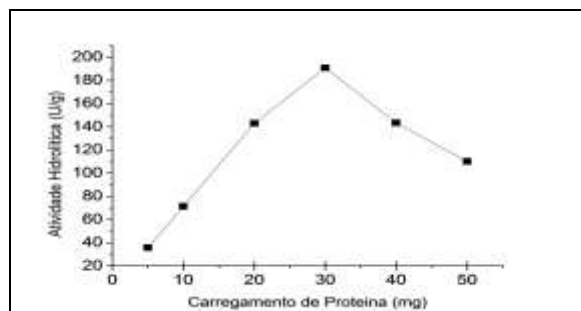


Figura 1 – Influência do carregamento inicial de proteína nas propriedades catalíticas da lipase AK.

As concentrações avaliadas foram 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 30,0 e 40,0 mg/g de suporte. A metodologia escolhida para comprovação do melhor carregamento foi realizada pela avaliação do sobrenadante, no qual se obtém a curva de rendimento da atividade hidrolítica teórica. Foram feitas duas análises: primeiramente com o sobrenadante (tampão e enzima) anterior à imobilização, avaliando a enzima livre em solução; e a outra analisando o sobrenadante após a retirada do derivado imobilizado, verificando a capacidade de retenção do PHB e capacidade catalítica da enzima, conforme mostrado na Tabela 2 e Figura 2.

Tabela 2 - Atividades hidrolíticas inicial e final, na análise do sobrenadante (proteína livre), em função dos diferentes carregamentos de proteína para imobilização em PHB.

Carregamento (mg/g)	AH Inicial (U/g)	AH Final (U/g)	AH Teórica (U/g)
2,50	413,47	80,65	332,82
5,00	917,80	291,03	626,77
10,00	1798,67	839,57	959,10
15,00	2123,63	1119,94	1003,70
30,00	4446,89	3335,47	1111,42
40,00	5768,85	4636,07	1132,79

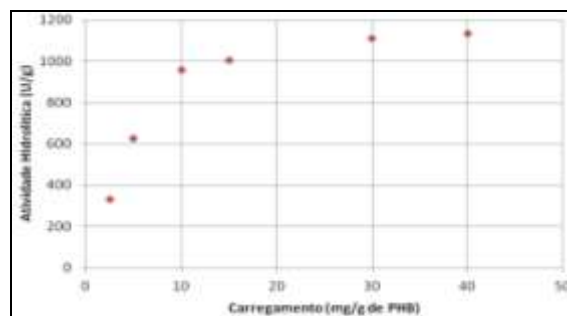


Figura 2 - Comportamento hidrolítico da lipase livre, antes e depois da imobilização, de acordo com os diferentes carregamentos de proteína (mg/g de PHB).

Analisando a Figura 2, comprovou que o melhor carregamento foi o de 30 mg, apesar que o carregamento de 40 mg, a atividade hidrolítica foi considerado praticamente igual.

Utilizando somente a concentração de 30 mg de proteína, obteve-se o valor de 413 U/g, no método de hidrólise do azeite (SOARES et al., 1999). Este rendimento foi superior que o de Dabaja et al. (2013) e Bezerra et al. (2013).

Na avaliação do sobrenadante resultante da imobilização com PHB não havia atividade hidrolítica quantificável por titulação com NaOH, indicando máxima eficiência de imobilização.

Mendes (2009) identificou que a atividade hidrolítica real é inferior à teórica, devido à existência de agentes protetores de enzima, presentes no pó comercial e, por consequência, na solução com enzima livre. Além disso, quando imobilizada, a enzima forma ligações diversas com o suporte, que podem distorcer ou inibir a ação dos sítios ativos das enzimas.

Propriedades da Lipase Livre e Imobilizada

A principal característica das enzimas é catalisar as reações químicas e biológicas que

ocorrem nos seres vivos, sendo que sua função catalítica baseia-se na medida quantitativa da velocidade da reação em que participam. Devido à sua natureza protéica são altamente sensíveis às variações de pH, temperatura, concentração da própria enzima, entre outros. Portanto, o conhecimento da atuação desses parâmetros sobre a reação enzimática permite o melhor emprego das propriedades catalíticas das enzimas. Qualquer que seja o método de imobilização de enzimas deseja-se preservar, tanto quanto possível, a atividade biocatalítica e a especificidade da enzima. Apesar da superioridade das enzimas imobilizadas sobre as livres, o processo de imobilização pode modificar a cinética e as propriedades físico-químicas da enzima, normalmente, reduzindo sua atividade específica. Para verificar as alterações causadas nas propriedades originais da lipase livre, foi determinada a influência do pH e temperatura na atividade enzimática da lipase livre e imobilizada.

Influência do pH

As enzimas somente são ativas numa faixa restrita de pH e na maioria dos casos há um pH ótimo definido. O efeito do pH sobre a enzima deve-se às variações no estado de ionização dos componentes do sistema à medida que o pH varia. Como as enzimas são proteínas que contém muitos grupos ionizáveis, elas existem em diferentes estados de ionização, por isso, a atividade catalítica é restrita a uma pequena faixa de pH (PEREIRA, 1999 *apud* HARTMEIER, 1988). As enzimas imobilizadas também apresentam o comportamento típico das enzimas livres, porém o perfil de pH da enzima solúvel e imobilizada nem sempre coincide, uma

vez que o processo de imobilização pode induzir a mudanças conformacionais, bem como alterar o estado de ionização e dissociação da enzima e seu macroambiente. Nos métodos de imobilização de enzimas, quando o suporte tem uma carga elétrica o comportamento cinético da enzima imobilizada pode diferir daquele observado para a enzima solúvel, mesmo na ausência de efeitos difusionais. Esta diferença deve-se às interações eletrostáticas no microambiente das enzimas imobilizadas serem diferentes das existentes em solução (macroambiente) (PEREIRA, 1999 *apud* HARTMEIER, 1988; ZANIN, 1989).

Na Figura 3 apresentam-se os resultados obtidos no estudo da atividade da lipase livre e imobilizada em diferentes pHs.

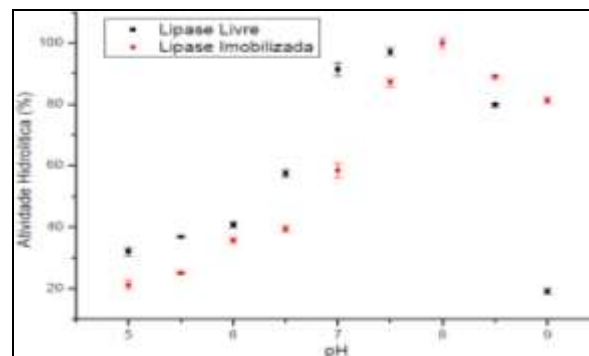


Figura 3 - Influência do pH na atividade hidrolítica da lipase AK livre e imobilizada em PHB.

Observa-se na Figura 3 que a lipase AK na sua forma livre e imobilizada apresentam atividade máxima em pH igual a 8,0. Geralmente, o processo de imobilização confere uma maior estabilidade ao pH à enzima imobilizada, uma vez que em pH 5,0 a enzima imobilizada ainda apresentava cerca de 20% de atividade. Este fato corrobora o observado na literatura, que em muitos casos o processo de imobilização atua no sentido de aumentar a estabilidade ao pH (PEREIRA et al., 2001).

Na lipase livre, a atividade hidrolítica diminuiu a partir de pH 8,0, sendo que é possível inferir que sua faixa ideal está entre pH 7,0 e 8,0, onde seu rendimento é sempre superior a 90 %. A melhor atividade hidrolítica atingiu 7000 U/g de pó (atribuída eficiência de 100%). Após o seu pico de máxima expressão catalítica, a lipase livre perde funcionalidade de forma considerável, considerando que pequenas alterações no pH comprometeram sua ação catalítica na hidrólise do azeite de oliva.

Na lipase imobilizada, o crescimento da curva de rendimento catalítico apresentou um comportamento logarítmico contínuo até o ponto de máximo, em pH 8,0, situação em que a atividade hidrolítica mensurada chegou a 24409 U/g de pó (atribuída eficiência de 100%).

O desempenho da lipase imobilizada foi superior ao da lipase livre, uma vez que a menor atividade verificada da enzima imobilizada foi em pH 5,0, situação em que foi quantificado 6872 U/g, contra 2248 U/g medido para o mesmo pH, quando a enzima encontrava-se livre em solução. A mesma situação foi verificada nos valores com maior rendimento de atividade, pois quando o pH era 8,0, a atividade hidrolítica medida para a enzima imobilizada era 24409 U/g, contra 7000 U/g medido no mesmo pH, porém com a enzima livre.

De acordo com a literatura para a lipase AK (*P. fluorescens*) imobilizada em quitosana também não foi observada mudança de pH ótimo de atuação em relação à enzima livre (ITOYAMA et al., 1994).

Influência da Temperatura

A influência da temperatura sobre a

atividade da enzima livre ou imobilizada é, geralmente, representada em termos de atividade ou velocidade de reação em função da temperatura. A dependência da temperatura na atividade enzimática foi investigada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, numa faixa de temperatura entre 30 a 70 °C. Na Figura 4 estão apresentadas as temperaturas ótimas de atuação da lipase livre e da imobilizada obtida neste trabalho.

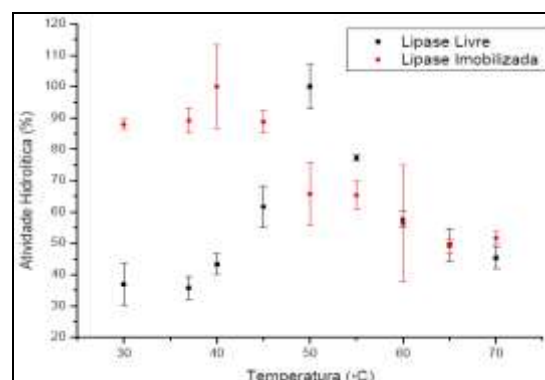


Figura 4 - Influência da temperatura na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em PHB. Hidrólise do azeite de oliva por 5 minutos em pH 7,0.

Observa-se na Figura 4 que a máxima atividade da lipase livre ocorreu a 50 °C quando alcançou 6883 U/g de pó (100% de Atividade Relativa), enquanto a lipase imobilizada em PHB apresentou uma atividade máxima igual a 172,78 U/g suporte seco a 40°C. Nesse caso, o processo de imobilização não atuou no sentido de aumentar a temperatura ótima da enzima, não sendo favorável, pois quanto maiores as temperaturas de operação menores são os riscos de contaminação microbiana, mas pode ocorrer o fenômeno de desnaturação térmica da enzima.

No caso da lipase imobilizada, a expressão da atividade foi mais lenta, sendo que na faixa de temperatura de 30 a 45°C, sua variação em eficiência catalítica ficou entre 88%

a 100%. A máxima atividade hidrolítica foi em 40°C, onde a com atividade medida foi de 23497 U/g de pó (100% de atividade relativa). Dentro da faixa de temperatura ideal, a enzima imobilizada apresenta-se funcional, uma vez que a oscilação de sua eficiência é imperceptível, permitindo inferir que a enzima é estável nas alterações de temperatura durante a reação de transesterificação.

Associado a esta característica positiva, da mesma forma que nas análises de pH, a avaliação da atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada, considerando os valores reais expresso em “U/g”, o desempenho da enzima imobilizada é superior ao da enzima livre. Uma vez que a menor atividade verificada da enzima imobilizada foi na temperatura de 65°C, situação em que foi quantificado 11529 U/g, contra 2537 U/g medido para a temperatura de 30°C, quando a enzima encontrava-se livre em solução. A mesma situação foi verificada nos melhores valores de rendimento de atividade, pois quando a temperatura era de 40°C, a atividade hidrolítica medida para a enzima imobilizada foi de 24409 U/g, contra 7000 U/g medido no mesmo pH, porém com a enzima livre.

Na literatura são encontrados exemplos de alteração da temperatura ótima da enzima livre e imobilizada tanto no sentido de aumento como diminuição. Por exemplo, a enzima amiloglicosidase apresentou ótimos diferentes em função do tipo de substrato (amido, milho, batata, mandioca, entre outros) e do suporte empregado na imobilização (ZANIN, 1989; ZANIN e MORAES, 2004).

Síntese do Biodiesel

A produção de ésteres etílicos (biodiesel) por via enzimática envolve um mecanismo complexo dependente do tipo de substrato, enzima, solvente orgânico e concentração do meio reacional. Para verificar a atividade catalítica da preparação de lipase imobilizada em PHB, inicialmente foi realizado um teste preliminar mantendo condições fixas de temperatura, massa de biocatalisador e razão molar do óleo/ álcool baseado em estudos já pesquisados na literatura (BARON, 2008; SILVA, 2010 e SILVA, 2011).

A reação de transesterificação ocorreu em reatores de bancada a uma temperatura constante de 45°C, mantido por um banho térmico, e sob agitação mecânica constante, conforme ilustrado na Figura 5 e 6. Além disso, a reação de transesterificação ocorreu por um período de 48h e as amostras retiradas nos intervalos de tempo de 6 e 12h de reação e analisadas em viscosímetro. Após os tempos pré-determinados, as amostras foram coletadas e purificadas, sendo removidos: o derivado imobilizado, a glicerina, o etanol e medindo a umidade.



Figura 5 – Ilustração do meio reacional para produção de biodiesel

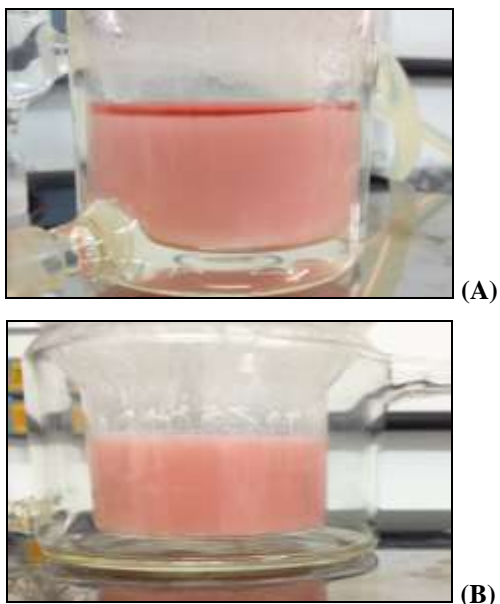


Figura 6 - Fotos das amostras nos tempos de 6 h (foto A) e 12 h (foto B).

Observa-se na Figura 6 que no tempo de 6 h (foto A) foi possível visualizar uma pequena película de biodiesel, enquanto no tempo de 12 h (foto B) essa película não formou. Pode-se concluir então, que a reação de transesterificação a partir do óleo de açaí utilizando lipase AK imobilizada teve seu rendimento total nas primeiras 6 h de reação.

Foi feita a análise de viscosidade do biodiesel obtido do óleo de açaí, onde foi verificado que a viscosidade do óleo de açaí bruto foi de 32,39 cp, e o do produto final (biodiesel) foi de 16,37cp, indicando que houve formação de biodiesel com uma conversão de aproximadamente 51,49%, num período de 12h. Isso indica que seria necessário um tempo maior para atingir o 100% de conversão em ésteres etílicos (biodiesel).

4. CONCLUSÃO

O estudo sobre a imobilização da lipase AK em PHB para a produção de biodiesel, com o uso do óleo de açaí como matéria prima para a

transesterificação, permitiu confirmar que: a) a composição diversificada de ácidos graxos do óleo de açaí o faz matéria prima de grande interesse para a produção de biodiesel, sendo o ácido graxo quantificado em maior concentração foi o ácido oléico (60% m/m); além disso, os ácidos graxos quantificados têm cadeia relativamente curta e interagem mais eficaz e eficientemente com o agente acilante e com o catalisador; b) o carregamento de 30 mg de enzima apresentou melhor atividade catalítica (413 U/g) quando comparado com os dados da literatura e, devido à ausência de atividade catalítica no sobrenadante, tem-se que a imobilização foi máxima; c) a lipase imobilizada apresentou maior estabilidade à variação de pH, sendo 8,0 o pH ótimo; d) a lipase imobilizada apresentou atividade catalítica máxima em menor temperatura (30 a 45°C) que quando em sua forma livre (50°C), todavia, quando a temperatura era de 40°C, a atividade hidrolítica medida para a enzima imobilizada foi de 24409 U/g, contra 7000 U/g medido no mesmo pH com a enzima livre, o que evidencia melhor eficiência da forma imobilizada; e) a produção do biodiesel apresentou taxa de conversão igual a 51,49%, porém pode-se inferir que essa taxa seria maior se tal processo fosse mais longo.

5. AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e UNIFAL-MG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

BARON, A. M. **Preparação e Caracterização de Lipases Imobilizadas para a Utilização em**

- Biocatálise**. 2008. 138f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008.
- BEZERRA, P. H. A.; HIRATA, D. B.; PEREIRA, E. B. Aplicação de lipase AK comercial de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte PHB na síntese de bioaromas. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Edição 2013, 2013, Alfenas. **Anais...** Disponível em: <<http://www.unifal-mg.edu.br/prppg/trabalhosSIC2013>>. Acesso em: 25 Nov. 2015.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, 1976.
- BROCK, J. et al. Determinação experimental da viscosidade e condutividade térmica de óleos vegetais. **Ciênc. Tecnol. Aliment. (Campinas)**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 564-570, 2008.
- CASTRO, H. F. et al. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 146-156, Jan/Feb. 2004.
- DABAJA, M. Z.; HIRATA, D. B.; PEREIRA, E. B. Imobilização da lipase AK em PHB e sua aplicação na reação de transesterificação de óleo de açaí. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Edição 2013, 2013, Alfenas. **Anais...** Disponível em: <<http://www.unifal-mg.edu.br/prppg/trabalhosSIC2013>>. Acesso em: 25 Nov. 2015.
- DE CASTRO, H. F. et al. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S. et al. **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência; UFRJ: CAPES: FAPERJ, 2008, cap. 6, p.123-151.
- ITOYAMA, K.; TOKURA, S.; HAYASHI, T. Lipoprotein lipase immobilization onto porous chitosan beads. **Biotechnology Progress**, v. 10, n. 2, p 225 – 229, Mar/Apr. 1994.
- KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structures of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059 – 1070, 2005.
- MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009 194 f., Tese (Doutorado Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- NASCIMENTO, R. J. S. et al. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 498-502, Jun. 2008.
- OSAKI M.; BATALHA, M. O. Produção de biodiesel e óleo vegetal no Brasil: Realidade e Desafio. **Organizações Rurais & Industriais**, v. 13, n. 2, 2011. Disponível em: <revista.dae.ufla.br/index.php/ora/article/view/349>. Acesso em: 08 Nov. 2015.
- PEREIRA, E. B. **Lipase Livre e Imobilizada em Quitosana: Caracterização e Potencial de Aplicação em Reações de Hidrólise e Síntese**. 1999. 128 f. Tese (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Maringá. Maringá. 1999.
- ROGEZ, H. Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação. Belém: **EDUFPA** – Editora da Universidade Federal do Pará, 313p., 2000.
- SILVA, A.E. **Estudo do Processo Enzimático de Produção de Biodiesel a partir de Óleos e Gorduras Residuais de Fritura**. 2010. 62f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.
- SILVA, G. DOS S. et al. Desempenho de diferentes lipases imobilizadas na síntese de biodiesel de óleo de palma. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 2, p. 197-203, Maringá. 2011.
- SOARES, C. M. F. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, p. 745-757, 1999.
- ZANIN, G. M. **Sacarificação do amido em reator de leito fluidizado com enzima Amiloglicosidase imobilizada**. 1989. 78f. Tese (Doutorado Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1989.
- ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. **Enzimas Imobilizadas**. In: Said, S., Pietro, R. C. L.. (Org.). **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. 1a ed. Ribeirão Preto: Legis Summa Ltda, v. 1, p. 35-85. 2004.
-
- Mohamed Ziad Dabaja**
Graduado em Biotecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Laboratório de Bioprocessos.
-
- Bárbara de Mello Bizzo**
Graduada em Biotecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Laboratório de Bioprocessos.
-
- Ernandes Benedito Pereira**
Professor Doutor Associado na Universidade Federal de Alfenas, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química.
-