



Biomassa como catalisador na síntese de biodiesel

Biomass as a catalyst in biodiesel synthesis

Euzébio Marcelo Leandro Silva¹, Taynná Cristina da Cunha Ferreira², Márcio Eduardo Berezuk³, Milena Martins Andrade⁴

RESUMO

Lipases são enzimas utilizadas em diversos setores industriais devido sua versatilidade em catalisar reações químicas. Geralmente, estas enzimas são utilizadas em sua forma imobilizada. Neste trabalho, a biomassa proveniente da produção de lipases pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi utilizada como catalisador, sendo que estas enzimas estão naturalmente imobilizadas na biomassa. A biomassa foi produzida por fermentação submersa utilizando-se torta de soja e glicerol durante cinco dias a 180 rpm e 28°C. A atividade enzimática da biomassa foi determinada pelo método pNPP. A reação de esterificação do óleo de soja foi realizada utilizando-se um reator de aço inox contendo um copo de teflon. A condição avaliada foi de diferentes proporções óleo:álcool e temperaturas distintas. A biomassa como catalisador se mostrou eficiente, com máximo de rendimento de 48% em ésteres. A biomassa de *B. ribis* EC-01 se mostrou promissora e viável para ser aplicada como catalisador, necessitando de ajuste nas condições de reação para aumentar a conversão em ésteres.

PALAVRAS-CHAVE: biocatalisador; biomassa fúngica; esterificação; transesterificação.

ABSTRACT

Lipases are enzymes used in various industrial sectors due to their versatility in catalyzing chemical reactions. Typically, these enzymes are used in their immobilized form. In this study, biomass from the production of lipases by the fungus *Botryosphaeria ribis* EC-01 was used as a catalyst, as these enzymes are naturally immobilized in the biomass. The biomass was produced through submerged fermentation using soybean cake and glycerol for five days at 180 rpm and 28°C. The enzymatic activity of the biomass was determined using the pNPP method. The esterification reaction of soybean oil was carried out using a stainless-steel reactor containing a Teflon cup. Different oil alcohol ratios and temperatures were evaluated, and the biomass as a catalyst proved to be efficient, with a maximum yield of 48% in esters. The biomass of *B. ribis* EC-01 showed promise and feasibility as a catalyst, requiring adjustments in reaction conditions to increase conversion into esters.

KEYWORDS: biocatalyst; fungal biomass; esterification; transesterification.

INTRODUÇÃO

O crescente desenvolvimento sociotecnológico, adjunto do aumento da população mundial, tem resultado em uma maior demanda de energia e drástico aumento da poluição. Assim, uma busca por fontes alternativas de energia, limpas e renováveis, tem aumentado nos últimos anos. Uma das abordagens promissoras nesse campo envolve a produção de biodiesel. O biodiesel é um biocombustível renovável que pode vir a substituir parcial ou totalmente o diesel derivado de petróleo, reduzindo a dependência de combustíveis fósseis

¹ Bolsista da Fundação Araucária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: euzebio@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 7842010691771940.

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: taynna_cris@hotmail.com. ID Lattes: 2498496207342893.

³ Docente do Magistério Superior e Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: berezuk@utfpr.edu.br. ID Lattes: 4700434717490143.

⁴ Docente do Magistério Superior e Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: milenaandrade@utfpr.edu.br. ID Lattes: 0974988053890754.



e mitigando os impactos ambientais associados a eles (KNOTHE et al., 2006; ŽIVKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2018).

O processo convencional para a produção de biodiesel é a reação de transesterificação de óleos vegetais em presença de um álcool de cadeia curta, como o metanol e um catalisador básico homogêneo como o hidróxido de sódio. Considerando que esse sistema possui alguns problemas como necessidade de purificação dos produtos, tratamento de efluentes, risco de emulsificação, requer matérias-primas de baixa acidez e ausência de água, a catálise enzimática se torna uma alternativa favorável (MONTEIRO; SILVA, 2009; PASHA et al., 2021).

A biocatálise para produção de biodiesel é realizada por lipases que são enzimas glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3) valorizadas devido sua versatilidade e fácil produção, sendo atrativas para aplicações industriais (SHARMA; SHARMA; SHUKLA, 2011). O fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi previamente selecionado como produtor de lipases quando cultivado em diferentes óleos vegetais e glicerol por fermentação submersa (MESSIAS et al., 2009), também produziu lipases em condição submersa utilizando torta de soja (ANDRADE et al., 2013).

A utilização dessas enzimas na transesterificação enzimática para a produção de biodiesel apresenta uma atratividade evidente, uma vez que a biocatálise, em comparação com a catálise química, elimina a necessidade de tratamento de resíduos e simplifica a purificação dos ésteres formados, quando necessário, além disso possibilita uso de diversos tipos de matéria-prima e atua em condições brandas (GHALY et al., 2010). Durante a inoculação do fungo para a produção das lipases, um volume considerável de biomassa é gerado e tratado como um resíduo. Mas o uso desse resíduo como fonte enzimática parece promissor já que a lipase se encontra imobilizada, permitindo a separação da enzima do meio reacional (SABBANI; HEDENSTRÖM; NORDIN, 2006). Portanto, este trabalho teve como objetivo produzir biodiesel catalisado pela biomassa produzida com o fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 por fermentação submersa e analisar a utilização desse resíduo como um catalisador.

METODOLOGIA

OBTENÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa utilizada foi obtida através da produção de lipases por fermentação submersa com o fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308), mantido em BDA (Batata Dextrose Agar) a 4 ± 2 °C que foi transferido do meio de manutenção para placas de Petri contendo BDA e incubadas a 28 ± 2 °C por 120 h. Após o tempo de crescimento, quatro esferas (~0,7 cm) foram retiradas da placa colonizada contendo hifas e inoculadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio líquido composto por 2,37% (m/v) de torta de soja e 4,5 % (v/v) de glicerol, otimizado por Andrade et al. (2013). Os cultivos foram incubados a 28 ± 2 °C, e 180 rpm por 120 h. Após 5 dias foram interrompidos por centrifugação. A biomassa foi separada, liofilizada e triturada para ser usada como biocatalisador (Figura 1).

Figura 1 – Esquema de produção e tratamento da biomassa



Fonte: Elaborado pelos autores.

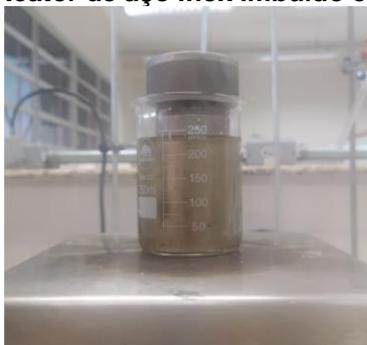
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE

A atividade de lipase contida na biomassa foi determinada utilizando palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP) em meio aquoso, com Triton X-100 (WINKLER, 1979), pH 8,0, temperatura de 55 °C, 2 min e leitura a 410 nm (MESSIAS et al., 2009). Aproximadamente 1 g de biomassa foi utilizada em cada leitura. A unidade de lipase foi definida como a liberação de 1 µmol de pNP por min, por mL da solução de enzima.

PRODUÇÃO DE BIODIESEL

A biomassa fúngica foi utilizada como biocatalisador nas reações de transesterificação/esterificação de óleo de soja para a produção de biodiesel. As reações foram conduzidas em um reator de aço inox imbuído em glicerina que permaneceu todo o experimento sobre um agitador magnético com aquecimento (Figura 2). Ao reator inicialmente foi adicionado 10 g de óleo de soja, 5% de água destilada (m/m) e agitado até homogeneidade num controle de temperatura de 40-50 °C. A proporção de óleo e etanol foi de 1:3 ou 1:5, sendo adicionados em intervalos de 3 a 4h, fracionado em quatro ou seis alíquotas. O tempo reacional foi avaliado foi de 24 e 48 h e a média de temperatura de 56 °C.

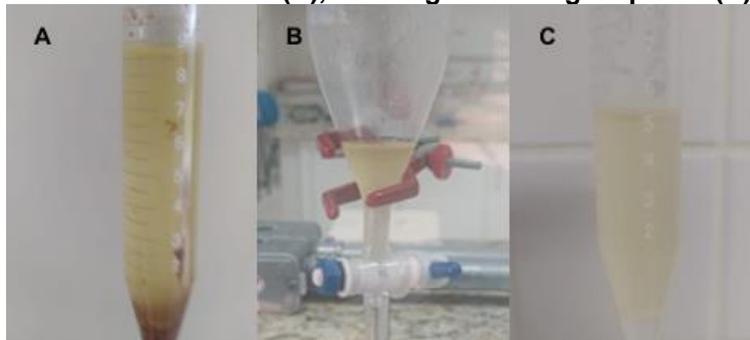
Figura 2 – Reator de aço inox imbuído em glicerina



Fonte: Elaborado pelos autores.

O produto resultante (Figura 3A) foi lavado com água quente em um funil de separação (Figura 3B), adicionado sulfato de sódio anidro e posteriormente centrifugado para separação das fases heterogêneas. A amostra final (Figura 3C) foi levada para análise cromatográfica.

Figura 3 – Produto resultante do reator (A), da lavagem com água quente (B) e amostra final (C)



Fonte: Elaborado pelos autores.

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Os ésteres etílicos de ácidos graxos foram analisados em um cromatógrafo a gás CG-Shimadzu-GC2010-plus acoplado a um MS-QP2010- Ultra também Shimadzu, equipado com uma coluna Restek RT-2560 de 100 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 micra de espessura de filme. A vazão do gás de arraste (He) foi de $1,4 \text{ mL min}^{-1}$. A razão de divisão da amostra foi de $1/50$ com fluxo de purga de 3 mL min^{-1} e as temperaturas do injetor e detector foram 200 e 230°C, respectivamente. A rampa de temperatura da coluna foi de 190 °C durante 1 min, elevando a temperatura para 200 °C a taxa de $1,5 \text{ °C min}^{-1}$ e mantendo a 200 °C por 2 min, em seguida foi elevada para 230 °C na taxa de $1,5 \text{ °C min}^{-1}$, mantendo-se a 230 °C durante 12 min. As áreas dos picos foram determinadas pelo software Star (Varian).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A biomassa foi produzida em meio otimizado por Andrade et al. (2013) para produção de lipases pelo *B. ribis* EC-01 utilizando torta de soja e glicerol. Após a liofilização e trituração (Figura 4), a atividade enzimática foi determinada e esta foi de $21,05 \pm 2,86 \text{ U/g}$.

Figura 4 – Biomassa após liofilização e trituração



Fonte: Elaborado pelos autores.

O biocatalisador foi então aplicado em reações de transesterificação/esterificação e os resultados das duas condições avaliadas são apresentados na Tabela 1.



Tabela 1 – Resultados obtidos nas reações utilizando a biomassa

Experimento	Conversão em ésteres (%)
1 (24 horas, 1:3)	47,96
2 (48 horas, 1:5)	34,45

Fonte: Elaborado pelos autores.

No primeiro experimento que foi conduzido em 24 horas e razão molar óleo:álcool de 1:3 o rendimento obtido foi de 47,96% em ésteres. Para o experimento 2 foi testado um tempo maior e excesso de álcool, mas como pode ser verificado, essas mudanças afetaram negativamente a produção de ésteres, reduzindo para 34,45% a conversão. Castro et al. (2022), utilizando lipases naturalmente imobilizadas e óleo de babaçu alcançou uma conversão de 90% de ésteres.

Tendo em vista os resultados alcançados no experimento 1, utilizando a menor quantidade de álcool e tempo empregado, e ainda, que a biomassa era um resíduo da produção da enzima, o uso desse biocatalisador é promissor e deve ser alvo de novas pesquisas. Neste sistema tem-se a vantagem de não ser necessário a etapa de imobilização destas enzimas, uma vez que as lipases estão naturalmente imobilizadas na biomassa e aparentemente de forma estável.

CONCLUSÃO

A utilização do resíduo de biomassa como um biocatalisador para as reações de síntese de biodiesel se mostrou promissor. Embora o valor obtido seja baixo, o material utilizado era um descarte de inoculações anteriores, o que demonstra uma utilidade em potencial. Desta forma, seria possível analisar outras condições operacionais a fim de maximizar a quantidade de ésteres produzidos.

Agradecimentos

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FA), pela bolsa concedida. Aos laboratórios LAMAP – Laboratórios Multiusuário de Apoio à Pesquisa do Câmpus Apucarana.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. M.; BOFINGER, M. R.; DEKKER, R. F. H.; MESSIAS, J. M.; GUEDES, C. L. B.; ZAMINELLI, T.; OLIVEIRA, B. H.; LIMA, V. M. G.; DALL'ANTONIA, L. H.. Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean and Castorbean Meals: Optimization, Immobilization, and Application for Biodiesel Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1792-1806, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-013-0309-9>. Acesso em: 29 ago.2023.

CASTRO, T. F. de; CORTEZ, D. V.; GONÇALVES, D. B.; BENTO, H. B.S.; GONÇALVES, R. L.N.; COSTA-SILVA, T. A.; GAMBARATO, B. C.; CASTRO, H. F. de; CARVALHO, A.



K. F. de. Biotechnological valorization of mycelium-bound lipase of *Penicillium purpurogenum* in hydrolysis of high content lauric acid vegetable oils. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 161, p.498-505, 2022.

GHALY, A. E.; DAVE, D.; BROOKS, M. S.; BUDGE, S. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n.2, p. 54-76, 2010.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. São Paulo: Blücher, 2006. 352 p.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G; DEKKER, R .F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 45, n. 6-7, p. 426, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.013>. Acesso em 29 ago.2023.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Processos Químicos**, v.3, n.5, ano 3, p. 9-23, jan/jun 2009.

PASHA, M.K.; DAI, L.; LIU, D.; GUO, M.; DU, W. An overview to process design, simulation and sustainability evaluation of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, p. 129, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01977-z>. Acesso em 10 set.2023.

SABBANI, S.; HEDENSTRÖM, E.; NORDIN, O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 1-9, 2006.

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. Biotechnological approach of microbial lipase: a review. **Biotechnology**, v. 10, p. 23-40, 2011.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663-670, 1979.

ŽIVKOVIĆ, S.; VELJKOVIĆ, M. Environmental impacts the of production and use of biodiesel. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 191–199 (2018). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0649-z>. Acesso em 10 set.2023.