

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES ATRAVÉS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE GIRASSOL EM ULTRASSOM

FREE FATTY ACIDS PRODUCTION BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SUNFLOWER OIL IN ULTRASOUND

Eduardo Raizer^{1,2}
Deise Molinari¹
Thiago Olinek Reinehr¹
Vanessa Tanara Fetsch¹
Jamal Abd Awadallak³
Camila da Silva³
Edson Antônio da Silva¹

Resumo: O biodiesel é um combustível que pode ser sintetizado por meio de matérias-primas animais e vegetais. A hidroesterificação é uma das rotas utilizada para sua produção. Esse processo envolve uma etapa de hidrólise seguida de esterificação e pode ser catalisado por enzimas (lipases), que apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface água/óleo. O girassol, enquanto oleaginosa, é visto como matéria-prima devido à sua cultura economicamente viável nos sistemas de produção e suas características benéficas à saúde. Estudos demonstram que a utilização de ultrassom é capaz de produzir efeitos positivos em reações de hidrólise, aumentando a superfície de contato entre a água e o óleo. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência da fração enzima/substrato e da temperatura na etapa de hidrólise enzimática do óleo de girassol, utilizando a Fosfolipase A₁ (Lecitase Ultra), assistida por ultrassom através de um delineamento central composto rotacional.

Palavras-chave: Biodiesel; planejamento experimental; DCCR.

Abstract: Biodiesel is a fuel that can be synthesized by animal and vegetal sources. Hydroesterification is one of the most used methods for its production. This process involves hydrolysis and esterification reactions, and can be catalyzed by enzymes (lipases) capable of interact only with the water/oil interface. Sunflower, as an oilseed, is seen as a source due to being economically viable in production systems and having beneficial health features. Studies show that ultrasound produces positive effects in hydrolysis reactions, increasing surface contact between water and oil. This study goals were to evaluate the influence of enzyme/substrate ratio and temperature on enzymatic hydrolysis of sunflower oil, using Phospholipase A₁ (Lecitase Ultra), assisted by ultrasound, through experimental design.

Keywords: Biodiesel; experimental design; CCD.

1 INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus*) é uma planta nativa da América do Norte. Essa cultura se desenvolve bem na maioria dos solos agriculturáveis, podendo ser cultivada em praticamente todo o território nacional (EMBRAPA, 2014). O desenvolvimento dessa oleaginosa em diversas regiões brasileiras ocorre devido a algumas de suas particularidades agrônomicas, tais como, resistência a fatores abióticos, fácil adaptação, curto ciclo reprodutivo, época de semeadura favorável e crescente demanda do setor industrial e comercial. A cultura do girassol é uma importante alternativa econômica com relação a outras culturas produtoras de grãos (SILVA, 2005).

¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus Toledo – Departamento de Engenharia Química – R. da Faculdade, 645 – Jardim Santa Maria, 85903-000 – Toledo – Paraná – Brasil– Fone: (+55) 45 3379-7000.

² Autor para correspondência. E-mail: eduardoeq@gmail.com

³ Universidade Estadual de Maringá – UEM, Campus Umuarama – Departamento de Tecnologia – R. Angelo Moreira da Fonseca, 1800, Zona 7 – 87506-370 – Umuarama – Paraná – Brasil.

Um dos óleos mais utilizados no mundo é o óleo de girassol e se destaca por ser uma planta onde quase tudo se aproveita (GAZZOLA *et al.*, 2012). Além de suas aplicações alimentícias, o óleo de girassol também atua como uma alternativa atual para a produção de energia, já que pode ser utilizado como matéria-prima para a produção do biodiesel. No Brasil existem diversas pequenas indústrias que estão processando a oleaginosa para esse fim. No entanto, esse tipo de finalidade é, ainda, bastante incipiente (LEITE *et al.*, 2005).

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água que consistem predominantemente por ésteres de glicerol e ácidos graxos (VOLL, 2011). Mais de 95% dos óleos e gorduras são constituídos por triacilgliceróis. A fração restante é composta predominantemente por monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres, proteínas, esteróis, vitaminas e tocoferóis (FARIA *et al.*, 2002; HIDALGO; ZAMORA, 2003).

A busca por combustíveis alternativos que possam substituir o diesel por biodiesel em motores de combustão interna, visando adotar o uso de energias limpas e renováveis, tem se tornado essencial. As vantagens de um combustível derivado de óleos vegetais são inúmeras, como por exemplo, ser biodegradável, seguro, não tóxico, conter quantidades de enxofre insignificantes e sua maior lubricidade aumentar a vida útil dos motores diesel (GOMES, 2009).

Dentre as rotas alternativas de obtenção do biodiesel, a hidroesterificação mostra-se como uma opção promissora e consiste do processo de hidrólise seguido de uma esterificação. A hidrólise é uma reação homogênea que acontece na fase água-óleo. À medida que a reação prossegue, ácidos graxos são produzidos, gerando amostras com maior índice de acidez (PUPO *et al.*, 2011).

A reação é reversível; na prática, a hidrólise é favorecida por uso excessivo de água, altas temperaturas, pressão e ação de enzimas lipolíticas ou catalisadores químicos (GUNSTONE & NORRIS, 1983; SWERN, 1964). Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos cujas cadeias possuem entre 4 e 36 carbonos (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

Ácidos graxos servem de substratos para inúmeros produtos, além de outras diversas aplicações industriais. Seu uso como substrato para produtos alimentícios exige alta pureza, dificilmente alcançada em sua produção utilizando catalisadores químicos. Já a catálise enzimática torna a reação seletiva, gerando ácidos graxos com grande grau de pureza. As Lipases (glicerol-éster hidrolase - EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a reação de acilgliceróis a ácidos graxos, devido a sua forte atividade e regiospecificidade para as posições 1 e 3 da molécula de glicerol.

A hidrólise enzimática apresenta vantagens e técnicas econômicas, pois pode ser realizada em condições amenas, como temperaturas mais brandas e pressão atmosférica, levando a um menor gasto energético em comparação aos processos físico-químicos (RITTNER, 1996).

Uma das principais limitações da hidrólise enzimática de óleos e gorduras é a imiscibilidade dos substratos, que conduzem a uma baixa transferência de massa e por consequência, uma baixa taxa de reação (Zhong *et al.*, 2010). O ultrassom tem se mostrado uma excelente ferramenta no auxílio aos processos enzimáticos e biológicos, particularmente com substratos viscosos e imiscíveis (Löning, Horst, & Hoffmann, 2002). O Efeito do ultrassom e alta potência provém do colapso cavitacional que propicia condições locais extremas. Quando as bolhas cavitacionais implodem próximas a dois líquidos imiscíveis, a onda de choque resultante pode gerar uma agitação/mistura extremamente eficiente entre as fases (Babicz, Leite, de Souza, & Antunes, 2010).

Com base nos aspectos relacionados anteriormente, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para produção de ácidos graxos livres, via catálise enzimática do óleo de girassol, utilizando a enzima líquida comercial, Lecitase Ultra (Fosfolipase A1). Por meio de um delineamento experimental DCCR (delineamento composto central

rotacional), para avaliar os efeitos da razão água/óleo, teor de enzima e temperatura.

De acordo com Hameed *et al.* (2008), o delineamento estatístico de experimentos nos permite ver as interações entre as variáveis experimentais na faixa estudada, levando a um melhor conhecimento do processo e, portanto, reduzindo o tempo de pesquisa e os custos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

O óleo de girassol Suavit foi utilizado como substrato da hidrólise nesse trabalho. A enzima líquida comercial Lecitase Ultra, utilizada como catalisador enzimático, foi gentilmente cedida por LNF® Latino Americana. Álcool Etilico (Chemco®), Éter etílico (Anidrol®) e NaOH (Synth®), foram utilizados para determinação da acidez. Como indicador da solução de titulação, foi utilizada uma solução de fenolftaleína (Synth®).

O aparelho de ultrassom (Ultronique® ECO-SONICS Q5.9/37A) foi utilizado na reação de hidrólise para a mistura dos reagentes, contidos em frascos cônicos de 50 mL. A separação de fases foi realizada em uma centrífuga (Parsec® CT-0603).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Avaliação do efeito do Ultrassom

Para avaliar o efeito do ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de girassol, primeiramente foram realizados experimentos na ausência de ultrassom. Os experimentos foram realizados a 40 °C e com 2 m% de enzima em relação à massa de substrato (óleo mais água) com duração de 4 h. Então, experimentos nas mesmas condições reacionais foram realizados sobre influência do ultrassom durante todo o período reacional. A avaliação das reações nesta etapa baseou-se na quantificação dos AGL gerados pelo método de titulação, uma vez que essa técnica de detecção é muito mais simples que a técnica utilizada para os outros produtos.

2.2.2 Reações de hidrólise

As reações de hidrólise enzimática do óleo de girassol assistidas por ultrassom em sistema batelada foram conduzidas com o intuito de coletar dados para a análise da influência da fração água/óleo na reação de hidrólise e para a construção de curvas cinéticas. As quantidades de reagentes utilizadas foram fixadas em 10 g de óleo, 1,7 m% de fração enzima/substrato, com frações água/óleo de 2 m%, 5 m% e 10 m%, a uma temperatura de 40 °C. Erlenmeyers de 50 ml contendo as amostras foram imersos no aparelho de ultrassom configurado em potência máxima (154 W). Para cada fração de água/óleo foram preparadas 10 amostras. Cada amostra do sistema foi coletada em tempos diferentes, de forma destrutiva.

2.2.3 Separação de fases

Ao término de cada tempo de reação, as amostras foram retiradas do aparelho e aquecidas até uma temperatura de cerca de 100 °C em um aparelho de micro-ondas com o intuito de desativar a enzima e interromper a reação. As amostras foram então centrifugadas a 3 gravidades durante 5 minutos com o intuito de separar a fase aquosa contendo a enzima e o glicerol da fase oleosa contendo o produto de interesse.

2.2.4 Quantificação da acidez

A quantidade de ácidos graxos livres presentes no óleo de girassol foi determinada por titulação com uma solução de NaOH 0,05 M. Aproximadamente 1 g de amostra foi diluída em 25 ml de solução isovolumétrica de álcool etílico e éter etílico com uma gota de fenolftaleína. A solução foi então titulada sob vigorosa agitação até que houvesse mudança de coloração para rosa, indicando a neutralização da acidez. A Equação (1) demonstra o cálculo da acidez:

$$Acd(m\%) = 100 \cdot \frac{Vol \cdot M_{NaOH} \cdot PM_{AGL}}{pa} \quad (1)$$

Onde Vol é o volume de solução de NaOH (l), M_{NaOH} é a molaridade da solução de NaOH (mol l^{-1}), PM_{AGL} é o peso molecular médio dos ácidos graxos livres presentes no óleo (mol g^{-1}) e pa é o peso da amostra de óleo (g).

Após a realização de experimentos prévios, realizou-se um delineamento central composto rotacional 2^2 . Foram utilizados 11 tratamentos, sendo 4 fatoriais, 3 centrais e 4 rotacionais para avaliar o efeito das variáveis independentes (temperatura e fração enzima/substrato) sobre a variável dependente (acidez). O ajuste dos dados empregou um polinômio de segunda ordem representado de forma genérica na Equação (2).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_{11} \cdot X_1^2 + \beta_{22} \cdot X_2^2 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (2)$$

Onde β_i e β_{ij} são parâmetros ajustáveis e

$$X_i = \frac{x_i - \bar{x}}{\Delta x_i} \quad (3)$$

As variáveis independentes do processo foram avaliadas em cinco níveis codificados (-1,4142, -1, 0 e +1 e +1,4142). Os níveis dos fatores e os tratamentos realizados estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas (1) e (2).

Tabela 1. Níveis de variáveis no delineamento central composto rotacional

	Níveis				
	-1,4121	-1	0	1	+1,4142
Temperatura (°C)	26	30	40	50	54
Fração Enzima/Substrato (m%)	0,6	1,0	2,0	3,0	3,4

Tabela 2. Delineamento central composto rotacional 2² com triplicata no ponto central

Experimento	Temperatura (°C)	Fração Enzima/Substrato (%)
1	40	2,0
2	40	2,0
3	40	2,0
4	30	1,0
5	30	3,0
6	50	1,0
7	50	3,0
8	26	2,0
9	54	2,0
10	40	0,6
11	40	3,4

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso do ultrassom altera nitidamente o meio, em poucos minutos a mistura água/óleo adquire aparência homogênea e opaca, sendo capaz de gerar emulsões estáveis mesmo sem uso de surfactantes (HIELSCHER, 2007). A tabela (3) ilustra os resultados obtidos para ambos os casos. Martinez (2000) reporta que este efeito parece ser específico para cada enzima e dependente das condições de sonicação usadas. A aplicação de ultrassom pode produzir um efeito positivo na atividade enzimática, embora dependendo da intensidade, possa causar desnaturação. Quando dois líquidos imiscíveis, por exemplo, água e óleo, são tratados com ultrassom, há aumento na velocidade de formação de gotículas microscópicas com aumento da superfície de contato e das forças coesivas, resultando na formação de microemulsões.

Os valores experimentais obtidos para a acidez sob as diferentes condições testadas estão apresentados na Tabela (4).

A Tabela (5) mostra a estimativa dos efeitos das variáveis e de suas interações, bem como o erro padrão, o p-valor e o coeficiente de regressão de cada variável para as novas condições experimentais em um intervalo de confiança de 95%. Os fatores considerados significativos estão destacados em negrito.

Em nível de significância de 95%, todas variáveis com exceção da fração enzima/substrato linear mostraram-se relevantes. A Figura (1) exibe os efeitos na forma padronizada, com as reacionais linha vertical, representando este nível de significância.

Com base nos coeficientes de regressão e nos p-valores, foi proposto um modelo empírico ($R^2 = 0,9611$) para descrever a acidez final em função das variáveis selecionadas. O modelo é representado pela seguinte Equação (4).

$$\text{Acd(m\%)} = 4,57.T - 0,08.T^2 - 3,18.E/S - 3,64.E/S^2 + 0,45.T.E/S - 38,42 \quad (4)$$

A verificação da validade do modelo foi realizada pela análise do teste F. A Tabela (6) mostra a análise da variância para o planejamento experimental, bem como o valor tabelado de F para um intervalo de confiança de 95%: $F_{\text{tab}}(3; 3; 0,05) = 5,05$.

Como $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, o modelo ajustado é válido. A Figura (2) mostra a distribuição dos

resíduos em função dos valores preditos pelo modelo.

Tabela 3. Comparação da hidrólise do óleo de girassol com e sem influência de ultrassom; 40 °C; 5 m% água/óleo; 2 m% enzima/substrato; 4 h de reação

Método	Acidez (m%)		
Agitação mecânica	16,73	15,92	16,34
Ultrassom	37,02	35,41	36,21

Tabela 4. Delineamento central composto rotacional

Ensaio	Variáveis independentes		Variável dependente
	Temperatura (°C)	Fração Enzima/Substrato (%)	Acidez (m%)
1	40	2,0	38,69
2	40	2,0	37,85
3	40	2,0	37,01
4	30	1,0	38,04
5	30	3,0	26,90
6	50	1,0	15,39
7	50	3,0	22,14
8	26	2,0	31,32
9	54	2,0	16,83
10	40	0,6	29,83
11	40	3,4	33,77

Tabela 5. Efeitos e coeficiente de regressão para a acidez (R² = 0,9611)

Variável	Efeito	Erro Padrão	p-valor	Coeficiente de regressão
Intercepto	37.88	1.37	0.000001	-38.4206
Temperatura (L)	-12.04	1.69	0.000838	4.5692
Temperatura (Q)	-15.16	2.03	0.000672	-0.0758
Fração enzima/substrato (L)	0.28	1.69	0.872785	-3.1834
Fração enzima/substrato (Q)	-7.28	2.03	0.015623	-3.6411
T x E/S	8.95	2.37	0.013059	0.4473

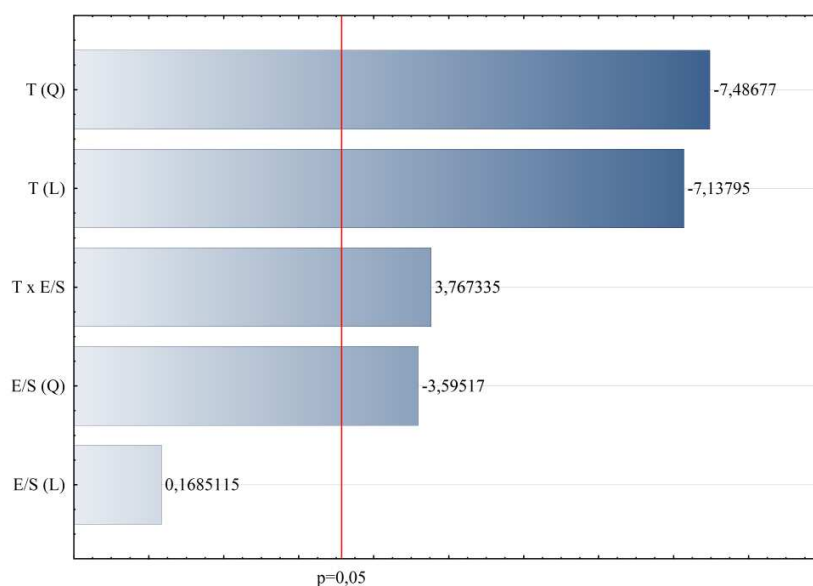


Figura 1. Diagrama de pareto para a produção de AGL

Tabela 6. Análise da variância para o DCCR, para o AGL

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab
Regressão	756,27	5	151,25	134,15	5,05
Resíduos	28,19	5	5,64		
Total	784,46	10			

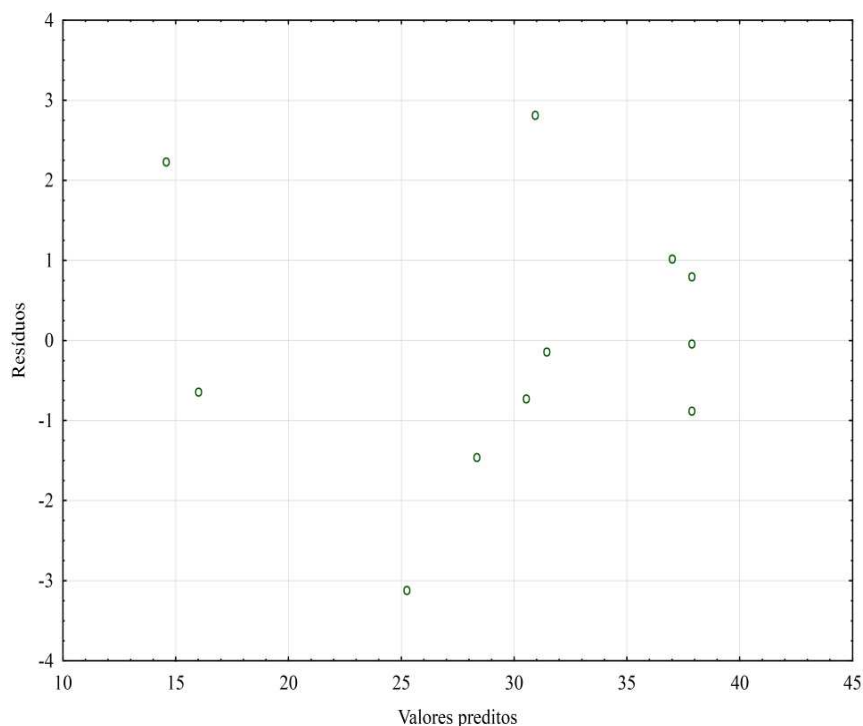


Figura 2. Distribuição dos resíduos para o modelo quadrático

A distribuição aleatória mostra que o modelo ajustado não é tendencioso e que não existe a necessidade de um ajuste de maior ordem.

Com base no modelo ajustado foi possível traçar a superfície de resposta para a acidez em função da temperatura e da fração enzima/substrato, cujo resultado está expresso na Figura (3).

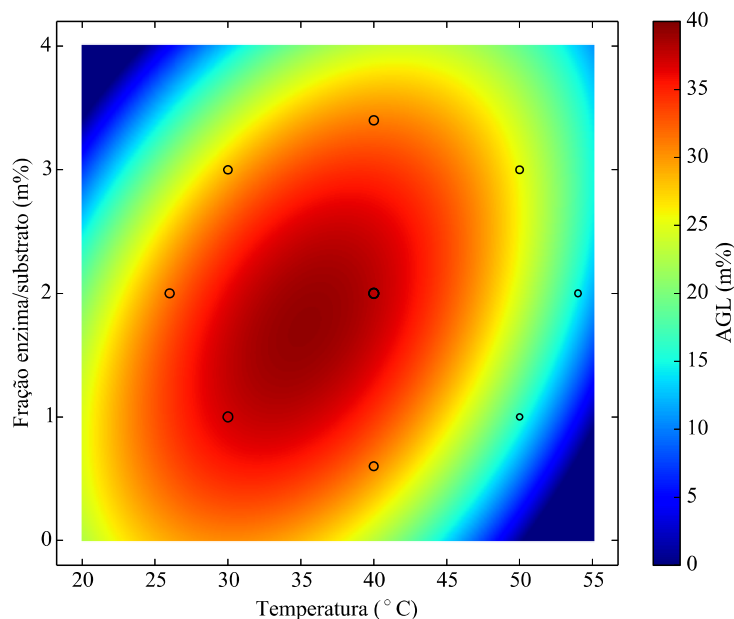


Figura 3. Influência da temperatura e da fração enzima/substrato sobre a acidez

4 CONCLUSÕES

Os experimentos realizados foram capazes de determinar a temperatura e a fração enzima/substrato ótimos para a produção de AGL na reação de hidrólise do óleo de girassol com a enzima fosfolipase A1 (Lecitase Ultra). Os parâmetros ótimos obtidos foram de 35 °C e 1,7 m%, respectivamente. O uso do ultrassom no processo enzimático mostrou ser efetivo.

A próxima etapa lógica a ser seguida é o estudo da influência da razão água/óleo sobre a hidrólise do óleo de girassol. Sugere-se a construção de curvas cinéticas, a quantificação dos acilgliceróis presentes nas amostras em conjunto com os ácidos graxos livres e, por fim, a modelagem matemática do sistema.

Outro parâmetro de interesse para a reação é o pH, cuja influência sobre a hidrólise também pode ser estudada a fim de obter um entendimento completo sobre as melhores condições possíveis de obtenção de um óleo rico em AGL, pronto para a esterificação, a segunda etapa de produção do biodiesel.

REFERÊNCIAS

- AWADALLAK, J.; VOLL, F. A. P.; RIBAS, M. C.; SILVA, C.; FILHO, L. C.; SILVA, E. Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: Diacylglycerol synthesis. *Ultrasonics. Ultrasonics Sonochemistry*, 2012.v. 20, p. 1002-1007.
- BABICZ, I., LEITE, S. G. F., DE SOUZA, R. O. M. a, & Antunes, O. a C. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(1), 4-6, 2010.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Introdução Química dos Alimentos. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003. p. 238.
- EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Girassol. Londrina: EMBRAPA, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/girassol>>. Acesso em 21 de Agosto de 2014.
- FARIA, E. A. de et al. Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. *Eclética Química*, v. 27, p. 00-00, 2002. ISSN 0100-4670. Disponível

em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010046702002000100010&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

GAZZOLA, A.; FERREIRA, C. T. G. J.; CUNHA, D. A.; BORTOLINI, E.; PAIAO, G. G.; PRIMINIANO, I. V.; PESTANA, J.; ANDRÉA, M. S. C.; OLIVEIRA, M. S. A cultura do girassol. Piracicaba: USP-ESALQ, 2012. p, 69.

GOMES, M. M. R. Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo residual de peixe. Dissertação de Mestrado em Tec. de Proc. Quím. e Bioq. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2009.

GUNSTONE, F.D. & NORRIS, F.A. Lipids in foods: chemistry, biochemistry and technology. Pergamon Press, Oxford, pp. 43-51, 1983.

HAMEED, B. H.; LAI, L. F.; CHIN, G. H. Production of Biodiesel from Palm Oil (*Elaeis Guinensis*) Using Heterogeneous Catalyst: An Optimized Process. Fuel Proc. Tec. Malaysia, 2009. v. 90, p. 606-610

HIELSCHER, T. Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions. arXiv:0708.18310708.1831, ago. 2007.

HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: recent advances and future perspectives. Trends Food Sci. Technol., v. 14, n. 12, p. 499–506, dez. 2003. ISSN 09242244. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224403001602>>.

LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. D. Girassol no Brasil. Londrina: EMBRAPA Soja, 2005.

LÖNING, J.-M., HORST, C., & HOFFMANN, U. Investigations on the energy conversion in sonochemical processes. Ultrasonics Sonochemistry, 9(3), 169–179, 2002.

MARTINEZ, M.A.U.; DAVOLOS, M.R.; JAFELICCI M. J. O efeito do ultrassom em reações químicas. Química Nova, v. 23, p. 251-256, 2000.

PUPO, M. M. S.; ALMEIDA, A. R.; MAIA, W. A.; RAMOS, A. L. D. Produção de biodiesel via hidroesterificação utilizando catalisadores ácidos. Dissertação de Mestrado em Eng. Quím. Sergipe: UFS, 2011.

RITTNER, H. Óleo de palma: Processamento e utilização. São Paulo, 1ªed. P. 311-320, 1996.

SILVA, C. A. da. Produção de biodiesel a partir de óleo bruto de girassol. In: II CONGR. BRAS. PLANTAS OL. ÓLEOS, GORD. E BIOD. Minas Gerais: UFLA, 2005. p, 853–57.

SWERN D. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Intersciences, New York. 3rd Edition, 1964.

VOLL, F. A. P. Produção e Separação de Diacilglicerol a partir do Triacilglicerol do Óleo de Palma. Tese (Tese de doutorado em Engenharia Química) — Universidade Estadual de Maringá - UEM, 2011.

ZHONG, N., LI, L., XU, X., CHEONG, L.-Z., ZHAO, X., & LI, B. Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis. Food Chemistry, 122(1), 2010.