



HIDRÓLISE DE ÓLEO DE SOJA DEGOMADO CATALISADO POR LIPASE DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* LIVRE: AVALIAÇÃO DE REUSO DE ÁGUA E ENZIMA.

R. F. C. BENTO¹ e P. W. TARDIOLI¹

¹ Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, São Carlos, SP

² Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, São Carlos, SP

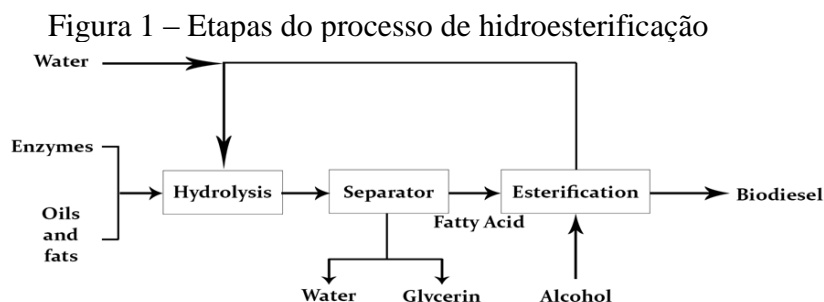
E-mail para contato: renatofcbento@hotmail.com

RESUMO – Com enormes preocupações relacionadas aos combustíveis fósseis, tanto em caráter de futura escassez quanto ambiental, o biodiesel, por ser biodegradável e renovável, prova-se uma alternativa interessante para suprir essa demanda energética. Dentre os processos para sua obtenção, o mais consolidado, conhecido como rota química, resume-se na transesterificação entre óleos e álcoois, gerando glicerol e biodiesel, na presença de catalisadores básicos, e dentre suas desvantagens, cita-se a necessidade de pré-tratamento de acidez da matéria-prima e do pH dos efluentes para descarte, reação com alta demanda de álcool e ausência total de água, dificuldade de recuperação do glicerol, altas temperaturas de operação e corrosão do sistema de operação. Por estas razões, a hidroesterificação catalisada por enzimas, consistindo na hidrólise de óleos com água, formando glicerol, água e ácidos graxos livres, em sequência da esterificação deste último com álcoois, formando água e biodiesel, é uma rota candidata ao aperfeiçoamento da produção de biodiesel, pois opera em condições moderadas de temperatura, não necessita de pré-tratamento de acidez da matéria prima, e o glicerol produzido é mais puro e de mais fácil recuperação. Este trabalho descreve o perfil de conversão da hidrólise de óleo de soja degomado catalisada por lipase de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) livre, e a avaliação do reuso da água e lipase em sucessivas hidrólises realizadas no tempo de máxima conversão.

1. INTRODUÇÃO

Lipases são enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana, que convertem cataliticamente triglicerídeos em ácidos graxos, glicerol e mono e di-glicerídeos. Podem ser classificadas, quanto a sua especificidade, em: lipases ácido-graxo específicas (atuam apenas no carbono 9 do triglicerídeo), 1-3 específicas (catalisam apenas os ácidos graxos das posições 1 e 3 dos triacilgliceróis) e não específicas hidrolisam moléculas de triacilgliceróis, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Para otimizar a produção de biodiesel, a lipase selecionada deve converter todas as três formas de glicerídeos, ou seja, ser não-específica, e um dos maiores obstáculos em aplicação industrial de enzimas é o seu alto custo de produção (Pourzolfaghar *et al.*, 2016).

Segundo Pourzolfaghar *et al.*, a hidroesterificação é um processo integrado de hidrólise, seguida de esterificação, para a produção de biodiesel, conforme ilustrado na Figura 1. Diferente da maneira convencional, este método catalisado por enzimas não possui formação de sabão, trabalha em condições próximas à ambiente, e produz um glicerol mais puro, de maior valor agregado. Outra vantagem do processo é a possibilidade de trabalhar com matérias-primas brutas, como óleos e gorduras sem tratamentos prévios de acidez, os quais possuem um baixo preço de mercado. (Vescovi et al., 2016)



Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de óleos vegetais, ABIOVE, o óleo de soja degomado é obtido a partir do pensamento da semente de soja, sendo uma matéria prima de baixo valor de mercado, e abundante no cenário econômico brasileiro atual.

Este trabalho é continuação de um trabalho desenvolvido na disciplina de Desenvolvimento de Processos Químicos de 2017, ofertada pelo Departamento de Engenharia da UFSCar, em que foi determinado as condições experimentais para a hidrólise de óleo de soja degomado. Cita-se: seleção de enzima (Lipase de *Pseudomonas fluorescens*), temperatura de operação (35°C), tipo e agitação de empelidor (pás triplas, 900 rpm), carga enzimática (100U/g de óleo de soja degomado), razão de massa de óleo e água no reator (1:0,5), e índice de Saponificação do óleo de soja degomado (IS = 189,82 mg KOH / g de óleo de soja degomado).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Perfil de conversão com o tempo

Sabe-se que estudar e entender como a cinética química se desenvolve ao longo do tempo é um fator que permite avaliar a viabilidade de aplicação de um processo industrial, uma vez que atingir uma determinada taxa de conversão pode demandar um elevado tempo de reação ou mesmo ser termodinamicamente inatingível (Davis e Davis, 2003). Dessa forma, conhecer o ponto ótimo de operação é fundamental para um processo industrial.

O experimento foi realizado com a finalidade de acompanhar o aumento da conversão da hidrólise de óleo de soja degomado catalisado pela lipase de *Pseudomonas fluorescens* livre ao longo do tempo em dois reatores batelada sob as mesmas condições, objetivando encontrar o tempo necessário para atingir a máxima conversão possível. Após o início da reação, buscou-se retirar alíquotas de 2 mL nos tempos de 0,5; 1; 2 e 3 horas, e em seguida, de 3 em 3 horas para titulação (além da alíquota controle, antes da reação iniciar). As alíquotas de 2 mL foram retiradas com pipeta volumétrica de 5 mL, com a extremidade da ponteira cortada para garantir proporção equivalente de água:óleo da alíquota e do reator.



$$\text{Convers\~ao(\%)} = \frac{(\text{mL KOH} \times \text{M NaOH}) - (\text{mL branco} \times \text{M KOH})}{\text{g de amostra}} \times \frac{56,11 \text{ g KOH}}{\text{mol KOH}} \times \frac{\text{g de amostra}}{\frac{2}{3} \text{ g \u00f3leo}} \times \frac{\text{g de \u00f3leo}}{189,82 \text{ mg de KOH}} \times 100 \quad (1)$$

2.2 Avalia\u00e7\u00e3o do reuso de lipase e \u00e1gua

\u00c9 sabido que na rota enzim\u00e1tica de produ\u00e7\u00e3o de biodiesel, o maior custo \u00e9 associado ao elevado pre\u00e7o dos biocatalisadores (Rosset *et al.*, 2019). Por essa raz\u00e3o, foi realizado uma avalia\u00e7\u00e3o do reuso sucessivo da fase pesada do produto de uma batelada de hidr\u00f3lise de \u00f3leo de soja degomado catalisado por lipase de *Pseudomonas fluorescens*, composto por \u00e1gua, lipase, e glicerol, este \u00faltimo que fica mais concentrado a medida que cada reuso \u00e9 feito.

O tempo de cada batelada foi o equivalente ao tempo de m\u00e1xima convers\u00e3o, obtido pelo perfil de convers\u00e3o ao longo do tempo, e ao fim de cada batelada, desligou-se banho de laborat\u00f3rio e agita\u00e7\u00e3o, e esperou-se 3,5 horas para ocorrer a decanta\u00e7\u00e3o para permitir a retirada de \u00e1cidos graxos livres e do \u00f3leo de soja degomado que n\u00e3o reagiu. O c\u00e1lculo de convers\u00e3o foi realizado com a Equa\u00e7\u00e3o 1, tamb\u00e9m utilizada no experimento do perfil de convers\u00e3o ao longo do tempo.

3. RESULTADOS E DISCUSS\u00d5ES

3.1 Perfil de convers\u00e3o com o tempo

De acordo com o procedimento experimental descrito, tomou-se notas, no momento da retirada das al\u00edquotas de 2 mL para titula\u00e7\u00e3o, de suas massas e do tempo decorrido de rea\u00e7\u00e3o (sendo o momento inicial, ou tempo zero, o instante em que a lipase foi introduzida nos reatores). Tomou-se nota, tamb\u00e9m, da concentra\u00e7\u00e3o e do volume da solu\u00e7\u00e3o de hidr\u00f3xido de s\u00f3dio necess\u00e1ria para a titula\u00e7\u00e3o das amostras, e a partir da Equa\u00e7\u00e3o 1, foi poss\u00edvel calcular a convers\u00e3o da hidr\u00f3lise de \u00f3leo de soja degomado catalisado pela lipase de *Pseudomonas fluorescens* livre em fun\u00e7\u00e3o do tempo de rea\u00e7\u00e3o. Os dados obtidos s\u00e3o apresentados nas Tabelas 1 e 2 a seguir, referentes aos dois reatores em que se realizou o experimento, e o gr\u00e1fico Convers\u00e3o (%) vs Tempo (h) com um ajuste de curva e desvio dos dados obtidos, apresentado na figura 2:

Tabela 1 – Dados obtidos experimentalmente para o Reator 1 referente \u00e0s titula\u00e7\u00f5es de al\u00edquotas obtidas, ao longo do tempo, da hidr\u00f3lise de \u00f3leo de soja degomado

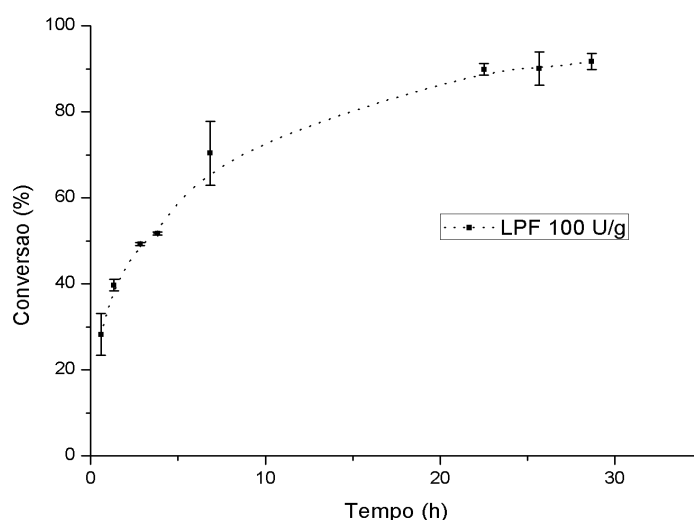
Dia	Hor\u00e1rio	Tempo rea\u00e7\u00e3o (h)	Massa total \u00e1gua + \u00f3leo reator (g)	Massa amostra (g)	[KOH] (mol/L)	Vol. KOH (ml)	Mol. KOH/g de mistura (mol/g)	Convers\u00e3o (%)
1	11:10	0,00	151,2458	1,8440	0,01882	0,40	4,07E-06	0,00
				1,8572	0,01882	0,40		
	11:45	0,58	147,5446	1,6497	0,01882	46,50	5,30E-04	23,34
	12:30	1,33	145,8949	1,6632	0,24086	6,00	8,69E-04	38,35
	14:00	2,83	144,2317	1,6311	0,24086	7,60	1,12E-03	49,58
	15:00	3,83	142,6006	1,6359	0,24086	8,00	1,18E-03	52,05
2	18:00	6,83	140,9647	1,7109	0,24086	12,50	1,76E-03	77,85
	09:40	22,50	139,2538	1,6829	0,24086	14,40	2,06E-03	91,20
	12:50	25,67	137,5709	1,7026	0,24086	15,00	2,12E-03	93,91
	15:50	28,67	135,8683	1,6159	0,24086	14,80	2,11E-03	93,57
				1,8457	0,24086	15,50		

Tabela 2 – Dados obtidos experimentalmente para o Reator 2 referente às titulações de alíquotas obtidas, ao longo do tempo, da hidrólise de óleo de soja degomado

Dia	Horário	Tempo reação (h)	Massa total água + óleo reator (g)	Massa amostra (g)	[KOH] (mol/L)	Vol. KOH (ml)	Mol. KOH/g de mistura (mol/g)	Conversão (%)
1	11:10	0,00	150,8868	1,8007	0,01882	0,40	4,03E-06	0,00
				1,8881	0,01882	0,40		
	11:45	0,58	147,1980	1,9039	0,24086	5,90	7,46E-04	33,09
	12:30	1,33	145,2941	1,8461	0,24086	7,10	9,26E-04	41,07
	14:00	2,83	143,4480	1,7900	0,24086	8,20	1,10E-03	48,92
	15:00	3,83	141,6580	1,9142	0,24086	9,20	1,16E-03	51,33
2	18:00	6,83	139,7438	1,9355	0,24086	11,40	1,42E-03	62,90
	09:40	22,50	137,8083	1,9182	0,24086	15,90	2,00E-03	88,52
	12:50	25,67	135,8901	1,9693	0,24086	15,90	1,94E-03	86,23
	15:50	28,67	133,9208	1,8963	0,24086	15,90	2,03E-03	89,87
				1,9301	0,24086	16,30		

Com as conversões em função do tempo para ambos os reatores, foi possível plotar um gráfico Conversão (%) vs Tempo (h) com um ajuste de curva e desvio dos dados obtidos, apresentado na figura 2 a seguir:

Figura 2 – Gráfico de conversão (%) da reação de hidrólise de óleo de soja degomado catalisado pela lipase de *Pseudomonas fluorescens* em função do tempo de reação(h)



Segundo Shuler e Kargi, a cinética enzimática de um único substrato possui comportamento regido pelo modelo de Michaelis–Menten. A partir da Figura 2, e também com o tratamento final dos dados apresentados nas Tabelas 1 e 2, é possível concluir que a cinética enzimática obtida possui comportamento qualitativamente similar ao modelo de Michaelis–Menten, conforme o esperado, e a conversão máxima para a reação de hidrólise do óleo de soja degomado catalisado por lipase de *Pseudomonas fluorescens* é muito próxima à 90%, com um tempo de reação correspondente a 24 horas. A partir desse resultado, foi possível avaliar o reuso da água e da lipase em sucessivas bateladas, sob as mesmas condições de operação, com tempo de reação de 24 horas.

3.2 Avaliação do reuso de água e lipase

Obtido o tempo de reação para atingir a máxima conversão da reação de hidrólise de óleo de soja degomado catalisado pela lipase de *Pseudomonas fluorescens* livre, apresenta-se, a seguir, nas Tabelas 3 e 4, referentes aos reatores 1 e 2 em que ocorreu as reações, os dados obtidos em cinco sucessões de bateladas de 24 horas com reuso de água e lipase, e o gráfico de Conversão (%) vs Batelada com desvio dos dados obtidos, apresentado na Figura 3:

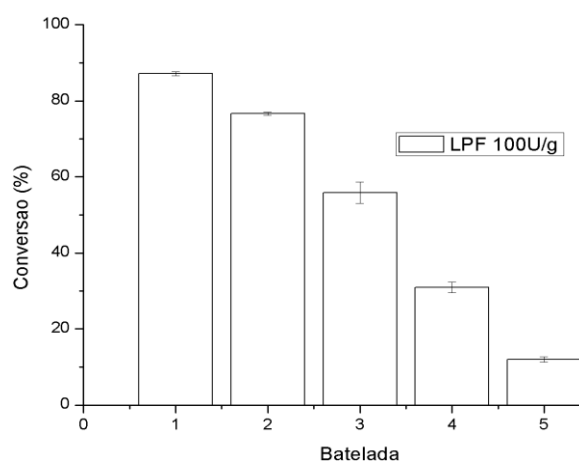
Tabela 3 – Dados obtidos para reuso de lipase e água no Reator 1

Batelada	Massa Reator (g)	Branco			Amostra			Massa Recuperada (g)	Média NKOH/g solução (mol/g)	Média branco NKOH/g solução (mol/g)	Conversão (%)
		Massa Branco (g)	M KOH (mol/L)	V KOH (mL)	Massa amostra (g)	M KOH (mol/L)	V KOH (mL)				
1	149,94	1,5391	0,0188	0,40	1,6584	0,2409	13,40	59,64	1,98E-03	4,71E-06	87,63
		1,8697	0,0188	0,45	1,8340	0,2409	15,35				
2	183,59	1,5245	0,0188	36,50	1,6712	0,2409	14,40	80,02	2,02E-03	6,03E-04	76,98
		1,8168	0,2409	5,70	1,8921	0,2409	15,90				
3	196,75	1,6925	0,2409	5,80	1,8872	0,2409	14,50	112,27	1,83E-03	8,20E-04	58,61
		1,8043	0,2409	6,10	1,6674	0,2409	12,50				
4	177,13	1,9401	0,2409	5,20	1,6349	0,2409	8,50	74,86	1,23E-03	6,19E-04	32,32
		1,7923	0,2409	4,40	1,8630	0,2409	9,40				
5	196,37	1,6338	0,2409	4,00	1,5924	0,2409	5,40	110,05	7,87E-04	5,90E-04	11,29
		1,7960	0,2409	4,40	1,8138	0,2409	5,70				

Tabela 4 – Dados para o reuso de lipase e água no Reator 2

Batelada	Massa Reator (g)	Branco			Amostra			Massa Recuperada (g)	Média NKOH/g solução (mol/g)	Média branco NKOH/g solução (mol/g)	Conversão (%)
		Massa Branco (g)	M KOH (mol/L)	V KOH (mL)	Massa amostra (g)	M KOH (mol/L)	V KOH (mL)				
1	153,76	1,5336	0,0188	3,30	1,6334	0,2409	13,80	63,46	2,00E-03	3,96E-05	86,64
		1,7506	0,0188	3,60	1,8457	0,2409	15,10				
2	184,14	1,4525	0,2409	4,00	1,6736	0,2409	14,40	75,79	2,07E-03	6,64E-04	76,25
		1,8869	0,2409	5,20	1,8593	0,2409	16,00				
3	201,10	1,6107	0,2409	5,60	1,7856	0,2409	13,00	103,91	1,73E-03	8,46E-04	53,02
		1,8335	0,2409	6,50	1,9458	0,2409	13,85				
4	189,55	1,5148	0,2409	3,95	1,7009	0,2409	8,30	78,64	1,15E-03	6,28E-04	29,52
		1,8788	0,2409	4,90	1,8552	0,2409	8,70				
5	205,19	1,4963	0,2409	3,80	1,7322	0,2409	5,80	124,82	7,92E-04	5,80E-04	12,71
		1,8469	0,2409	4,20	1,9371	0,2409	6,25				

Figura 3 – Gráfico de conversão (%) da reação de hidrólise de óleo de soja degomado em função do número de ciclos consecutivos de lipase e água





Ao analisar a Figura 3, é possível observar que as primeiras bateladas tiveram um bom rendimento (a primeira teve um valor bem próximo ao obtido no perfil de conversão ao longo do tempo, reforçando a consistência dos resultados), e que a partir da terceira batelada, em que o rendimento é inferior à 50%, o processo certamente não compensa ser mantido.

Ao final da decantação de cada batelada, observou-se a formação de duas fases, sendo a mais pesada, composta por água, glicerol e lipase, de coloração amarelada clara e mais opaca em relação a fase leve, composta de óleo de soja degomado e ácidos graxos livres. O esperado para a fase leve é ter uma coloração translúcida, levemente amarronzada (devido à coloração da enzima), o que não foi observável, sugerindo a possibilidade de mono e diglicerídeos criarem uma emulsão com as enzimas, inativando-as conforme o número de bateladas avança e reduzindo a efetividade do reuso das lipases.

4. CONCLUSÃO

A partir do estudo do perfil de conversão da hidrólise de óleo de soja degomado catalisado por lipase de *Pseudomonas fluorescens* livre ao longo do tempo, além do reuso da citada lipase em bateladas sucessivas, é conclusivo que a máxima conversão obtida, de 90%, assim como seu tempo de reação correspondente, de 24 horas, são valores aplicáveis e interessantes para aplicação industrial, visto que se trata de uma enzima na forma livre, solúvel. Em contrapartida, o reuso da lipase não se mostrou promissor, visto que a partir da terceira batelada consecutiva, o rendimento da hidrólise cai consideravelmente, como visto na Figura 3. Dessa forma, buscar alternativas e novas propostas para que o reuso da lipase tenha melhores desempenhos contribuirá para que a produção industrial de biodiesel a partir do óleo de soja degomado esteja mais perto da realidade.

6. REFERÊNCIAS

- DAVIS, M. E., DAVIS, R. J. Fundamentals of Chemical Reaction Engineering. 1st ed. Boston: McGraw Hill, 2003.
- POURZOLFAGHAR, H.; ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W.; AROUA, M. K. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2016, vol. 61, pp 245-257.
- ROSSET, D.V., Wancura, J.H.C., UGALDE, G.A. et al. Appl Biochem Biotechnol (2019).
- SHULER, M. L., KARGI, F. Bioprocess engineering: basic concepts. 2nd ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall PTR, 2002.
- VESCOVI, V., ROJAS, M.J., BARALDO, A. et al. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel by Hydrolysis of Waste Cooking Oil Followed by Esterification of Free Fatty Acids. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2016, vol. 93, pp 1615–1624.