

GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS DE SOJA ASSISTIDA POR ULTRASSOM EM MEIO LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO SOB AGITAÇÃO

D. REMONATTO¹, L. A. LERIN¹, K. A. ONISHI¹, V. OENNING NETO¹, D. OLIVEIRA¹,
J. L. NINOW¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina,
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: daniremonatto@gmail.com

RESUMO – Este trabalho apresenta dados experimentais da glicerólise de óleo de soja utilizando como catalisador a enzima Novozym 435 em sistema livre de solvente e em ultrassom, para a produção de emulsificantes, monoacilgliceróis (MAGs) e diacilgliceróis (DAGs). Os experimentos foram realizados em modo batelada visando o estudo do efeito das variáveis de processo: temperatura (40 a 70 °C), concentração de enzima (2,5 a 10%, m/m, em relação aos substratos), razão molar de glicerol: óleo (0,8:1 a 3:1), agitação (0 a 1200 rpm) e potência do ultrassom (0 a 100%). Óleo de soja teve seus melhores resultados de conteúdo de MAGs + DAGs (~65% m/m) quando se utilizou a relação molar de glicerol:óleo de 0,8:1, 70 °C, 600 rpm, 90 minutos de reação, concentração de enzima de 10% (m/m) e 40% de potência de ultrassom. Este estudo apontou a glicerólise catalisada por lipase em meio livre de solvente com auxílio do ultrassom pode ser uma potencial rota para a produção de altos conteúdos de MAGs e DAGs.

1. INTRODUÇÃO

A busca por processos alternativos para a síntese de produtos de interesse para a indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, que não causem ou reduzam os danos ao ambiente, vêm despertando grande interesse de pesquisadores em todo o mundo. Uma alternativa é a síntese enzimática, que apresenta muitas vantagens em relação à síntese química (Lerin, 2010). Diversas pesquisas têm sido focadas na modificação de óleos e gorduras para a obtenção de produtos que aliem propriedades funcionais e/ou de saúde, bem como propriedades tecnológicas que permitam sua utilização nas linhas de processamento (Xu, 2004; Feltes *et al.*, 2009). Entre as técnicas existentes, a glicerólise enzimática, para a produção de monoacilgliceróis (MAGs) e diacilgliceróis (DAGs), tem sido alvo de muitos estudos, pois estes glicerídeos são excelentes emulsificantes e moléculas condicionadoras utilizadas na indústria.

Porém a reação de glicerólise apresenta um inconveniente, a imiscibilidade dos substratos, que prejudica os rendimentos da reação. Os efeitos físicos do ultrassom, como o aumento da temperatura, a transferência de massa, a cavitação estável e a transitória vêm a contribuir para o aumento da miscibilidade das fases óleo e glicerol, assim é possível reduzir o tempo de reação e maximizar a produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis. A influência das ondas ultrassônicas na atividade e

estabilidade de enzimas tem demonstrado ser específica para cada enzima e dependente dos parâmetros de sonicação (Martinez *et al.*, 2000).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar a potencialidade da produção enzimática de emulsificantes de grau alimentício, monoacilgliceróis e diacilgliceróis, através da glicerólise de óleo de soja, e glicerol, em meio livre de solvente em sistema de ultrassom, utilizando uma lipase comercial imobilizada, Novozym® 435, como biocatalisador, em modo batelada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Os substratos utilizados nas reações de glicerólise enzimática foram o óleo de soja comercial (Soya, Brasil), glicerol (Vetec, 99,5%) e hexano (Vetec, 99,5%). Como catalisador foi utilizada a lipase comercial de origem microbiana Novozym 435, produzida a partir de *Candida antarctica* (imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica) pela Novozymes (Brasil/ Araucária-PR). Para a análise em GC foram utilizados diclorometano (Vetec, 99,5%), derivatizante MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide) e os padrões químicos monooleína, dioleína e trioleína adquirido da Sigma-Aldrich (Supelco, 99% pureza).

2.2. Aparato experimental

A unidade experimental montada para o desenvolvimento do trabalho consistiu na utilização de um balão de fundo redondo de 50 mL que era inserido em um banho de ultrassom (UNIQUE), com frequência de 37 kHz e potência de 132 W, com controle de temperatura e potência do meio reacional. Neste sistema foi também inserido um agitador mecânico (IKA, modelo RW 20), com controlador digital. O procedimento experimental adotado na etapa de produção de MAGs e DAGs consistiu nos seguintes passos: primeiramente a enzima era colocada em estufa a 40 °C por 1 hora para secagem. Em seguida eram adicionados ao reator o óleo de canola/soja e o glicerol (em quantidades definidas no planejamento de experimentos, com volume total de 15 mL), e a enzima em concentrações pré-estabelecidas. A relação mássica (óleo, glicerol e enzima) utilizada em cada reação foi determinada pelo planejamento experimental. Era acoplado ao ultrassom o agitador mecânico ao reator e este era fechado e a reação iniciada. Ao final do tempo da reação, todo o volume do reator era retirado e filtrado a vácuo com sucessivas lavagens com hexano. As amostras eram transferidas para frascos de amostragem e acondicionadas em estufa a vácuo (65 °C, 0,5 bar) por 24 h a fim de eliminar o excesso de hexano.

2.2. Determinação de MAG e DAG

As análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC), – Shimadzu 2010, com injetor automático on-column e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar DB-5 (5% fenil, 95% metilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm (J e W Scientific, nº de série: US7162944H). As condições de operação foram segundo a Norma nº 14105, do Comitê Europeu para Padronizações, sendo a programação de temperatura da coluna: 50 °C por 1 minuto,

seguido pelo aumento de 15 °C/min até 180 °C, 7 °C/min até 230 °C e 10 °C/min até 380 °C, permanecendo por 8 min. A temperatura do detector era de 380 °C, pressão do gás de arraste (nitrogênio) de 80 kPa e o volume injetado foi de 1 µL. Para a quantificação dos produtos MAG e DAG utilizou-se padrões externos monooleína e dioleína. As condições de análise das soluções de calibração e das amostras foram segundo a Norma nº 14.105 (2001) do Comitê Europeu para Padronizações, porém, sem a utilização de padrões internos conforme metodologia adaptada por Kruger (2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação do efeito das variáveis de processo na produção de MAG E DAG

Tomando como base estudos preliminares realizados por Fiametti *et al.* (2012) foi proposta a utilização do planejamento de experimentos através do modelo proposto por Plackett & Burman com 12 ensaios, com triplicata do ponto central, para avaliação dos efeitos das variáveis temperatura, razão molar, concentração de enzima, agitação e potência de ultrassom na produção enzimática de mono- e diacilgliceróis utilizando como catalisador a enzima Novozym 435, em meio livre de solvente orgânico, em banho de ultrassom. O tempo de reação foi fixado em 3 horas. A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento de experimento e as respostas em termos de rendimento em MAG, DAG e MAG+DAG utilizando óleo de soja.

Tabela 1 – Matriz do planejamento fatorial do tipo Plackett & Burman (valores codificados e reais) com resposta em termos de teor de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) (% , m/m)

Ensaio	Temp. (°C)	Razão* Molar	Conc. De Enzima (% , m/m)	Agitação (rpm)	Potência (%)	MAG (% , m/m)	DAG (% , m/m)	MAG+DAG (% , m/m)
1	1 (70)	-1 (0,8:1)	1 (10)	-1 (0)	-1(40)	5,91	4,18	10,46
2	1 (70)	1 (3:1)	-1 (2,5)	1 (600)	-1 (40)	10,01	23,08	33,09
3	-1 (40)	1 (3:1)	1 (10)	-1 (0)	1 (100)	1,20	2,18	3,38
4	1 (70)	-1 (0,8:1)	1 (10)	1 (600)	-1 (40)	30,13	32,32	62,45
5	1 (70)	1 (3:1)	-1 (2,5)	1 (600)	1 (100)	8,73	11,71	20,44
6	1 (70)	1 (3:1)	1 (10)	-1 (0)	1 (100)	2,30	6,61	8,91
7	-1(40)	1 (3:1)	1 (10)	1 (600)	-1 (40)	6,19	14,06	20,25
8	-1 (40)	-1 (0,8:1)	1 (10)	1 (600)	1 (100)	6,74	8,01	14,75
9	-1 (40)	-1 (0,8:1)	-1 (2,5)	1 (600)	1 (100)	2,78	2,33	5,01
10	1 (70)	-1 (0,8:1)	-1 (2,5)	-1 (0)	1 (100)	2,67	6,22	8,89
11	-1 (40)	1 (3:1)	-1 (2,5)	-1 (0)	-1 (40)	0,24	1,56	1,80
12	-1 (40)	-1 (0,8:1)	-1 (2,5)	-1 (0)	-1 (40)	0,18	0,47	0,75
13	0 (55)	0 (1,9:1)	0 (6,25)	0 (300)	0 (70)	7,7	14,74	22,44
14	0 (55)	0 (1,9:1)	0 (6,25)	0 (300)	0 (70)	9,9	12,17	22,16
15	0 (55)	0 (1,9:1)	0 (6,25)	0 (300)	0 (70)	7,04	14,75	21,79

Na Tabela 1 pode-se observar que o ensaio que apresentou maior rendimento foi o 4 (62,45%), este ensaio corresponde à temperatura mais elevada (70 °C), menor razão molar entre os substratos de

(0,8:1), maior concentração de enzima (10% m/m), maior agitação (600 rpm) e menor potência de ultrassom (40%), em 3 horas de reação. Os dados apresentados na Tabela 7 e seus resultados quanto ao rendimento total da reação (% MAG+DAG) foram tratados estatisticamente e os principais efeitos das variáveis são apresentados na Figura 12, onde se pode observar que a temperatura e a agitação apresentaram um efeito positivo e significativo ($p < 0,05$) sobre a conversão em MAG+DAG.

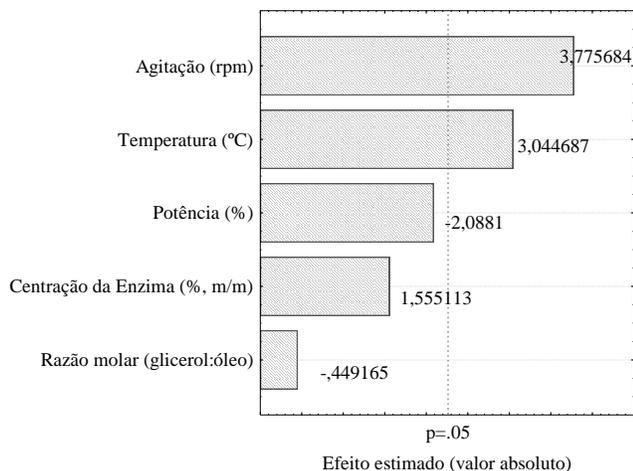


Figura 1 - Gráfico de Pareto para a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis com a lipase Novozym 435 em sistema livre de solvente em banho de ultrassom com óleo de soja em função das variáveis independentes.

Os resultados em conversão em MAG e DAG (~62%) obtidos nesta primeira avaliação podem ser considerados relevantes, principalmente quando considerado o curto tempo de reação e a ausência de solventes e/ou surfactantes, que tornariam o processo mais oneroso e com maiores custos de produção e separação do produto final.

Com base nos resultados obtidos no planejamento Plackett & Burman e na busca da maximização da produção de MAG e DAG, foram realizados planejamentos sequenciais, do tipo Delineamento Composto Central DCC 2³. Este planejamento também foi realizado com triplicata no ponto central a fim de calcular o erro experimental e em todos os experimentos o tempo de reação foi fixado em 3 horas. Nele manteve-se constante a concentração de enzima (10% m/m) e razão molar (glicerol: óleo) (0,8:1), variando a temperatura, a potência do ultrassom e a agitação nas reações. A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento DCC 2³ com os valores codificados e reais, as respostas para a produção de MAG E DAG. O tratamento estatístico dos dados apresentados na Tabela 2 é apresentado na Figura 2.

Tabela 2 – Matriz do planejamento de experimentos DCC 2³ (valores reais e codificados) com resposta em termos de teor de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) (% , m/m)

Ensaio	Temperatura (°C)	Potência (%)	Agitação (rpm)	MAG (% , m/m)	DAG (% , m/m)	MAG+DAG (% , m/m)
1	-1 (60)	-1 (0)	-1 (600)	16,64	25,39	42,03
2	1 (80)	-1 (0)	-1 (600)	25,011	31,52	56,63
3	-1 (60)	1 (80)	-1 (600)	23,49	29,01	52,51
4	1 (80)	1 (80)	-1 (600)	24,73	31,83	56,57
5	-1 (60)	-1 (0)	1 (1200)	23,64	25,75	49,39
6	1 (80)	-1 (0)	1 (1200)	31,36	26,51	57,88
7	-1 (60)	1 (80)	1 (1200)	25,01	31,87	56,88
8	1 (80)	1 (80)	1 (1200)	28,10	29,37	57,47
9	0 (70)	0 (40)	0 (900)	22,30	34,80	57,1
10	0 (70)	0 (40)	0 (900)	20,85	41,25	62,12
11	0 (70)	0 (40)	0 (900)	27,48	27,40	54,88

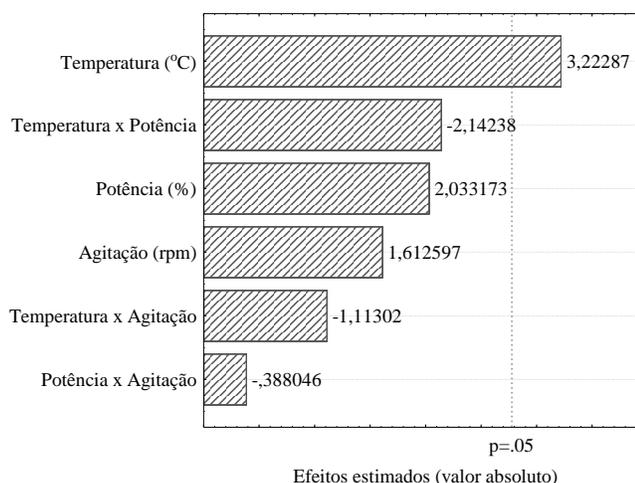


Figura 2 - Gráfico de Pareto para a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis utilizando como substrato óleo de soja em função das variáveis independentes.

Em reações que envolvem o uso de glicerol, óleo e lipase imobilizada, um sistema trifásico é obtido, com uma fase oleosa hidrofóbica, uma fase hidrófila glicerol e uma fase sólida à qual a enzima é ligada (Pawongrat *et al.*, 2007). Por isso, um obstáculo importante que tem de ser ultrapassado nestas reações é a baixa miscibilidade entre os substratos, óleo e glicerol (Feltres *et al.*, 2012). A irradiação de ultrassom provoca a cavitação, fenômeno de formação e subsequente colapso de microbolhas de gás em um líquido. Quando bolhas da cavitação entram em colapso perto do limite de fase de dois líquidos imiscíveis, a onda de choque resultante pode proporcionar uma agitação

muito eficiente, havendo uma mistura das camadas, aumentando as taxas de reação em reações heterogêneas (Yachmenev *et al.*, 2004; Yoshimoto *et al.*, 2005), evitando que o glicerol fique aderido à superfície da enzima.

3.1. Cinética da produção de mono- e diacilgliceróis em sistema livre de solvente em banho de ultrassom

A fim de avaliar o efeito da potência do ultrassom na síntese de MAG e DAG, foram mantidas fixas as condições: temperatura 70 °C, razão molar dos substratos de 0,8:1, concentração de enzima 10% (m/m) e agitação mecânica em 600 rpm, variando a potência do ultrassom em 0, 40, 80 e 100%. O tempo definido para as realizações das reações de glicerólise foi de 4 horas com amostragem destrutiva. As amostras foram retiradas nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos

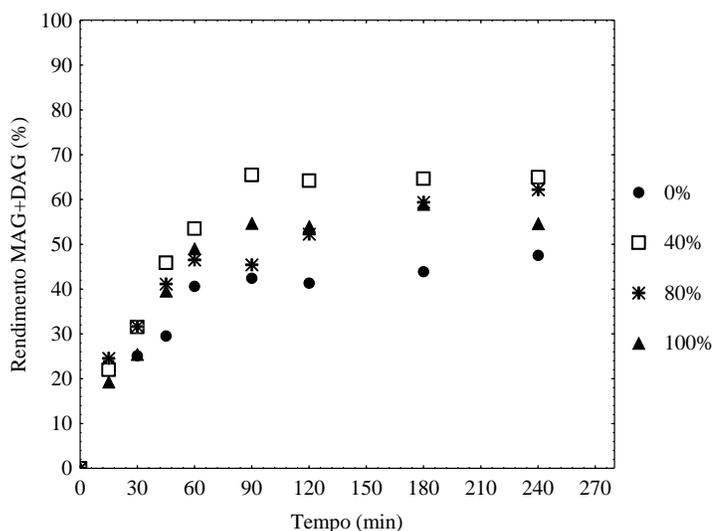


Figura 3 - Avaliação cinética da reação de glicerólise de óleo de soja em função da potência do ultrassom, em termos de conversão de MAG e DAG, na condição maximizada de produção (70 °C, razão molar dos substratos de 0,8:1, concentração de enzima 10% (m/m) e 600 rpm.

Na Figura 3 podem ser observadas as curvas quanto à avaliação cinética da reação de glicerólise de óleo de soja em função da potência do ultrassom em termos de conversão de MAG e DAG, na condição maximizada de produção. Pode-se observar que após 90 minutos de reação e 40% de potência de ultrassom foram obtidos os maiores valores em conversão de MAG+DAG (65%). Os altos rendimentos obtidos nas reações com irradiações, comparados aos valores obtidos quando se trabalhou sem irradiação de ultrassom (0%), contribui para a teoria de que a irradiação de ultrassom pode ser considerada uma ferramenta alternativa para a melhoria dos processos químicos, físicos e biológicos, particularmente em sistemas de reação altamente viscosos e não miscíveis (Löning, Horst e Hoffmann, 2002).

4. CONCLUSÃO

De maneira geral, verificou-se que o uso do ultrassom nas reações de glicerólise enzimática dos óleos de soja contribuiu, em termos de eficiência do processo, diminuindo a resistência à transferência de massa no sistema glicerol/óleo/lipase imobilizada, para maximização da produção de MAGs e DAGs. O presente estudo contribuiu para o melhor entendimento da reação da glicerólise enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom, utilizando como substrato óleo de soja, que apresenta altos valores nutricionais e menores custos de mercado, utilizando como meio o ultrassom, uma tecnologia considerada limpa e viável economicamente, trazendo assim novas perspectivas para a produção de emulsificantes com alto valor de mercado.

6. REFERÊNCIAS

- ANTUNES, O. A. C. Interfaces com a Indústria. *Química Nova*, v. 28, p. 64-75, 2005.
- FELTES, M. M. C.; PITOL, L. O.; CORREIA, J. F. G.; GRIMALDI, R.; BLOCK, J. M.; NINOW, J.L. Incorporation of medium chain fatty acids into fish oil triglycerides by chemical and enzymatic interesterification. *Grasas y Aceites*, v. 60, n. 2, p. 168-176, 2009.
- FELTES M. M. C., OLIVEIRA D., BLOCK J. M. & NINOW J. L. The Production, Benefits, and Applications of Monoacylglycerols and Diacylglycerols of Nutritional Interest: review. *Food and Bioprocess Technology*, 2012.
- FIAMETTI, K. G.; ROVANI, S.; OLIVEIRA, D.; CORAZZA, M. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of solvent-free lipase catalyzed production of monoacylglycerols from olive oil in Aerosol-OT surfactant. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 48, n. 2, p. 708-712, 2012.
- KRÜGER, R. **Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de oliva**. 2010. 131p. (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis.
- LERIN, L. A. Produção enzimática de ascorbil palmitato em diferentes sistemas reacionais. 2010. (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica, UFRJ, Rio de Janeiro.
- LÖNING, J.-M.; HORST, C.; HOFFMANN, U. Investigations on the energy conversion in sonochemical processes. *Ultrason. Sonochem.*, 9, 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.
- PAWONGRAT, R., XU, X., & H-KITTIKUN, A. Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. *Food Chem.*, 104, p. 251–258, 2007.
- XU, X. *Biocatalysis for lipid modifications*. DUNFORD, N. T. e DUNFORD, H. B. (Ed.), 2004.

YACHMENEV, V.G.; BLANCHARD, E.J.; LAMBERT, A.H. Use of ultrasonic energy for intensification of the bio-preparation of greige cotton, *Ultrason.*, 42 87–91, 2004.

YOSHIMOTO M.; LI, C.; OGATA H.; TSUKUDA, N.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Effects of ultrasonic intensity and reactor scale on kinetics of enzymatic saccharification of various waste papers in continuously irradiated stirred tanks, *Ultrason. Sonochem.* 12, p. 373–384, 2005.