

HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE FRITURA EM SISTEMA DE ULTRASSOM UTILIZANDO LIPASES IMOBILIZADAS

M. C. P. ZENEVICZ¹, C. M. T. SANTIN¹, M. C. FEITEN¹, A. FURIGO Jr¹, D. de OLIVEIRA¹, J. V. de OLIVEIRA¹

1 Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

E-mail para contato: maracristinazenevicz@gmail.com

RESUMO – Este trabalho tem como objetivo estudar novas alternativas para produção de ésteres via hidroesterificação enzimática de óleo de fritura em banho de ultrassom, por meio de duas etapas, hidrólise enzimática em modo batelada seguida de esterificação dos ácidos graxos em reator em modo contínuo. Para a reação de hidrólise utilizou-se a seguinte condição: razão molar 1:9 (óleo/água), 132 W de potência ultrassônica, 40 °C, agitação mecânica de 300 rpm e Lipozyme TL IM. Para as reações de esterificação utilizou-se como substratos ácidos graxos gerados pela hidrólise da etapa anterior nas condições: razão molar 1:6 (ácido graxo/ etanol), 132 W, 65 °C vazão de alimentação de substrato de 2,5 mL/min, Novozym 435 e Lipozyme TL IM. O sistema experimental utilizado neste trabalho consiste num reator de vidro, empacotado e submerso em um banho de ultrassom. A acidez das amostras foi quantificada pelo método IUPAC 2.201, através de titulação com KOH 0,1M. Foram obtidas conversões máximas em ésteres etílicos de 91% para Novozym 435, e apenas 45 % para a Lipozyme TL. Estes resultados demonstram que a Novozym 435 apresentou melhor potencial para síntese de ésteres etílicos.

1. INTRODUÇÃO

O uso da tecnologia enzimática vem ganhando cada vez mais espaço, de um lado devido às vantagens que apresenta frente aos processos convencionais, e de outro devido ao desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitam a obtenção de enzimas de diversas fontes com um custo reduzido. (Castro *et al.*, 2004).

O processo mais comum para obtenção de ésteres a partir de triglicérides é a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais. Mais recentemente vem sendo estudado também o processo de hidroesterificação, o qual permite, além da utilização de uma ampla variedade de lipases de baixo valor comercial, o uso de uma maior variedade de matérias primas, incluindo óleos de fritura, óleos de elevada acidez bem como matérias graxas residuais do processamento de óleos.

A hidroesterificação é um processo que envolve uma etapa de hidrólise seguida de uma etapa de esterificação. A hidrólise consiste em uma reação química entre a gordura ou o óleo com a água, gerando-se glicerina e ácidos graxos. Após a hidrólise, a glicerina é removida e os ácidos graxos gerados são então esterificados com um álcool que “neutraliza” a acidez presente, gerando ésteres de elevada pureza. Na reação também se obtém, como subproduto, a água, que pode retornar para o processo de hidrólise (Encarnação, 2008).

Na busca por novas técnicas que possam melhorar o rendimento de processos industriais, a tecnologia que emprega ultrassom vem se mostrando como uma alternativa promissora devido aos benefícios que pode promover. Alguns estudos relatam que o uso de ultrassom possibilita a formação de emulsões mesmo sem a presença de substâncias surfactantes, devido à ocorrência de fenômenos no meio que promovem uma efetiva agitação e dispersão de fases em sistemas heterogêneos. (Kwiatkowska *et al.*, 2011; Chandralapa *et al.*, 2012).

As matérias-primas utilizadas na maioria dos processos de produção de ésteres (Biodiesel) são derivadas de triacilgliceróis de óleos vegetais comestíveis (Canakci e Sanli, (2008)). No entanto, estes óleos são relativamente caros, e uma vez que a matéria-prima na síntese do biodiesel corresponde a 50-85 % do total dos custos de produção, é desejável a utilização de materiais de partida de baixo custo, a fim de aumentar a competitividade comercial do biodiesel (Chen *et al.*, 2009 e Halim *et al.*, 2009). Matérias-primas de baixo valor incluem gordura animal e óleo residual de origem doméstica, industrial ou comercial isto justifica o uso do óleo de fritura utilizado neste trabalho. O etanol foi selecionado como o álcool, porque é menos tóxico do que o metanol e é disponível em abundância no Brasil.

Levando-se em consideração a importância do estudo dessa nova tecnologia, com base nos aspectos expostos anteriormente, este trabalho visa estudar novas alternativas para produção de ésteres via hidroesterificação enzimática de óleo de fritura em banho de ultrassom, por meio de duas etapas, hidrólise enzimática em modo batelada seguida de esterificação dos ácidos graxos em reator em modo contínuo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Especificação dos materiais

As lipases utilizadas para este trabalho foram as lipases comerciais imobilizadas Lipozyme TL IM e Novozym 435 adquirida da Novozymes Brasil. Como substratos para a hidrólise enzimática foi utilizado água destilada e óleo de fritura recolhidas de restaurantes locais. Como substratos para esterificação foi utilizado o ácido graxo gerado da etapa de hidrólise do óleo de fritura (AGF); álcool etílico (Merck, 99,9 % de pureza). Solvente n-hexano foi utilizado na filtração do óleo hidrolisado para remoção da enzima na hidrólise. Para a determinação do índice de acidez das amostras (A (% m)) foram utilizados, hidróxido de potássio (Vetec); etanol: éter etílico (1:1 v/v) (95 % de pureza, Vetec); fenolftaleína (Nuclear).

2.2 Procedimento experimental

Na figura 2 esta apresentada o esquema do processo de hidroesterificação.

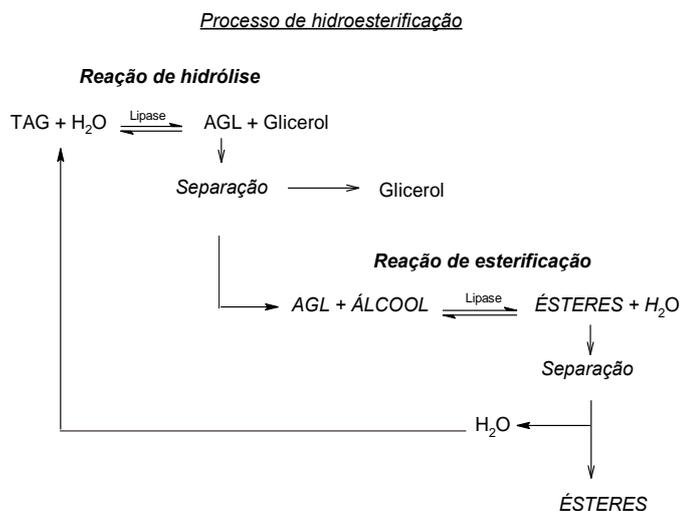


Figura 1 - Esquema simplificado de produção de ésteres por hidroesterificação.

2.2.1 Hidrólise enzimática em modo batelada

Na etapa de hidrólise obteremos o hidrolisado do óleo de fritura (AGF). O aparato experimental utilizado para os experimentos era constituído de um banho de ultrassom (modelo USC 1800A, UNIQUE - frequência de 40 kHz e potência máxima de 132 W), onde foram acoplados, em sua cuba, um agitador mecânico (agitador mecânico modelo RW 20 D, IKA) e o recipiente onde aconteceram as reações, conforme mostram a Figura 2.

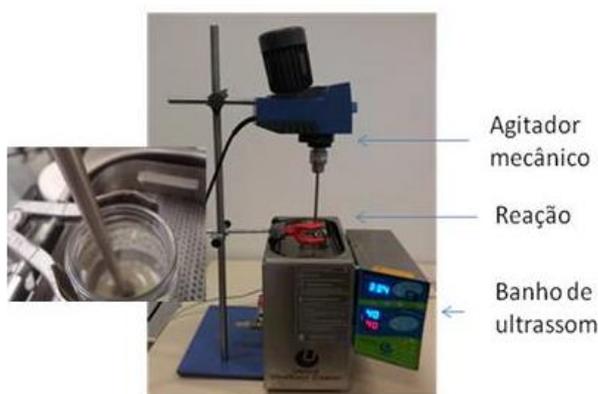


Figura 2 - Aparato experimental utilizado para hidrólise modo batelada.

As reações de hidrólise enzimática do óleo de fritura no modo batelada foram conduzidas em um erlenmeyer de 50 mL. Para cada experimento, eram pesados 21,8 gramas de óleo e aproximadamente 4,05 gramas de água destilada (razão 1:9 molar) e a quantidade adicionada de enzima 1% (m/m) eram calculadas sobre a massa total dos substratos. A mistura reacional era deixada sob agitação mecânica de 300 rpm em banho de ultrassom durante 2 horas de reação. As reações de hidrólise foram conduzidas em 100 % da potência do ultrassom (132 W) e temperatura de 40 °C. Percorrido o tempo reacional a amostra foi filtrada para separação da enzima com n-hexano, o n-hexano foi removido por destilação a vácuo e

medido o índice de acidez. Este hidrolisado (ácidos graxos do óleo de fritura) foi utilizado como substrato para a reação de esterificação.

2.2.2 Esterificação enzimática em reator contínuo

Nesta etapa será esterificado o ácido graxo do óleo de fritura gerado na etapa de hidrólise com etanol obtendo ésteres etílicos. O aparato experimental utilizado nesta etapa do trabalho consiste num reator de vidro com 13 mm de diâmetro interno, comprimento de 171 mm e volume de 29 mL empacotado com a lipase, submerso em um banho de ultrassom (Unique UltraSonicCleaner, modelo: USC-1800A, frequência de 40 KHz, potência de 132 W), alimentado com a mistura reacional de ácido graxo óleo fritura hidrolisado (AGF) na etapa anterior e álcool etílico (substrato), com uso de aproximadamente 9,7 g de lipase. A Figura 3 abaixo apresenta o aparato experimental utilizado neste trabalho.



Figura 3 – Aparato experimental utilizado para a produção de biodiesel enzimático por esterificação em modo contínuo e banho de ultrassom.

O procedimento experimental consistiu primeiramente no empacotamento do reator com a enzima e após acoplou-se o reator ao sistema reacional e imergiu-o no banho de ultrassom já acondicionado na temperatura (65 °C) e potência (100 %), iniciou-se o bombeamento contínuo dos substratos da carga ácida (AGF) e álcool etílico, previamente homogeneizado sob a mesma agitação durante a reação, por um agitador mecânico (modelo RW 20 D, IKA) inserido no frasco contendo a mistura reacional, a uma dada razão molar (AGF:álcool) e vazão volumétrica de alimentação do substrato (2,5 mL/min), até o completo preenchimento do sistema reacional, usando uma bomba peristáltica MARLOW 323. A bomba é utilizada para deslocar a mistura reacional para a zona de reação e manter a pressão do sistema. Todos os cálculos para se chegar ao tempo de residência foram calculados de acordo com Dalla Rosa, (2009). O cálculo do volume do reator foi realizado através de seu diâmetro interno e comprimento utilizado. A porosidade do leito foi determinada adicionando o cômputo da porosidade interna da enzima. Neste caso, a porosidade do leito deve considerar o volume do soluto (enzimas) que ocupa o leito do reator e o volume de poros da enzima, como mostra a seguinte equação:

$$\varepsilon_L = 1 - \left(\frac{V_S - V_P}{V_R} \right)$$

(1)

Onde:

ε_L é porosidade do leito;

V_S é o volume ocupado pelas enzimas no leito do reator;

V_R é o volume do leito do reator;

V_P é o volume de poros das enzimas que ocupam o leito do reator.

Para o cálculo do volume de soluto (VS) obteve-se as seguintes informações: número de unidades de enzima em determinada massa (realizado manualmente) e diâmetro médio das partículas da enzima (calculado pela média da observação do resultado de análise de MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura). O volume de poros (VP) foi então multiplicado pela massa da amostra de enzima empacotada no leito do reator. Neste caso, foi adotado como valor de volume de poros VP igual ao dado pela ficha técnica do fabricante da enzima (0,5 mL/g). O tempo de residência é dado pela equação 2.

$$\tau = \frac{\varepsilon_L \cdot V_R}{q} \quad (2)$$

Onde:

τ é tempo de residência;

ε_L é porosidade do leito;

V_R é o volume do leito;

q é vazão.

Após a mistura reacional percorrer toda a extensão do reator, a coleta das amostras foi realizada em frascos de amostragem (previamente pesados) após decorrido um tempo de residência da mistura na zona reacional. Em seguida, procedia-se a análise por titulação da quantificação dos ésteres etílicos.

3. Conversão dos ácidos graxos de óleo de fritura em ésteres obtidos por meio de reação de esterificação

A técnica da titulação foi realizada de acordo com a IUPAC 2.201 o AOCS Cd 3d - 63 e consiste na determinação da acidez do meio, devido a presença dos ácidos graxos livres. Estes ácidos são capazes de reagir com a solução de hidróxido de potássio e o resultado obtido é expresso em mg KOH por (g) de amostra e normalmente a acidez titulável corresponde ao dobro do percentual do ácido correspondente da amostra. Este procedimento é realizado com a pesagem de uma alíquota de ± 2 g de amostra em um erlenmeyer de 300 mL. Em seguida, adiciona-se 50 mL de uma solução etanol: éter etílico (v/v), homogeneizado e à esta, adiciona-se 3 gotas de indicador fenolftaleína 1 % para indicar o ponto de viragem (mudança de cor) na titulação com solução de KOH 0,1 N. A amostra não necessita de tratamento prévio por esta técnica, sendo esta, diretamente coletada do reator para ser analisada, sem necessidade de secagem para evaporação da água ou do excesso de solvente. O índice de acidez é determinado pela Equação 3.

$$A = \frac{56,1 \times V_{KOH} \times M_{KOH}}{M_{amostra}} \quad (3)$$

Onde:

- A é índice de acidez (mg KOH/g);
- 56,1 é o equivalente grama do KOH;
- V_{KOH} é o volume de KOH gasto na titulação (L);
- M_{KOH} é molaridade do KOH usado na titulação (mol/L);
- M_{amostra} é a massa de amostra utilizada para titular (g).

Para determinar a o percentual de conversão do ácido graxo vegetal é necessário determinar a acidez da solução alimentada no reator. Determinando-se a acidez inicial e final (após a reação) é possível determinar a conversão de ácidos graxos, que está diretamente relacionada com o teor em ésteres da mistura. O cálculo para conversão dos ácidos graxos é apresentado na Equação 4.

$$X (\%) = \left(\frac{A_i - A_t}{A_i} \right) \times 100 \quad (4)$$

- A_i é índice de acidez inicial;
- A_t é índice de acidez final.

A acidez no tempo t é calculada pontualmente, de acordo com a cinética realizada, ou seja, assim que a amostra é coletada já é devidamente pesada e titulada evitando a evaporação dos componentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na figura 4 apresenta-se a variação da conversão em função do tempo da reação de hidroesterificação enzimática do óleo de fritura, livre se solvente orgânico utilizando a tecnologia de ultrassom. O hidrolisado do óleo de fritura apresentou índice de acidez inicial (A_i) de 55,43 mg KOH/g.

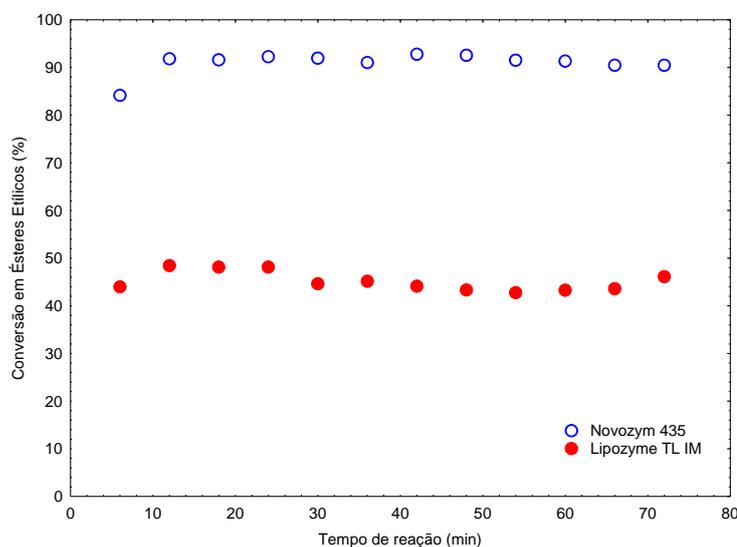


Figura 4 - Variação da conversão em função do tempo da reação de hidroesterificação enzimática em banho de ultrassom livre de solvente, em duas etapas hidrólise em modo batelada seguida por esterificação em reator contínuo. Condições Hidrólise: Razão molar (óleo de fritura/ água) 1:9, 40 °C, potência ultrassônica de 100 %, agitação mecânica 300 rpm e 1% (m/m) lipase Lipozyme TL IM . Condições Esterificação: Razão molar (carga ácida/etanol) 1:6, vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 100 % e lipase Novozym 345 imobilizada e Lipozyme TL IM.

Na Figura 4 pode-se observar as conversões em ésteres etílicos através da hidroesterificação enzimática de óleo de fritura. Foi comparada duas diferentes lipases (esterificação) a fim de minimizar os custos de lipases. A Novozym 435 apresentou conversões máximas em ésteres etílicos em torno de 91 % enquanto a Lipozyme TL IM obteve apenas de 45 % ambas a partir dos 12 min de reação. Estes resultados demonstram que a Novozym 435 apresentou melhor potencial para síntese de ésteres etílicos. Soares *et. al.*, (2013) estudaram a hidroesterificação para produção de ésteres etílicos onde hidrolisaram borra ácida de óleo de soja utilizando água supercrítica (razão molar borra ácida/ água (1:1)) em temperatura de 250 °C e 60 atm, obtendo conversões de 95 % em 1h e após esterificaram o ácido graxo obtido com sólidos fermentados da lipase *B. cepacia*, na temperatura 50 °C, razão molar ácido graxo/ etanol (1:3) obtendo conversões de 93 % em 31h de reação.

Trabalhos como de De Souza *et al.*, (2010); Talukder *et al.*, (2010) e Calvalcanti-Oliveira *et al.*, (2010) estudaram a produção de ésteres metílicos por hidroesterificação onde realizaram hidrólise enzimática e esterificação química. Adachi *et al.*, (2013) hidrolisou óleo de soja e óleo de palma utilizando lipase de *Candida rugosa*, na 30 a 50 °C em frascos agitados (1L, 150 rpm) e após esterificou os ácidos graxos obtidos com lipase *Aspergillus Oryzae* recombinante em temperatura de 30 °C e frascos agitados (150 rpm), na razão molar metanol/ ácido graxo (1,5:1) obtendo conversões em ésteres metílicos entorno de 90 a 93 % em 10 h de reação.

5. CONCLUSÕES

Em vista ao desenvolvimento de novas técnicas que possibilitem a produção de ésteres por hidroesterificação enzimático em ultrassom livre de solventes é um dos primeiros trabalhos utilizando tecnologia do ultrassom, ressaltando importância da continuidade desta pesquisa. Foram obtidas conversões máximas em ésteres etílicos de 91 % para Novozym 435, e apenas 45 % para a Lipozyme TL. Estes resultados demonstram que a Novozym 435 apresentou melhor potencial para síntese de ésteres etílicos.

6. REFERÊNCIAS

- CANAKCI, M.; SANLI, H., Biodiesel production from various feed stocks and their effects on the fuel properties, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v.35, p. 431–441, 2008.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, p. 146-156, 2004.

- CAVALCANTI-OLIVEIRA, E.D.; SILVA, P.R.; RAMOS, A.P.; ARANDA, D.A.G.; FREIRE, D.M.G. Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification, *Enzyme Res.* v. 2011 p. 1–8, 2010.
- CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing, *Ultrasonics Sonochemistry*, v.19, p.975-983, 2012.
- CHEN, Y.M.; XIAO, B.; CHANG, J.; FU, Y.; LV, P.M.; WANG, X.W. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor, *Energy Convers. Manage.* V. 50, p. 668–673, 2009.
- DALLA ROSA, C.D.; MORANDIM, M.B.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V. Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5818–5826, 2009.
- DE SOUSA, J.S.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E.D.; ARANDA, D.A.G.; FREIRE, D.M.G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* V. 65, p. 133–137, 2010.
- ENCARNAÇÃO, A. P. G. Geração de biodiesel pelos processos de Transesterificação e hidroesterificação, Uma avaliação econômica. Rio de Janeiro, 2008, Tese de Mestrado. Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- HALIM, S.F.A.; KAMARUDDIN, A.H. FERNANDO, W.J.N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies, *Bioresour. Technol.* v.100, p. 710–716, 2009.
- KWIATKOWSKA, B.; BENNETT, J.; AKUNNA, J.; WALKER, G. M.; BREMNER D. H., Stimulation of bioprocesses by ultrasound. *Biotechnology Advances*, v.29, p. 768-780, 2011.
- TALUKDER, M.M.R.; WU, J.C.; CHUA, L.P.L. Conversion of waste cooking oil to biodiesel via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification, *Energy Fuels*, v.24, p. 2016–2019, 2010.