

HIDRÓLISE ASSISTIDA POR ULTRASSOM DO ÓLEO DE CRAMBE (*Crambe abyssinica*) EM MEIO LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO

B. T. F. MELLO¹, G. M. RODRIGUES¹ e C. SILVA¹

¹ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Tecnologia
E-mail para contato: camiladasilva.eq@gmail.com

RESUMO – O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrolisado, rico em ácidos graxos livres (AGLs), a partir do óleo de Crambe. Os experimentos foram conduzidos em banho de ultrassom, utilizando a enzima Lipozyme® TL IM como catalisador em meio livre de solvente orgânico. Os experimentos avaliaram o efeito do teor de água, temperatura, percentual de catalisador e tempo de reação. Os resultados obtidos reportam maiores rendimentos com adição de 40% de água (em relação à massa de óleo) e temperatura de 45°C. O percentual de catalisador favorece a reação até percentuais de 10% (em relação à massa de substratos), sendo que acima deste percentual não é observada diferença significativa no rendimento ($p > 0,05$), para as reações conduzidas em 4 horas. O efeito do tempo reacional relatou que as reações conduzidas com tempos acima de 2 horas não ocasionam o aumento no teor de AGLs.

1. INTRODUÇÃO

A busca por matéria-prima de baixo custo e sem fins alimentícios para a produção de biodiesel tornou-se necessária do ponto de vista tecnológico e econômico. O Crambe (*Crambe abyssinica*) surgiu como uma boa opção, por ser uma planta com alto teor de óleo, com uma cultura de ciclo curto, em média 90 dias, e com produtividade entre 1.000 e 1.500 quilogramas por hectare (Silva *et al.*, 2013). As sementes de Crambe possuem ~35-60% de óleo em sua semente e 20-40% de proteína. Os ácidos graxos predominantes em sua semente são: erúcido (58-66%) e oleico (17,2%) tornando o óleo impróprio para o consumo humano e tendo seu cultivo focado na produção de biodiesel (Maciel *et al.*, 2014).

Recentemente, é proposta a produção de biodiesel por hidroesterificação, para substratos com elevada acidez e umidade, que consiste na hidrólise dos triglicerídeos seguida da esterificação dos ácidos graxos obtidos (Meng *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011). Como cerca de 80% do custo de produção do biodiesel é proveniente do custo da matéria-prima, a hidroesterificação permite um significativo salto na viabilidade de um projeto para produção de biodiesel (Hass *et al.*, 2006; Ranganathan *et al.*, 2008). Portanto, ao invés de diminuir a acidez de uma matéria-prima através de um refino, a hidrólise aumenta propositadamente a acidez da mesma. Após a hidrólise, os ácidos graxos gerados são então esterificados, obtendo-se os ésteres de ácidos graxos (Meng *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011).

Na produção de biodiesel por hidroesterificação, a catálise heterogênea enzimática tem como principais atrativos a facilidade de separação do catalisador do processo e a pureza do glicerol gerado como subproduto, além da possibilidade de reutilização do catalisador no processo (Ranganathan *et al.*, 2008). A hidrólise enzimática tem algumas vantagens sobre a química, uma vez que requerem temperaturas mais baixas, que previne a degradação dos produtos e reduz os custos energéticos (Antczak *et al.*, 2009).

A reação dos triglicerídeos com água (hidrólise) ocorre na interface entre as duas fases, uma vez que estes substratos são imiscíveis entre si. O contato entre as duas fases é usualmente promovida por agitação mecânica, especialmente a nível industrial, mas recentemente têm-se tentado solucionar este problema através da aplicação do ultrassom (Yu *et al.*, 2010; Feiten *et al.*, 2014). Nas reações assistidas por irradiação ultrassônica, as cavitações (formação, aumento e implosão de bolhas no meio reacional) geradas pelo ultrassom, aumentam a miscibilidade entre os reagentes, aumentando a transferência de massa entre as duas fases através do fornecimento de aquecimento e de mistura. A cavitação provoca um aumento localizado de temperatura na fronteira das fases e fornece a energia mecânica para a mistura e a energia de ativação necessária para iniciar a reação. O colapso das bolhas de cavitação rompe a fronteira de fase e promove a emulsificação por jatos ultrassônicos. Estes efeitos aceleram a velocidade da reação e encurtar a sua duração (Thanh *et al.*, 2010).

Dentro do contexto descrito, este trabalho está focado na obtenção de hidrolisado do óleo de crambe, rico em AGLs, a ser utilizados em reações de esterificação. Os experimentos foram conduzidos em banho de ultrassom avaliando o efeito das variáveis operacionais (percentual de água, temperatura, percentual de catalisador e tempo de reação) no rendimento em AGLs, utilizando a enzima Lipozyme® TL IM como catalisador em meio livre de solvente orgânico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Nas reações de hidrólise foram utilizados óleo de Crambe (Fundação MS) e como catalisador a enzima Lipozyme® TL IM. A composição química do óleo usado neste trabalho encontra-se reportada na Tabela 1. O teor de AGLs ($\text{mg } 100 \text{ mg}^{-1}$) e conteúdo de água (% mássico) foi determinado em aproximadamente $1,88 \pm 0,1$ e $0,016$, respectivamente. Na etapa de titulação das amostras foram utilizados: solução de éter etílico:álcool etílico 2:1 (v:v) (Vetec/Nuclear), hidróxido de sódio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (Nuclear) e o indicador fenolftaleína (Nuclear).

Tabela 1 – Composição química do óleo de crambe.

Ácido Graxo	Percentual (%)
Palmítico (C16:0)	1,950 ± 0,138
Palmitoleico (C16:1n-7)	0,159 ± 0,012
Esteárico (C18:0)	0,980 ± 0,038
Oleico (C18:1n-9)	17,434 ± 0,604
cis-vacênico (C18:1n-7)	0,460 ± 0,041
Linoleico (C18:2n-6)	7,466 ± 0,260
Linolenico (C18:3n-3)	4,232 ± 0,591
Araquídico (C20:0)	1,167 ± 0,002
Eicosadienoico (C20:2n-6)	1,081 ± 0,011
Erúxico (C22:1n-9)	58,394 ± 0,005

2.1. Procedimentos

As reações foram conduzidas em um Erlenmeyer de vidro de 50 mL, conectado a um banho ultrassônico com controle da temperatura (Ultronique, Q 5.9 /40A) e agitador mecânico (IKA RW 20 D). A enzima foi colocada em estufa a 40 °C/1 h para ativação. Os substratos (óleo vegetal e água) foram adicionados ao reator, sendo o mesmo acoplado ao banho ultrassom dando início ao aquecimento. Após atingida a temperatura de reação, a enzima era adicionada ao meio e iniciada a agitação do sistema e o fornecimento de irradiação ultrassônica. Os experimentos foram realizados com agitação fixa em 600 rpm e potência máxima do banho ultrassônico (132 W), tais condições foram definidas baseadas no trabalho de Feiten et al. (2014). No final da reação, a enzima foi removida por filtração à vácuo, e os produtos foram recuperados para posterior análise. As amostras sem a enzima foram transferidas para frascos de amostragem e colocados em rota evaporador à vácuo para a evaporação do excesso de solvente. Por fim, as amostras foram refrigeradas para posterior análise.

O percentual de ácidos graxos livres foi determinado com base no método Ca 5a-40 (AOCS; 1998), que se baseia no método de titulação ácido-base, utilizando uma solução etanólica de hidróxido de potássio (KOH) previamente padronizada (0,25 mol L⁻¹) como titulante. Cada amostra foi titulada em duplicata e o teor de AGLs nas amostras foi calculada a partir da equação 1:

$$\text{Teor de AGLs (\%)} = \frac{V.C.M}{10.m} \quad (1)$$

onde V corresponde ao volume da solução utilizada para a titulação em mL; M = massa molar do ácido oleico (282 g mol^{-1}), C= concentração do titulante (mol L^{-1}) e m é a massa da amostra em gramas (g).

Os dados foram submetidos à análise de variância, analisados pela ANOVA e teste de Tukey ($p>0,05$) para avaliar as diferenças das médias dos tratamentos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do Teor de Água

O efeito o teor de água (em relação à massa de óleo) sobre a hidrólise de óleo de crambe foi avaliada, mantendo-se a temperatura fixa em $65 \text{ }^\circ\text{C}$, percentual de catalisador (em relação aos substratos) a 10%, e tempos de reação de 2 e 4 horas (Figura 1). A Figura 1 mostra que o aumento da quantidade de água no meio reacional, na faixa de 20 a 40%, favorece a produção de AGLs. No entanto, quando um excesso de água foi aplicado ao meio (50%), não houve nenhum efeito significativo sobre o rendimento ($p>0,05$) nas condições avaliadas.

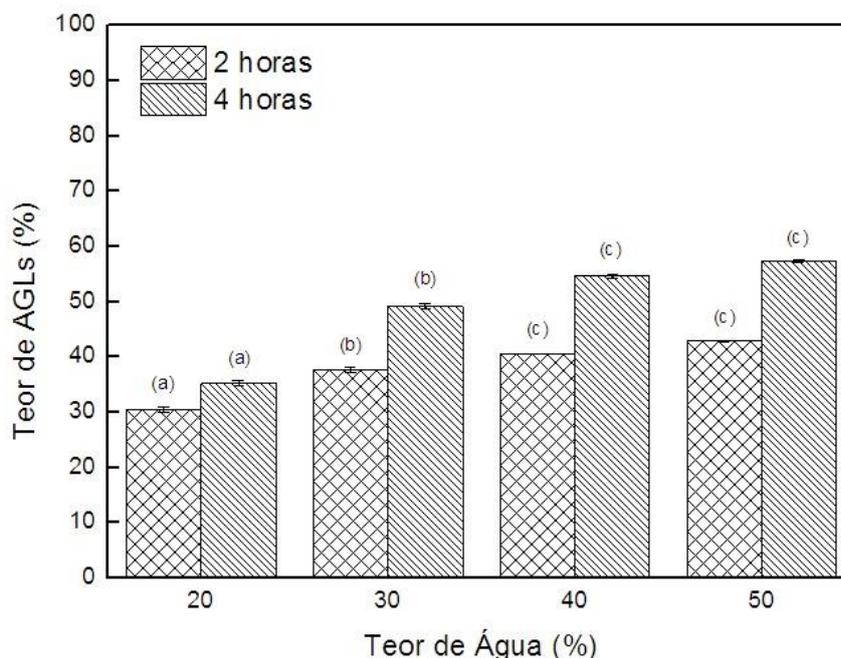


Figura 1 - Efeito do teor de água na hidrólise do óleo de crambe à $65 \text{ }^\circ\text{C}$ e percentual de catalisador de 10%. Médias seguidas de mesmas letras (para um mesmo tempo de reação), em cada coluna, não se diferem estatisticamente ($p>0,05$).

Liu et al. (2008), ao investigarem o efeito do ultrassom na hidrólise enzimática de óleo de soja, relatam que maiores quantidades de água no meio reacional resultam no aumento da produção de AGLs. Utilizando 10% de água, ~17% do óleo foi hidrolisado em AGLs, enquanto que, ao aumentar-se a proporção para 25%, um hidrolisado com 33% de AGLs foi obtido. Na produção do concentrado natural de beta-caroteno a partir de óleo de buriti por hidrólise enzimática, Ribeiro et al. (2012) observaram o acréscimo nos rendimentos em AGLs de 56,6% para 62,9% utilizando razões mássicas de óleo:água 14 e 26% , respectivamente utilizando a enzima TL IM (imobilizada). Raspe et al. (2013) reportam o efeito significativo do percentual de água de 10 a 50% no meio reacional de hidrólise do óleo de macaúba, utilizando a enzima Lipozyme® TL IM.

3.2. Efeito da Temperatura

A Tabela 2 apresenta o efeito da temperatura, avaliada no intervalo de 35 a 65 °C, utilizando 40% de água, percentual de catalisador (em relação à massa dos substratos) de 10% e 4 horas de reação. A partir da Tabela 2, pode-se observar que o aumento da temperatura aumenta a produção de AGLs no intervalo de 35 a 45 °C, obtendo teores de 58,6 e 62,76% de AGLs, respectivamente. Com o aumento da temperatura para 55 e 65 °C ocorre o decréscimo na produção de AGLs. Feiten et al. (2014) relatam que a temperatura de 65 °C é a ótima para utilização da enzima Lipozyme® TL IM, no entanto, neste trabalho melhor rendimento foram obtidos na temperatura de 45 °C. Awadallak et al. (2013) reportam que a utilização do ultrassom leva a evaporação da água disponível no meio reacional. Desta forma, acredita-se que o aumento da temperatura eleve as taxas de evaporação de água, ocasionando o decréscimo no teor de AGLs.

Tabela 2 – Efeito da temperatura na hidrólise do óleo de crambe utilizando 40% de água, percentual de catalisador de 10% e tempo de 4 horas. Médias seguidas de mesmas letras, em cada coluna, não se diferem estatisticamente ($p>0,05$).

Temperatura (°C)	Teor de AGLs (%)
35	58,63±0,49 ^a
45	62,75±0,08 ^b
55	60,76±0,25 ^c
65	54,70±0,37 ^d

3.2. Efeito do Percentual de Catalisador

A Tabela 3 apresenta os resultados dos experimentos realizados, da variação da concentração de catalisador de 5 a 15% (em relação à massa de óleo) obtidos à 45°C, 40% de água e 4 horas de reação. Pode-se observar a partir da Tabela 3, que o aumento no percentual de catalisador, de 5 a 10%, conduz à um aumento da produção de AGLs, de 54,9% à 62,8%. No entanto, teores acima de 10% não apresentam influência significativa na obtenção de AGLs ($p>0,05$), nas condições avaliadas. Isto pode ser explicado devido à saturação da

enzima na interface entre o óleo e a fase aquosa, onde o aumento da concentração da enzima não ocorre alterações significativas na taxa de reação (Rooney e Weatherly, 2001).

Tabela 3 – Efeito do percentual de catalisador no rendimento da hidrólise do óleo de crambe à 45 °C, 40% de água e 6 horas de reação. Médias seguidas de mesmas letras, em cada coluna, não se diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Catalisador (%)	Teor de AGLs (%)
5	54,97 ± 0,14 ^a
7.5	61,06 ± 0,17 ^b
10	62,76 ± 0,09 ^c
12.5	60,74 ± 0,91 ^c
15	62,22 ± 0,75 ^c

3.2. Efeito do Tempo de reação

O efeito do tempo sobre a hidrólise de óleo de crambe foi avaliada mantendo-se a temperatura fixa em 45 °C, percentual de catalisador (em relação aos substratos) de 7,5 e 10%, 40% de água e tempos de reação de 1, 2, 4, 6 e 8 horas (Figura 2).

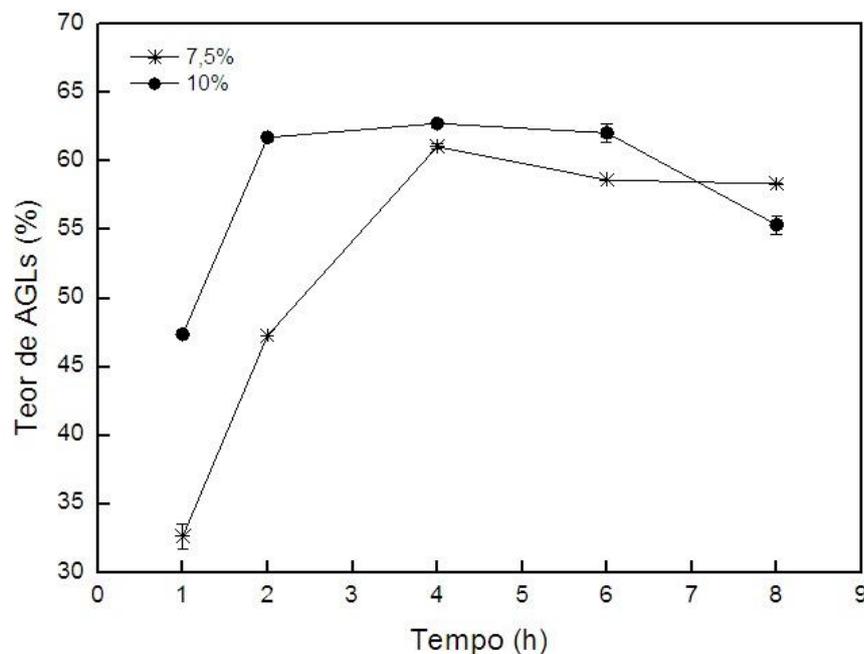


Figura 2 - Efeito do teor de água na hidrólise do óleo de crambe, à 65 °C e percentual de catalisador de 10%. Médias seguidas de mesmas letras (para um mesmo tempo de reação), em cada coluna, não se diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Os resultados apresentados na Figura 2 demonstram que tempos maiores que 2 horas não ocasionam o aumento do teor de AGLs e no tempo de 8 horas um pequeno decréscimo no rendimento em AGLs é observado, o que também foi relatado no trabalho de Feiten et al. (2014). Observa-se ainda, nos dados da Figura 2, o efeito mais pronunciado da concentração de catalisador nas reações conduzidas em 1 e 2 horas, evidenciando o efeito desta variável na taxa inicial de reação. Os resultados apresentados sugerem que o aumento do tempo de reação ocasione o aumento das taxas de evaporação de água no meio reacional. Para minimizar este problema, Feiten et al. (2014) sugerem a utilização do sistema batelada alimentada.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho a obtenção de hidrolisado do óleo de Crambe assistida por irradiação ultrassônica é reportada. Os resultados obtidos relatam melhores rendimentos com adição de 40% de água (em relação à massa de óleo) e temperatura de 45°C. O percentual de catalisador favorece a reação até percentuais de 10% (em relação à massa de substratos), sendo que acima deste percentual não é observada diferença significativa no rendimento ($p > 0,05$), para as reações conduzidas em 4 horas. O efeito do tempo reacional relatou que as reações conduzidas com tempos acima de 2 horas não ocasionam o aumento no teor de AGLs.

5. REFERÊNCIAS

- AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. *Official methods and recommended practices*. United States: Editora Champaign, 1998.
- AWADALLAK, J.A., VOLL, F., RIBAS, M.C., SILVA, C., CARDOZO-FILHO, L., SILVA, E.A. Enzymatic catalysed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: Diacylglycerol synthesis. *Ultrason. Sonochem.*, v.20, p.1002–1007, 2013.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic Biodiesel Synthesis-key Factors Affecting Efficiency of The Process. *Renewable. Ener.*, v.34, p. 1185–1194, 2009.
- FEITEN, M. C.; ROSA, C. D.; TREICHEK, H.; FURIGO Jr, A.; ZENEVICZ, M. C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Batch and Fed-Batch Enzymatic Hydrolysis of Soybean Oil Under Ultrasound Irradiation. *Biocatal. Agric. Biotech.*, v.01, p.01-03, 2014.
- HAAS, M. J.; MCALOON, A. J.; YEE, W. C.; FOGLIA, T. A.. A Process Model to Estimate Biodiesel Production Costs. *Bioresour. Technol.*, v.97, p.671-678, 2006.
- LIU, Y.; JIN, Q.; SHAN, L.; LIU, Y.; SHEN, W.; WANG, X. The Effect of Ultrasound on Lipase-catalyzed Hydrolysis of Soy Oil in Solvent-free System. *Ultrason. Sonochem.*, v.15, p.402–407, 2008.
- MACIEL, A. M.; MING, C.; RIBEIRO, A. P. B.; SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. A.; GONÇALVES, L. A. G. Physicochemical Properties of Interesterified Blends of Fully Hydrogenated *Crambe abyssica* Oil and Soybean Oil. *J.Am. Oil Chem. Soc.* v.91, p. 111-123, 2014.
- MENG, Y.; WANG, G.; ZHOU, Z.; LI, Y.; LIANG, X.; CHEN, J.; LI, Y.; LI, J. Two-step Synthesis of Fatty Acid Ethyl Ester From Soybean Oil Catalyzed by *Yarrowia Lipolytica* Lipase. *Biotech for. Biofuels.*, v.04, p.01-09, 2011.

- OLIVEIRA, E. C.; 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. *Enzy. Res.*, v.2011, p.01-08, 2011.
- RANGANATHAN S. V.; NARASIMHAN S. L.; MUTHUKUMAR, K. An Overview of Enzymatic Production of Biodiesel. *Bioresour. Technol.*, v.99, p.3975–3981, 2008.
- RASPE, D. T.; CARDOZO FILHO, L.; SILVA, C. Effect of Additives and Process Variables on Enzymatic Hydrolysis of Macauba Kernel Oil (*Acrocomia aculeate*). *Chemic. Enginee.*, v.2013, pp.01-08, 2013.
- RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A.; BARRETO, D. W. Production of Concentrated Natural Beta-carotene from Buriti (*Mauritia vinifera*) Oil by Enzymatic Hydrolysis. *Food and Bioprod. Process.*, v.90, n.2, p.141–147, 2012.
- ROONEY, D.; WEATHERLY, L. R. The Effect of Reaction Conditions Upon Lipase Catalysed Hydrolysis of High Oleate Sunflower Oil in a Stirred Liquid-liquid Reactor. *Process. Biochem.*, v.36, p.947–953, 2001.
- SILVA, M. A.; BIOAGGIONI, M. A. M.; SPEROTTO, F. C. S.; BEZERRA, P. H. S.; BRANDÃO, F. J. B. Qualidade do Óleo Bruto de Grãos de Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) Sob diferentes Métodos de Secagem. *Energ. Agric.*, v.28, p.193-199, 2013.
- THANK, L. T.; OKITSYU, K. O.; SADANAGA, Y.; TAKENAKA, N.; MAEDA, Y.; BANDOW, H. Ultrasound-assisted Production of Biodiesel Fuel From Vegetable Oils in a Small Scale Circulation Process. *Bioresour. Technol.*, v.101, p.639-645, 2010.
- YU, D., TIAN, L., WU, H., WANG, S., WANG, Y., MA, D., FANG, X. Ultrasonic Irradiation With Vibration for Biodiesel Production from Soybean Oil by Novozym 435. *Process. Biochem.*, v.45, p. 519-525, 2010.