

CINÉTICA DA HIDRÓLISE DE ÓLEO VEGETAL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA E USO DE ULTRASSOM

A. JACQUES. N¹, M. C. P. ZENEVICZ¹, REMONATTO, D.¹, A. FURIGO Jr¹, D. de OLIVEIRA¹ e J. V. de OLIVEIRA¹

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

RESUMO – Hidrólise é um processo pelo qual se podem obter diversos produtos de interesse na indústria. A utilização de enzimas para esse processo possibilita a produção de ácidos graxos em temperaturas mais amenas e a obtenção de um produto mais limpo. O ultrassom permite que não seja utilizado emulsificante para a formação de emulsões e fornece a agitação necessária para que a reação ocorra. As reações foram realizadas com agitação de 300 rpm em um frasco de vidro com potência ultrassônica de 132W, o uso de 10% de enzima Lipozyme TL IM (em relação a massa do substrato) e uma razão de óleo:água de 1:20 a 40 °C, variando somente o tempo de cada reação. Observou-se que após que o tempo de 2h o meio reacional se mantinha estável, e que a enzima poderia ser reutilizada com 50% de eficiência.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas para catalisar as reações tem se mostrado um grande avanço na química contemporânea, podendo reagir em temperaturas amenas sendo específicas e extremamente eficientes. O uso da enzima do tipo lipase possibilita a formação de um produto biodegradável com uma menor formação de resíduos (Castro *et al.*, 2004). Lipases são enzimas capazes de catalisar reações com lipídios (óleos) com diversos substratos sendo lipídios e água (hidrólise), ácido carboxílico e álcool (esterificação), éster e ácido carboxílico (acidólise), óleo vegetal ou gordura animal e álcool (transesterificação) (Carvalho *et al.*, 2003).

O uso de ultrassom fornece parte da energia necessária para que a reação ocorra e promove a formação de uma emulsão, sem uso de agitação mecânica, moinhos coloidais, homogeneizadores ou alta pressão. Porém na reação que foi realizadas utilizou-se agitação mecânica a 300 rpm para evitar o uso de emulsificantes. A irradiação ultrassônica pode aumentar ou diminuir a vida útil da enzima, dependendo da natureza do biocatalizador e dos substratos envolvidos na reação (Kwiatkowska *et al.*, 2011; Chandralapa *et al.*, 2012).

2. OBJETIVO

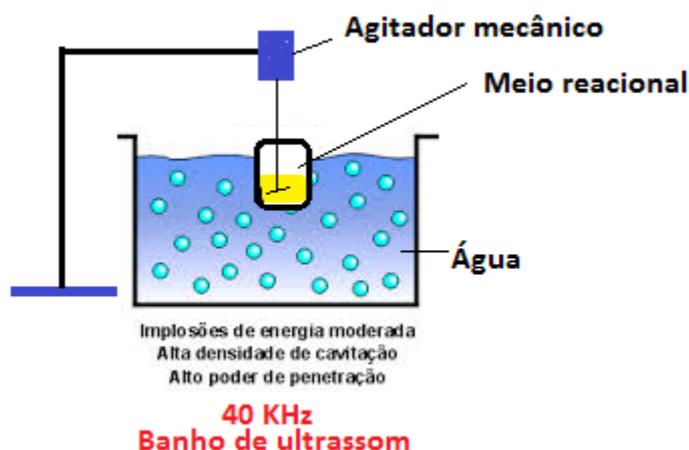
Este trabalho visa realizar o estudo cinético da hidrólise enzimática de óleo de soja, com o intuito de determinar o melhor tempo de reação para obter o máximo rendimento de ácidos graxos, utilizando ultrassom, em modo batelada. Também estudou a eficiência da enzima para reuso.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aparato experimental para a hidrólise enzimática

O aparato experimental para a reação consistiu de um banho de ultrassom (frequência de 37 kHz e potência de 132 W) onde foi colocado um recipiente de vidro contendo os reagentes e ao lado foi encaixado um agitador, como demonstrado na Figura 1.

Figura 1- Aparato experimental utilizado para os testes.



Como substratos foram utilizados óleo de soja (Soya) e água destilada, e o catalisador enzimático Lipozyme TL IM (lipase imobilizada, produzida pela Novozymes®, Araucária/PR).

3.2 Métodos de produção de ácido graxo através do óleo de soja

O processo foi otimizado na proporção de um molar de óleo de soja para 20 molar de água com uma massa de enzima equivalente a 10% da massa total do substrato, 137W de potência do ultrassom, a 40 °C e agitação mecânica de 300 rpm. Primeiramente adicionou-se em um frasco de vidro a água, o óleo e a enzima e colocou-se no banho com agitação mecânica, esperou-se o tempo designado da cinética destrutiva (onde foram testadas 0,25 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h). Após o tempo da reação a amostra foi retirada e lavada com iso-propanol, filtrada para recuperação da enzima e o solvente evaporado

através do rotaevaporador a vácuo à 60 °C. Após foi verificado o teor de acidez das amostras e a atividade da enzimática da enzima antes e depois da reação.

3.3 Métodos de quantificação

Determinação da atividade hidrolítica: Para a quantificação da atividade hidrolítica da enzima utilizou-se a método descrito por Calvacanti *et al.* (2005). Utilizou-se uma emulsão de azeite de oliva 100 g/L e goma arábica 50 g/L em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7, com uma agitação de 160 rpm em shaker. Em um erlenmeyer de 250 mL foi colocado 20 mL da emulsão formada e 0,1 g de enzima após 20 min a 40 ou 65 °C, após o período determinado a reação foi interrompida, e a reação paralisada pela adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Após titulou-se com uma solução de NaOH 0,05 mol/L até pH 11, também foi titulado o branco reacional não reagido, onde utilizou-se os mesmos reagentes que as amostras também tituladas.

Sendo definida uma unidade de atividade de hidrólise (UH) como a quantidade de enzima que libera 1mmol(milimol) de ácido graxo por minuto nas condições já descritas, o que pode ser determinado utilizando a Equação 1.

$$A_H = \frac{(V_a - V_b) * C_{NaOH} * 10^3}{t * M_E} \quad (1)$$

Onde:

A_H : corresponde à atividade hidrolítica (U/g);

V_a e V_b : V_b corresponde ao volume de NaOH utilizado para titular a amostra após a reação e V_a ao volume gasto para titular a amostra antes da reação;

C_{NaOH} : é a concentração da solução de NaOH (mol/L);

M_E : equivale a massa de enzima utilizado (0,1g);

t : corresponde ao tempo de reação (min).

Quantificação do teor de ácidos graxos livres: A quantificação dos ácidos graxos livres foi realizada através do método IUPAC 2.201 que consiste em dissolver aproximadamente 3 g da sua amostra em 50 mL de uma solução etanol e éter 1:1(v/v). Coloca-se 3 gotas de fenolftaleína e titula-se com KOH 0,1 mol/L estando o recipiente da mistura sobre agitação constante, quando ocorre a mudança de coloração interrompe-se o fluxo de KOH imediatamente e verifica-se o volume do mesmo que foi utilizado. A acidez é calculada usando a Equação 2:

$$C_{AGL} = \frac{V * C_{KOH} * MM_{AGL}}{10 * M_a} \quad (2)$$

Onde:

C_{AGL} : corresponde ao teor de ácido graxo livre em porcentagem mássica (m/m,%);

V : é o volume da solução de KOH utilizado na titulação (mL);

C_{KOH} : significa a concentração da solução de KOH (mol/L);

MM_{AGL} : corresponde à massa molecular médio dos ácidos graxos presentes no óleo (282g/mol);

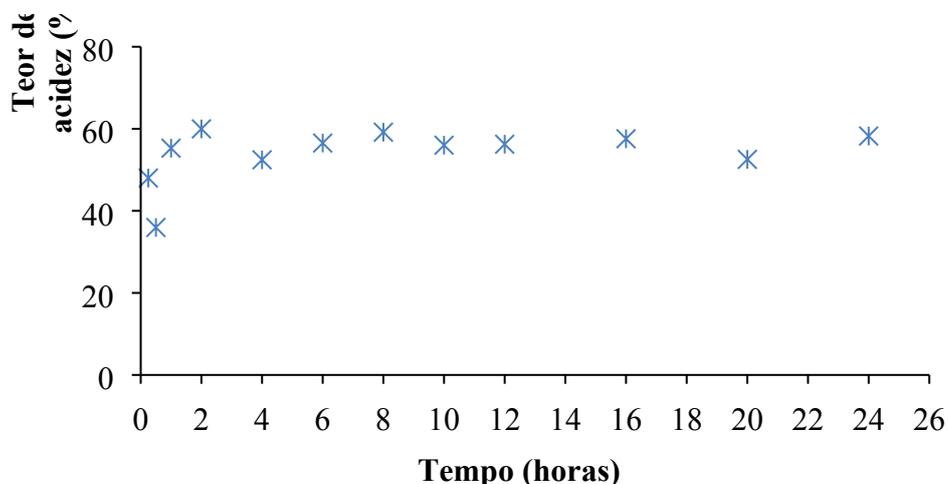
Ma : corresponde a massa da amostra (g).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Hidrólise enzimática

Foram realizados experimentos variando o tempo de 0,25 h até 24 horas, com razão óleo:água de 1:20 e concentração enzimática de 10% (m/m em relação ao substrato) em um reator de vidro, com agitação de 300 rpm e 137W de potência do ultrassom a uma temperatura de 40 °C, em modo batelada.

Figura 2- Hidrólise de óleo de soja catalisada por lipase Lipozyme TL IM com emprego do ultrassom, apresentado em teor de acidez em função do tempo de reação. Condições experimentais: razão molar óleo/água 1:9, 40 °C, 10 % (m/m) de enzima (baseado no total do substrato), 137W de potência do ultrassom e 300 rpm.



Como pode-se observar na Figura 2, onde é apresentada a cinética de hidrólise enzimática de óleo de soja, verificou-se que a partir de 2 h a reação se mantém com relativa estabilidade com algumas flutuações pois se trata de uma cinética destrutiva, e cada ponto é uma reação diferente causando flutuações nos dados obtidos. Porém mesmo com essa flutuações é possível notar visualmente quando a reação está finalizada pois forma-se uma mistura branca e viscosa no meio reacional, isso acontece mais ou menos após um período de 1,5 h, deixa-se um tempo de reação a mais para garantir que não haverá mais conversão. Há uma diferença na velocidade da reação dependendo de como o agitador está colocado na amostra, mexendo o frasco durante a reação de forma a remover a enzima que está fixada nos

cantos também faz com que se obtenha maior rendimento. Isso causa uma leve diferença entre no índice de acidez dos pontos.

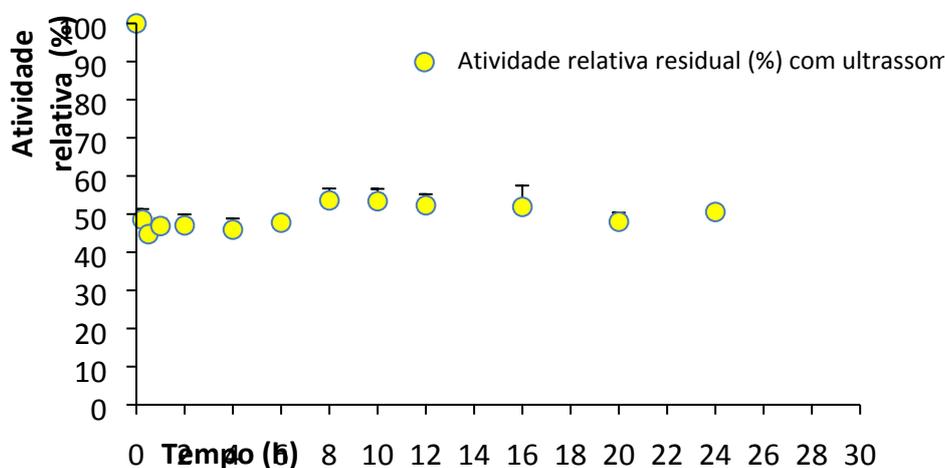
Porém podemos observar que após 2 horas os pontos ficam flutuando entre 50% e 60%, acredita-se que há influencia no rendimento da reação por causa da posição em que o agitador está colocado e a posição do ultrassom, não só do tempo . Sendo assim o tempo de 2 horas é o necessário para que a amostra atinja o valor máximo.

Cavalheiro (2013), utilizando uma proporção de 21:1 água:óleo de canola (m/m) e 12,5% (em relação à massa de óleo) de uma combinação das enzimas Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM em uma proporção de 4:1 respectivamente a uma temperatura de 40 °C sem o uso de ultrassom obteve uma conversão de 58,51% após 5 h de reação.

4.2 Atividade enzimática

Verificou-se a atividade enzimática em U/g da Lipozyme TL IM antes da enzima ser adicionada no meio reacional e após o tempo de reação. Na tabela 1 está apresentada os resultados da atividade inicial e final da lipase e suas respectivas atividades residuais.

Figura 1-Atividade enzimática da lipase Lipozyme TL IM antes da reação de hidrólise e após a reação



Podemos observar na tabela 1 que a atividade residual da enzima foi cerca de 50% em todas as amostras, sugerindo que a perda de atividade não está ligada ao quanto de triglicérides ela converteu em ácido graxo e sim ao choque de pH com o meio, pois mediou-se o pH inicial da reação na presença da água e o óleo e constatou-se um pH de 3,9, este relativamente ácido para a enzima. Segundo Dong; Wong; Chang (2010) as enzimas

sofrem grande influência do pH, sendo que biocatalizadores, em pH extremos podem perder totalmente a atividade. Porém, com variações mais brandas pode haver uma desnaturação parcial da enzima acarretando uma diminuição na atividade da enzimática. Essa diminuição não é considerada tão significativa (cerca de 50%), e a enzima está imobilizada o que permite que, posteriormente, ela seja recuperada. A reutilizada na reação, propicia o maior aproveitamento do catalisador e ganho financeiro.

5. CONCLUSÃO

Esse trabalho teve como objetivo a realização de uma cinética enzimática da hidrólise do óleo de soja e uso de ultrassom. Afim de encontrar o melhor tempo para que a reação obtenha um rendimento máximo. Realizou-se 12 testes variando o tempo de reação e mantendo constante a agitação de 300 rpm, a enzima Lipozyme TL IM, a proporção óleo: água de 1:20, o ultrassom a 137W de potência e 10% de enzima (m/m em relação ao substrato) e a temperatura de 40 °C.

Verificou-se que a posição do agitador influenciou na velocidade da reação, dessa forma o melhor tempo de reação podemos concluir que seja o de 2h, para que tenha menor gasto de energia e ainda conserve a conversão. Constatou-se também que a atividade enzimática após a reação era em torno de 50 % em relação a inicial e permanecia nessa quantidade independente de o quanto reagiu e do tempo decorrido que permite o reuso da mesma para reações posteriores.

6. REFERÊNCIAS

- CARVALHO, P. O.; CAMPOS P. R. B, NOFFS, M. A, OLIVEIRA, J. G. SHIMIZU, M. T. SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v. 26, p. 75-80, 2003.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v.27, p.146-156, 2004.
- CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D'A.; SILVA, P. R. DA; 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 Research Article ID 618692, 8 doi:10.4061/2011/618692. v. 2011, 2011.
- CAVALHEIRO, J. C. Hidrólise de óleo de canola catalisada por misturas de lipases imobilizadas, 2013.
- CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing, *Ultrason. Sonochem.* v.19, p.975-983, 2012.

DONG, H.P, WANG, Y.J., ZHENG, Y.G. Enantioselective hydrolysis of diethyl 3-hydroxyglutarate to ethyl (S)-3hydroxyglutarate by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Biocatalysis B, Enzymatic*, v.66, p 90-94, 2010

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.