

ESTUDO PRELIMINAR DA GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DOS ÓLEOS DE CANOLA, GIRASSOL E TABACO ENERGÉTICO

Jéssica Thomé¹
Rosana Louzada Muller²
Rosana de Cassia Souza Schneider³

RESUMO

Atualmente muitas políticas governamentais levam esforços para o desenvolvimento de tecnologias para que seja possível obter o biodiesel. Essa produção gera como coproduto glicerina, que representa cerca de 10% do volume total. O método mais utilizado nas indústrias é a glicerólise química, porém a glicerólise enzimática é uma alternativa ambientalmente mais correta para a utilização de glicerina na produção de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) a partir de óleos vegetais. Neste estudo foram realizados 16 ensaios de glicerólise enzimática dos óleos de canola, girassol e tabaco, com variação na quantidade de glicerol, lipase, tempo e temperatura em cada ensaio. Os produtos das reações foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Espectroscopia de Infravermelho (IV). Com o óleo de girassol, se obteve um porcentual de conversão de cerca de 40% de triacilglicerol (TAG) em MAG e DAG. Com óleo de canola e de tabaco a conversão foi menor. Foi verificado que a quantidade de lipase é um fator que influencia diretamente a reação de glicerólise, proporcionando o desenvolvimento de um método mais limpo que reduz os impactos ambientais do procedimento químico tradicional.

Palavras-chave: Glicerina. Glicerólise enzimática. Óleos vegetais. Lipase.

ABSTRACT

Currently, lots of governmental policies are making efforts in order to develop technologies making it possible to obtain biodiesel. This production generates as co-product glycerine, representing 10% of the total volume. The most used method inside industries is the chemical glycerolysis, however the enzymatic glycerolysis is a alternative more environmentally correct for the use of glycerine to produce monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) from vegetable oils. In this study were made 16 assays of enzymatic glycerolysis of canola, sunflower and tobacco oils, ranging the quantity of glycerine, lipase, time and temperature in each assay. The products from the reactions were evaluated through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Infrared Spectroscopy (IV). Using the sunflower oil, it was possible to get a conversion percentual of about 40% of triacylglycerol (TAG) in MAG

¹ Aluna do Curso de Química Industrial na Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. <jehthome@hotmail.com>

² Professora do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental pela Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC <ro-muller@bol.com.br>

³ Professora do Departamento de Química e Física e Mestrado de Tecnologia Ambiental da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC <rosana@unisc.br>

and DAG. With canola or tobacco oil the conversion was minor. It was verified that the quantity of lipase is a factor that directly influences in the glycerolysis reaction, providing a cleaner method development, reducing the environment impact compared to traditional chemical procedures.

Keywords: Glycerine. Enzymatic glycerolysis. Vegetable oils. Lipase.

1 INTRODUÇÃO

O aumento das preocupações ambientais com a qualidade do ar atmosférico tem levado a indústria a tornar viável a utilização de combustíveis alternativos que proporcionam uma queima mais limpa (MUNIYAPPA, 1996).

Com a produção de biodiesel em escala industrial, estão sendo geradas toneladas a mais de glicerina por ano, esta sendo o maior co-produto do processo (FREITAS, 2009). Neste contexto surge a possibilidade de utilização do glicerol como matéria prima para obtenção de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) (Freitas, 2006).

A síntese de MAG e DAG catalisada por lipases tem sido estudada como alternativa ao método clássico devido à seletividade das lipases e também à utilização de condições reacionais brandas, resultando em produtos de melhor qualidade e menor custo de energia (ZHU, 2011). Os substratos naturais utilizados pelas lipases são triacilgliceróis (TAG) e, sob condições naturais, as lipases catalisam a hidrólise da ligação éster da molécula (FREITAS, 2006).

Monoacilgliceróis (MAG) são surfactantes extensivamente utilizados devido às suas excelentes propriedades emulsionante, estabilizante, condicionante e plastificante. MAG consistem de uma cadeia de ácido graxo ligado covalentemente a uma molécula de glicerol através de uma ligação éster (ZHU, 2011). Eles representam cerca de 70% dos emulsificantes sintéticos nessas indústrias e são amplamente utilizados por não apresentarem efeitos colaterais quando ingeridos ou irritações na pele (VOLL, 2011).

Diacilgliceróis (DAG) são ésteres de glicerol em que dois dos grupos hidroxila são esterificados com ácidos graxos. Eles existem em duas formas isoméricas diferentes, 1,2-(2,3)-DAG e 1,3-DAG, e ocorrem como componentes naturais de glicerídeos em vários óleos e gorduras em níveis superiores a 10% (GONÇALVES, 2012).

Há afirmações recentes de que os óleos enriquecidos com DAG podem superar problemas de obesidade e de doenças associadas ao consumo excessivo de gordura. Por este motivo, esforços têm sido tomados para produzir DAG de uma forma mais rápida e econômica (PHUAH, 2012).

Os MAG e DAG são produzidos industrialmente através da glicerólise de triacilgliceróis com glicerol a altas temperaturas ($>200\text{ }^{\circ}\text{C}$), na presença de catalisadores inorgânicos. Devido às altas temperaturas utilizadas, esta reação gera subprodutos indesejáveis, decorrentes de reações de polimerização de ácidos graxos. Estes componentes conferem cor escura e odor desagradável ao produto (FREGOLENTE, 2009). A glicerólise química não é adequada para a produção de monoacilgliceróis insaturados, pois estes não são estáveis a altas temperaturas (ZHU, 2011).

Nos últimos quinze anos tem surgido um crescente interesse na tecnologia de modificação dos óleos e gorduras. Esta tendência pode ser atribuída principalmente ao fato desses materiais serem obtidos de fontes naturais e empregados como importantes matérias-primas para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias (CASTRO, 2004). A glicerólise é um tipo de reação de interesterificação utilizada para a transformação de óleos e gorduras (YAHVA, 1998).

A substituição dos catalisadores inorgânicos por lipases na síntese de gliceróis traz vantagens como temperaturas mais baixas, o que impede a coloração e formação de subprodutos e diminui o consumo de energia e geração de poluentes. Além disso, possibilita a síntese de gliceróis com ácidos graxos insaturados, que é dificilmente alcançado pelo método químico (ZHAO, 2011).

A glicerólise catalisada por enzimas oferece um elevado nível de conversão de substrato: 3 mol de MAG podem ser formados a partir de 1 mol de óleo. A glicerólise enzimática para a produção de MAG resulta em misturas de monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis e um pouco de glicerol (ZHU, 2011).

A composição final do meio reacional dependerá dos valores das constantes de equilíbrio de ambas as reações (formação de mono ou diacilgliceróis), sendo que os produtos são dependentes da temperatura e da proporção inicial de glicerol em relação à concentração do triacilglicerol de partida (YAHVA, 1998).

Vários pesquisadores têm centrado seus estudos em produção enzimática de DAG por esterificação, glicerólise e hidrólise parcial de óleos e gorduras devido às vantagens relacionadas às enzimas, tais como condições reacionais brandas, alta seletividade e eficiência de catálise (WANG, 2011).

A minimização da degradação térmica dos produtos e a economia de energia são provavelmente os maiores atrativos na substituição da glicerólise química pela enzimática. Além do crescente interesse das indústrias alimentícias em fabricar produtos mais saudáveis devido às exigências de mercado, que busca produtos livres de reações de polimerização e de gorduras (FREGOLENTE, 2009).

Considerando o exposto, o objetivo desse trabalho foi obter mono e diacilgliceróis a partir da reação de glicerina com diversos tipos de óleos vegetais (canola, girassol e tabaco) através da glicerólise enzimática e avaliar tais produtos. Inicialmente foram realizados ensaios preliminares para otimizar as condições reacionais para testar a capacidade da enzima em converter triacilglicerol a mono e diacilglicerol.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Visando a otimização das condições reacionais de glicerólise enzimática para obter o melhor rendimento, foram planejados 16 ensaios a serem realizados com glicerina comercial (PA) e óleos de canola, girassol e tabaco refinados. O óleo de tabaco foi parcialmente refinado.

Conforme o ensaio houve variações na quantidade de glicerol (razão mássica glicerol/óleo), porcentagem de lipase, tempo e temperatura de reação. A quantidade de óleo foi mantida fixa, bem como a quantidade de água (3% em relação à massa do óleo). A relação mássica de glicerina/óleo, quantidade de água e porcentagem de lipase foram baseadas em metodologia desenvolvida por Fregolente. A Tabela 1 mostra o planejamento experimental com as condições reacionais.

A Figura 1 mostra o fluxograma das reações, nas quais os reagentes são adicionados a um erlenmeyer com tampa e são agitados em shaker orbital modelo Marconi 420M, a temperatura e tempo determinados no planejamento representados na Tabela 1. Após o término da reação, as amostras são colocadas em repouso para haver a separação das fases e, em seguida, são retiradas alíquotas dos produtos para análises através de cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC).

3 ANÁLISE DOS ÓLEOS VEGETAIS

Os óleos vegetais (canola, girassol e tabaco) utilizados nas reações foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) e à espectroscopia de infravermelho (IV), para assim determinar suas condições iniciais e posteriormente compará-los com a mistura de produtos para confirmar a ocorrência das reações.

Tabela 1 – Planejamento – ensaios de glicerólise enzimática utilizando os óleos de canola, girassol e tabaco.

Ensaio*	Glicerina/óleo (m/m)	Lipase (%)**	Tempo (h)	Temperatura (°C)
1	0,9	10	24	45
2	1,2			
3	0,9	20		
4	1,2			
5	0,9	10	36	
6	1,2			
7	0,9	20		
8	1,2			
9	0,9	10	24	55
10	1,2			
11	0,9	20		
12	1,2			
13	0,9	10	36	
14	1,2			
15	0,9	20		
16	1,2			

* Utilização de quantidades fixas de óleo e água (3% em relação à massa do óleo).

** Porcentagem em relação à massa de óleo

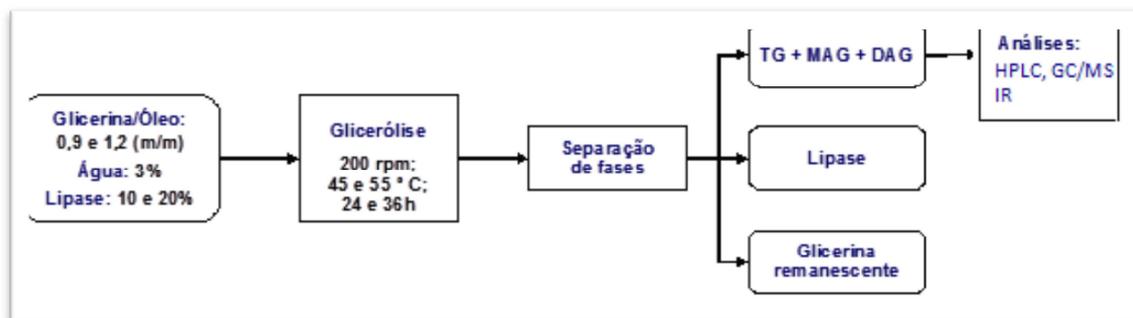


Figura 1 - Fluxograma com as etapas da reação de glicerólise enzimática.

3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As análises por HPLC foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu modelo UFLC, com coluna empacotada Phenomenex Luna C18 de sílica gel ou coluna Waters C18 e detector UV-VIS de arranjo de diodo.

As fases móveis utilizadas foram denominadas como “A” e “B”, sendo a fase “A” acetonitrila com metanol (relação 4:1 v/v) e a fase “B” hexano com isopropanol (relação 8:5 v/v). A eluição foi realizada em gradiente, conforme mostrado na Tabela 3, que também apresenta os demais parâmetros de análise.

Os óleos vegetais e os produtos das reações foram preparados para análise através de diluição em fase móvel “B” com relação 1:20 (v/v). O mesmo procedimento foi realizado para os óleos vegetais de partida.

O processamento dos dados gerados nas análises dos produtos foi realizado pelo software LabSolutions. Para obter o percentual relativo de conversão de TAG em MAG+DAG e AGL foram utilizados os valores de área percentagem relativa de área de um pico com relação ao total de área de todos os picos.

3.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS)

As amostras de óleos vegetais foram preparadas para análise de cromatografia gasosa por derivatização com BF_3 /metanol.

As análises por GC/MS foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo QP 2010 Plus, equipado com coluna ZB5 MS (30m x 0,25 mm x 0,25 μm) e detector de espectrometria de massas. O modo de injeção utilizado foi do

tipo Split (15:1), o modo de aquisição foi do tipo *SCAN* e o tempo de corrida foi de 50 minutos. A temperatura do injetor foi mantida em 250°C, a fonte de ionização a 290°C e a interface em 280°C. A programação de temperatura do forno iniciou em 80°C e após foi elevada a 280°C com rampa de aquecimento de 5°C/min e mantida por 10 minutos.

3.3 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

As análises foram realizadas em um espectrômetro de infravermelho do tipo FT-IR/FT-NIR (infravermelho médio com transformada de Fourier), marca Perkin Elmer modelo Spectrum 400, equipado com acessório para refletância total atenuada universal (UATR). A leitura foi executada na região do infravermelho médio em faixa espectral de 650 a 4000 cm^{-1} , com 32 varreduras com resolução de 4,0 cm^{-1} , após ser realizada a leitura do branco.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise dos óleos vegetais de partida

A análise realizada por HPLC revelou o perfil de cada óleo, o qual representa os sinais referentes aos triacilgliceróis presentes nos mesmos. Essa informação é bastante relevante, pois indica o ponto de partida das reações. As Figuras 2, 3 e 4 mostram os cromatogramas dos óleos de canola, girassol e tabaco, respectivamente.

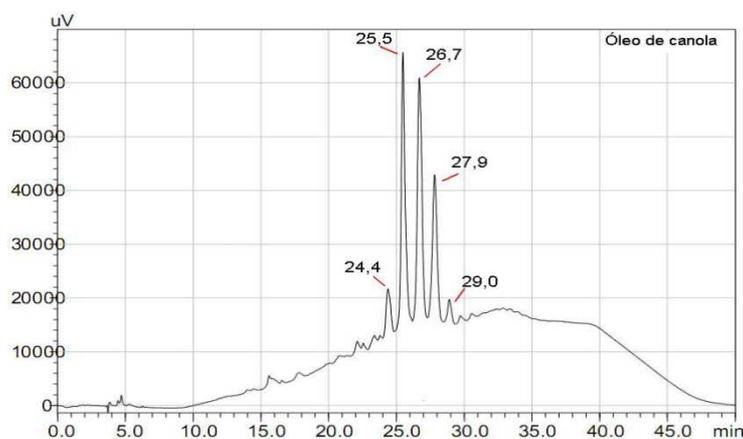


Figura 2 - Cromatograma obtido por HPLC do óleo de canola.

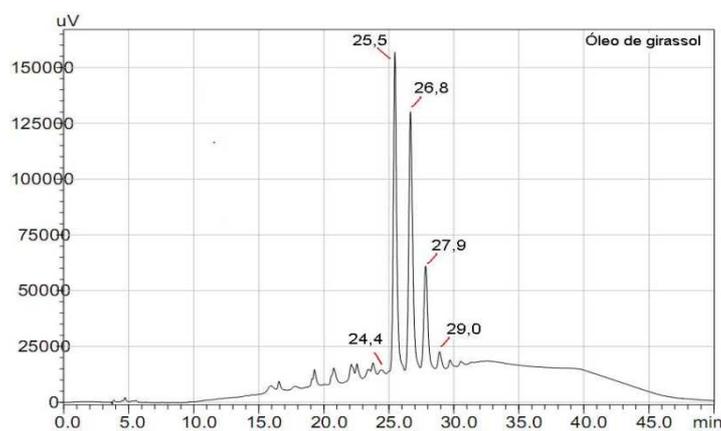


Figura 3 - Cromatograma obtido por HPLC de óleo girassol.

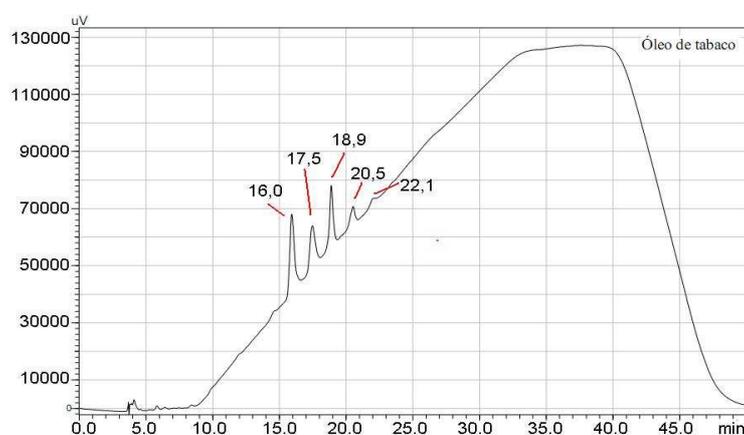


Figura 4 - Cromatograma obtido por HPLC do óleo de tabaco.

A Figura 5 (A, B e C) mostra os cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa-espectrometria de massas para os óleos derivatizados de canola, girassol e tabaco, respectivamente, onde pode ser observada a presença dos ácidos graxos: palmítico (C 16:0), esteárico (C 18:0) e oléico (C 18:1) e linoléico (C 18:2).

A análise por espectroscopia de infravermelho revela as principais ligações constituintes dos triacilgliceróis dos óleos vegetais (Figura 6 - A, B e C). No comprimento de onda de aproximadamente 1740 cm^{-1} verifica-se as deformações axiais da ligação C=O corresponde ao éster, entre 2800 e 3000 cm^{-1} as deformações axiais das ligações C-H (CH_2 e CH_3), em $\sim 1460\text{ cm}^{-1}$ a deformação angular da ligação C-H e em 1150 cm^{-1} a deformação axial da ligação C-O-C éster.

4.2 Glicerólise enzimática

Primeiramente foi realizada a análise qualitativa dos cromatogramas obtidos com base no perfil cromatográfico dos produtos de reação comparados aos dos óleos de partida, conforme Figura 5. Nos cromatogramas obtidos no decorrer das reações se observa a diminuição do tamanho dos picos referentes aos triacilgliceróis e conseqüente aparecimento de picos adjacentes. Como não foram utilizados padrões de glicerídeos para comparação e quantificação dos produtos, utilizou-se de conhecimento de interação dos compostos com a fase móvel e coluna do cromatógrafo para identificar os compostos. Sabe-se que a reação de glicerólise leva a formação de MAG, DAG e AGL e que uma quantidade de TAG não reagida pode também estar presente.

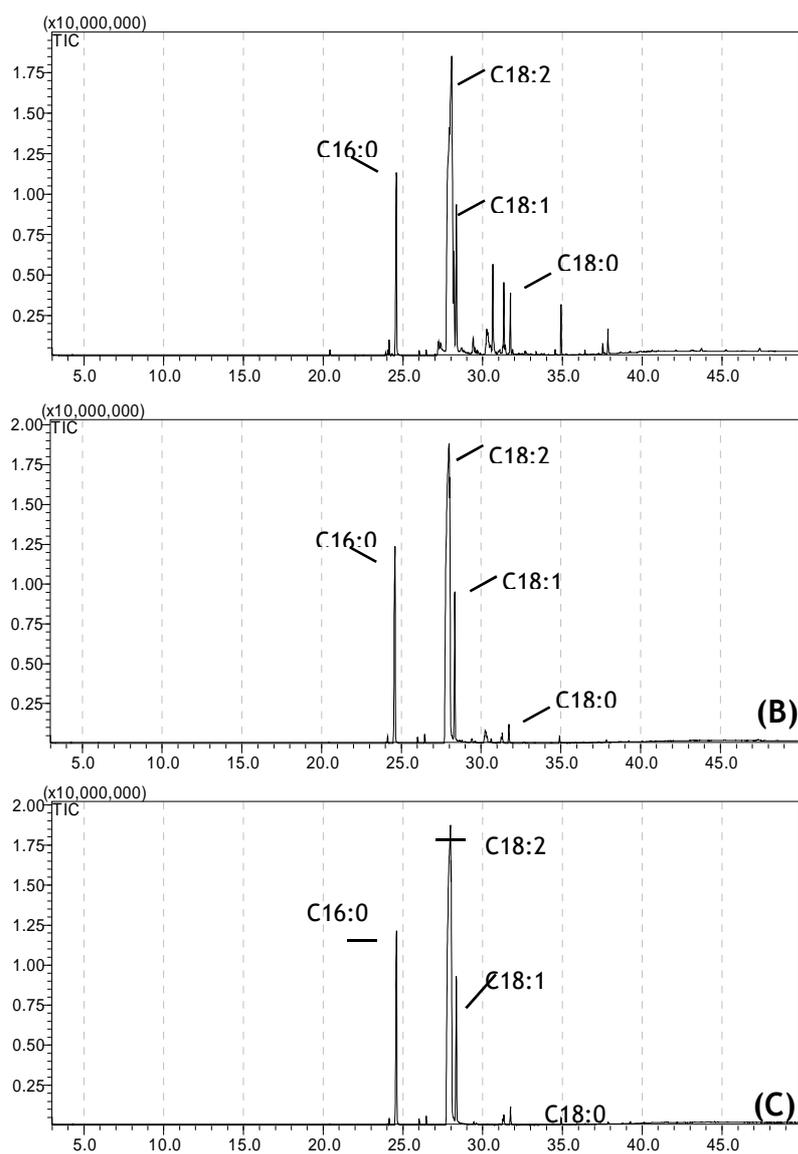


Figura 5 - Cromatogramas íon total obtido por GC/MS dos ésteres metílicos dos óleos de canola, girassol e tabaco.

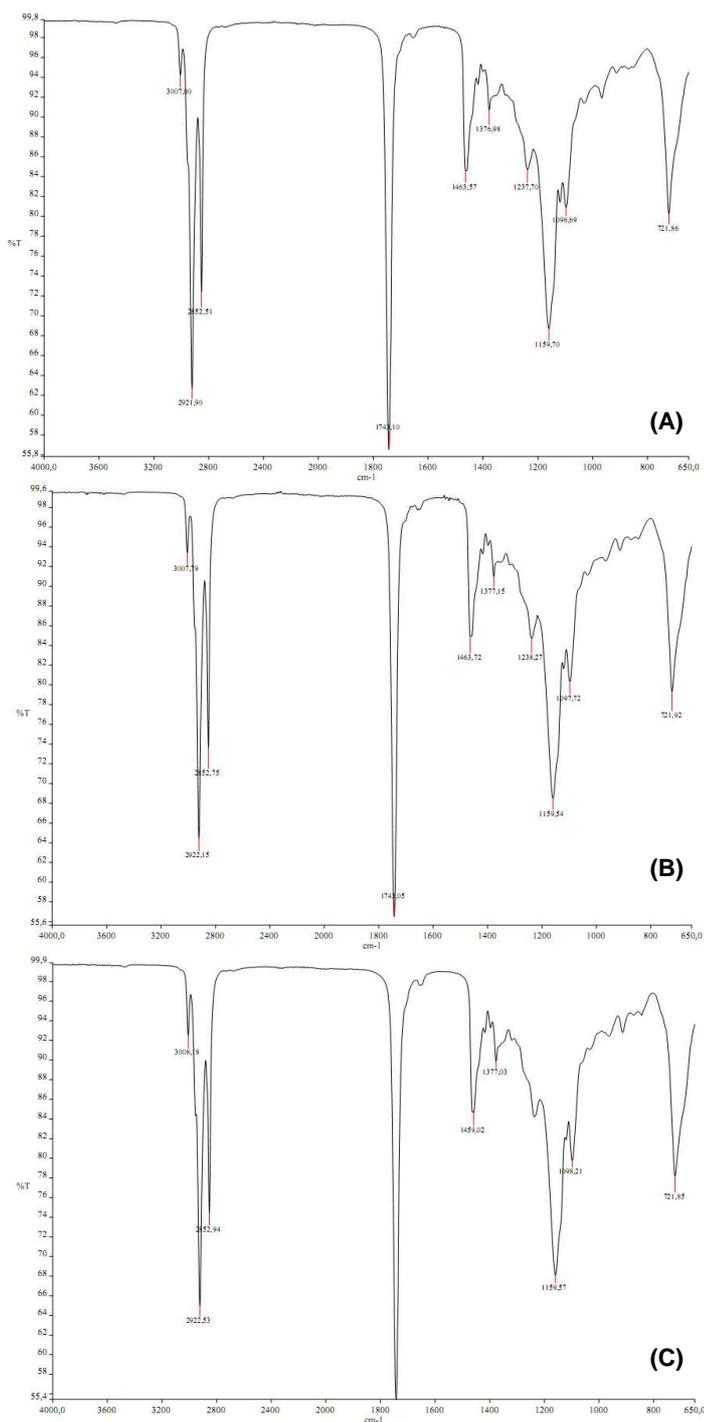


Figura 6 – Espectros de infravermelho obtidos para os óleos de canola (A), girassol (B) e tabaco (C).

Os sinais correspondentes ao óleo (TAG) foram identificados através de comparação com o perfil de cada óleo, uma vez que foram analisados por HPLC os três óleos utilizados nas reações.

Os cromatogramas que representam amostras da glicerólise enzimática estão representados na Figura 7 (A, B e C).

As áreas dos picos foram quantificadas em Área% e o valor de conversão de TAG em MAG e DAG foi calculado relação à quantidade inicial de TAG presente no início da reação.

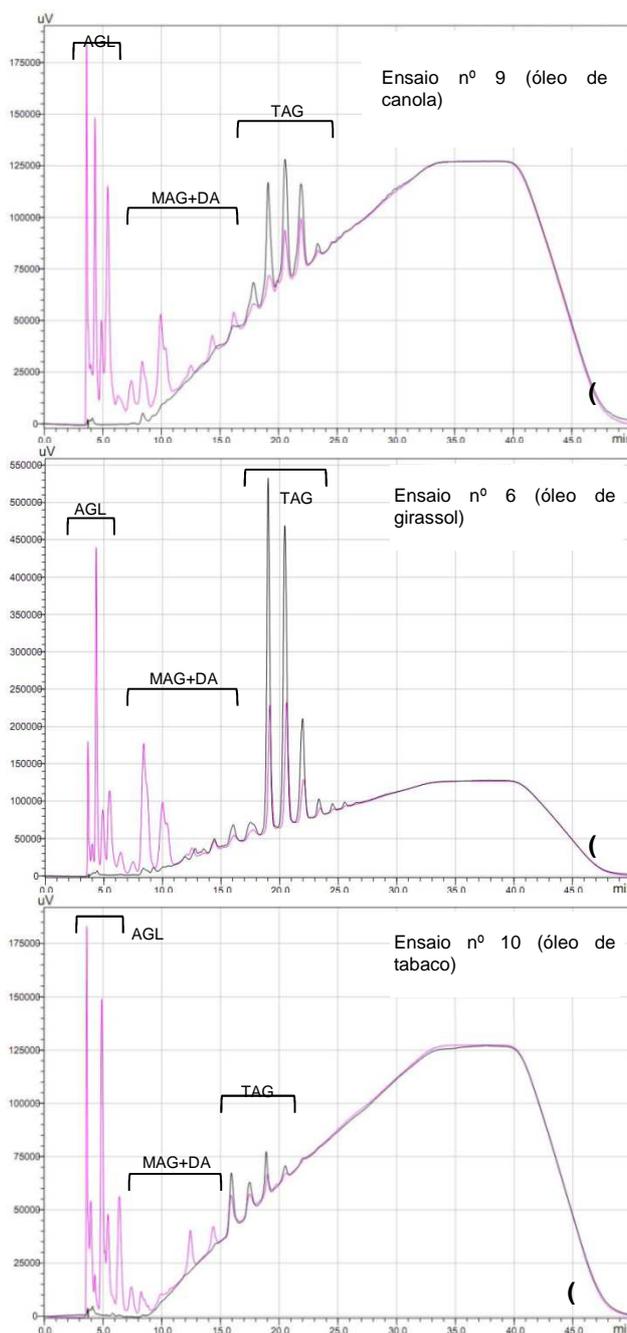


Figura 7 - Cromatogramas obtidos por HPLC dos produtos de glicerólise dos óleos de canola (A), girassol (B) e tabaco (C).

Analisando os resultados de conversão para os óleos de girassol, canola e tabaco, observa-se que houve pouca conversão dos triacilgliceróis em mono e diacilgliceróis, e alto valor de conversão para ácidos graxos livres. Isso pode ser explicado pelo fato de terem sido utilizadas quantidades pequenas dos reagentes no

primeiro estudo, o que dificultou a agitação e homogeneização do meio reacional, condição esta verificada visualmente.

Desse modo, o contato entre as superfícies do glicerol e do óleo fica prejudicado e a lipase após quebrar a ligação éster do triacilglicerol encontra a água como reagente disponível. A presença de água nessas circunstâncias favorece a reação inversa (hidrólise do éster) de reação, formando, portanto, ácidos graxos livres ao invés do produto de interesse. Por outro lado, a conversão parcial do triacil em mono e di, também é desejada, porque são produtos que podem ser utilizados em diferentes proporções para emulsionar.

Conforme os resultados dos gráficos das conversões em percentual de TAG em DAG e MAG para os três óleos estudados, observa-se que as melhores conversões foram nos ensaios com o óleo de girassol e de canola, seguido pelo óleo de tabaco. Nas figuras 8, 9 e 10, a faixa vermelha do gráfico é a que identifica a quantidade de MAG e DAG no produto final da reação.

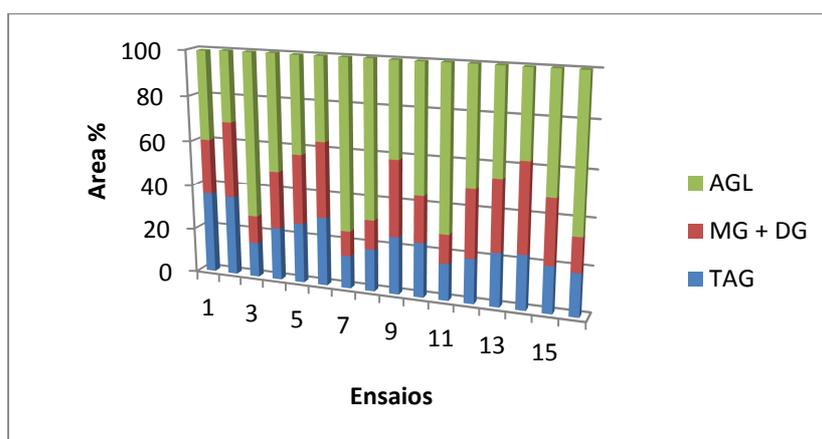


Figura 8 – Conversões dos Triacilgliceróis em Mono, Di e Ácidos graxos livres do óleo de Girassol.

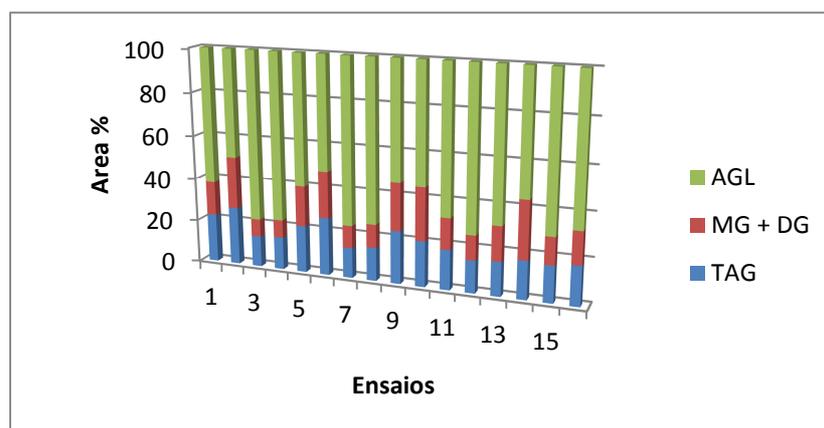


Figura 9 – Conversões dos Triacilgliceróis em Mono, Di e Ácidos graxos livres do óleo de Canola.

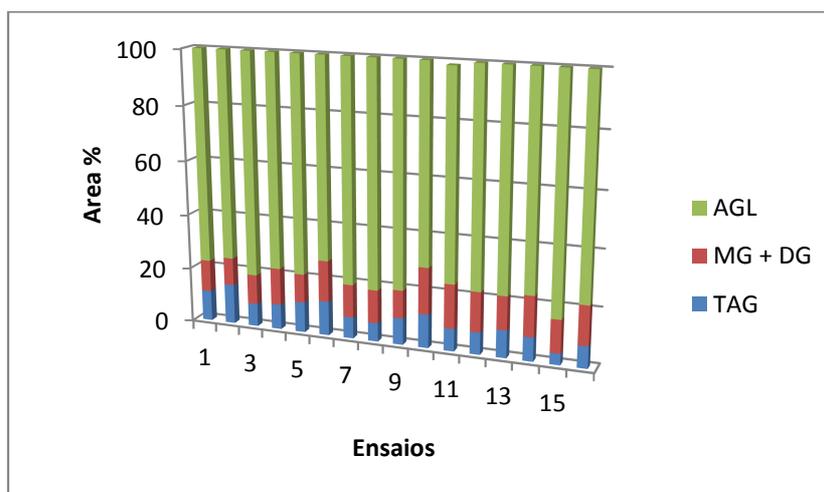


Figura 10 – Conversões dos Triacilgliceróis em Mono, Di e Ácidos graxos livres do óleo de Tabaco.

Percebe-se um comportamento parecido para os óleos de girassol e canola, porém para o óleo de tabaco há muita formação de ácidos graxos livres. Isso ocorre, pois a reação de hidrólise pode ser preferencial, transformando os triacilgliceróis em AGL. Com a conversão de TAG em MAG e DAG do óleo de girassol chegando a 40%, no ensaio 14, observa-se uma condição satisfatória de conversão. Para evitar que a reação de hidrólise esteja tão presente nos ensaios é importante otimizar o sistema de agitação, convertendo melhor os triacilgliceróis.

Diversos autores desenvolveram estudos através de glicerólise enzimática utilizando óleo como substrato em meio livre de solvente, obtendo resultados semelhantes. Fiametti e colaboradores (2011) utilizaram a enzima Novozymes 435 imobilizada para catalisar a reação com óleo de oliva, obtendo assim cerca de 39% de DAG.

No estudo desenvolvido por Fregolente e colaboradores (2009) foi utilizado óleo de soja como fonte de triacilglicerol, que foi catalisado pela lipase *Candida*

antarctica imobilizada, resultando em 24% de MAG e 48% de DAG. Já Freitas e colaboradores (2009) desenvolveram um método utilizando Lipase PS imobilizada e óleo de babassu, obtendo rendimento de 25% de MAG e 63% de DAG.

A enzima Lipozyme foi a lipase utilizada por Gonçalves e colaboradores (2012) na glicerólise do óleo de palma realizada em sistema com ultrassom, o qual resultou em um rendimento de 39,8% de DAG. Liu e colaboradores (2012) obtiveram cerca de 54% de DAG através da reação de glicerólise do óleo de soja catalisada pela enzima Lecitase ultra imobilizada.

5 CONCLUSÃO

Conforme os ensaios e os resultados encontrados, pode-se concluir que a metodologia de glicerólise enzimática de óleos vegetais estudada se mostrou uma alternativa promissora na obtenção de mono e diacilgliceróis sem uso de solvente. Além disso, houve comprovação do potencial de enzimas como catalisadores da reação de glicerólise, neste caso a lipase Novozyme 435, com conversão de triacilgliceróis a mono e diacilgliceróis em 40% para o óleo de girassol e em torno de 30% com o óleo de canola. O óleo de tabaco não se mostrou tão eficaz durante os ensaios, havendo muita conversão de TAG em AGL. Através de análises foi possível verificar que a quantidade de lipase é um fator determinante na ocorrência da reação de glicerólise, porém, quando associado à maior temperatura, pode levar à maior formação de ácidos graxos livres. A homogeneização do meio e o contato óleo/glicerol também é fator determinante para a formação de MAG+DAG.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e bolsas, à SCIT-RS pelo auxílio financeiro, à FAPERGS pela bolsa PROBITI e à Unisc pelo Programa FAP.

REFERÊNCIAS

CASTRO, H. F.; et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, 2004.

FIAMETTI, K. G.; et al. Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, n. 5, 981–987, 2011.

FREGOLENTE, P.; et al. Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis via glicerólise enzimática e destilação molecular. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1539-1543, 2009.

FREITAS, L.; et al. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya sp*). *Process Biochemistry*, v. 44, n. 10, p. 1068-1074, 2009.

FREITAS, L. *Seleção de rota enzimática para produção de monoglicerídeos empregando lipase imobilizada em matriz obtida pela técnica sol-gel*. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2006.

GONÇALVES, K. M. Palm oil hydrolysis catalyzed by lipases under ultrasound irradiation – The use of experimental design as a tool for variables evaluation. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 19, n. 2, p. 232-236, 2012.

LIU, N.; et al. Immobilisation of lecitase® ultra for production of diacylglycerols by glycerolysis of soybean oil. *Food Chemistry*, n. 134, p. 301–307, 2012.

MUNIYAPPA, P. R.; et al. Improved conversion of plant oils and animal fats into biodiesel and co-product. *Bioresource Technology*, n. 56, p. 19-24, 1996.

PHUAH, E.-T.; et al. Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n. 78, p. 91–97, 2012.

VOLL, F.; et al. Kinetic modeling of lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil. *Biochemical Engineering Journal*, n. 56, p. 107– 115, 2011.

WANG, W.; et al. Production of extremely pure diacylglycerol from soybean oil by lipase-catalyzed glycerolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 49, p. 192-196, 2011.

YAHYA, A. R. M.; et al. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 23, p. 438–450, 1998.

ZHAO, Y.; et al. Optimization of *Candida* sp. 99-125 lipase catalyzed esterification for synthesis of monoglyceride and diglyceride in solvent-free system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n. 72, p. 157–162, 2011.

ZHU, Q.; et al. A two-stage enzymatic process for synthesis of extremely pure high oleic glycerol monooleate. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 48, p. 143–147, 2011.