



56

## POTENCIALIDADE DE OBTENÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÓLEO DE FRANGO EM ULTRASSOM UTILIZANDO LIPASE COMERCIAL DE *Rhizomucor miehei*

Camila Bonissoni<sup>1</sup>, Ingrid A. S. Guimarães<sup>1</sup>, Cátia L. Erig<sup>1</sup>, Vivian Feddern<sup>2</sup>, Anildo C. Júnior<sup>2</sup>, Débora de Oliveira<sup>3</sup>, Helen Treichel<sup>4</sup>, Gisanara Dors<sup>5</sup>, Andréia Dalla Rosa<sup>1</sup>, Samantha L. Gonzalez<sup>6</sup>, Giniani C. Dors<sup>5</sup>, Maria M. C. Feltes<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal Catarinense – Câmpus Concórdia, Departamento de Engenharia de Alimentos

<sup>2</sup>EMBRAPA Suínos e Aves –Concórdia

<sup>3</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

<sup>4</sup>Universidade Federal da Fronteira Sul Câmpus Erechim, Departamento de Engenharia Ambiental

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia

<sup>6</sup>Instituto Federal Catarinense – Câmpus Brusque, Departamento de Química

E-mail para contato: cami\_bonissoni@yahoo.com.br / manuela.feltes@brusque.ifc.edu.br

### RESUMO

*Diversas pesquisas têm sido direcionadas para a obtenção de energia alternativa aos combustíveis tradicionais e a produção de biodiesel merece destaque, através da alcoólise de óleos e gorduras. O Estado de Santa Catarina figura entre os principais produtores de frango no Brasil, atividade que gera óleos e gordura com potencialidades para a conversão a biodiesel. A catálise via enzimática permite a aplicação de temperaturas amenas, a preservação da qualidade do óleo e a obtenção de produtos mais puros, reduzindo as operações. O processo enzimático, entretanto, ainda apresenta alguns obstáculos, fator limitante para a obtenção comercial de biodiesel por biotransformação. Estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de tornar as modificações enzimáticas de lipídios mais competitivas. Técnicas como o ultrassom promovem o aumento da transferência de massa em meios contendo substratos parcialmente miscíveis, como no caso das reações de etanólise, implicando no aumento da velocidade das reações. Lipases alternativas têm sido avaliadas quanto à sua atividade de esterificação e potencialidades para catalisar reações de etanólise. Com base nestas considerações, o objetivo do presente trabalho foi obter ésteres etílicos a partir de etanólise de óleo de vísceras de frango utilizando a lipase comercial imobilizada *Rhizomucor miehei* como catalisador da reação em ultrassom. As reações foram monitoradas qualitativamente por cromatografia em camada delgada (TLC) e os resultados mostram a potencialidade de obtenção enzimática de ésteres etílicos em ultrassom, nas condições avaliadas.*



## 1. INTRODUÇÃO

As desvantagens econômicas e ambientais apresentadas pelo uso de combustíveis fósseis têm estimulado o desenvolvimento de combustíveis alternativos, entre os quais se destaca o biodiesel (Akoh et al., 2007; Reaney et al., 2005), que é renovável e biodegradável, podendo substituir parcial ou totalmente o diesel de petróleo (ANP, 2005). Este biocombustível é obtido a partir da reação química de óleos ou gorduras com um álcool primário, na presença de um catalisador (reação de alcoólise, genericamente conhecida como transesterificação) (Reaney et al., 2005).

Na agroindústria, geralmente em frigoríficos de aves, os subprodutos gerados são convertidos em farinhas que servirão como insumos nas formulações de rações. O excesso de gorduras, principalmente das vísceras, é extraído, e parte é incorporada às rações. O excedente é comercializado em fábricas de sabão, pneus, entre outros (Gomes, 2005).

O aproveitamento de matérias-primas locais para uso energético é importante do ponto de vista socioeconômico, pois contribui para a redução de impactos ambientais, evitando o destino impróprio dos resíduos (Barros et al., 2015).

A transesterificação utilizando a catálise alcalina é atualmente o método mais empregado para a produção de biodiesel em escala industrial, processo que exige altos investimentos na linha de produção (Van Gerpen et al., 2004). Assim, a alcoólise catalisada por lipases é uma tecnologia promissora e tem sido objeto de muita investigação, pois as condições de trabalho permitem uma economia de energia no processo, bem como a ocorrência de uma degradação térmica mínima dos substratos. Além disso, o processo de purificação dos ésteres metílicos ou etílicos (biodiesel) e do glicerol produzido como coproduto é mais simples, reduzindo o custo do tratamento dos resíduos. Uma desvantagem do processo enzimático ainda é o custo de produção das lipases, que é significativamente maior do que o dos catalisadores químicos (Castro et al., 2004; Feltes, 2011).

Em reações de etanolise de óleos, entretanto, é preponderante a busca por alternativas que contornem a imiscibilidade dos substratos (óleo e álcool) no meio reacional. As reações assistidas por ultrassom apresentam potencialidades para contornar este desafio, já que esta técnica permite o aumento da transferência de massa no sistema (Battistella et al., 2012; Popiolski, 2011).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade de obtenção de ésteres etílicos (biodiesel) a partir da etanolise de óleo de vísceras de frango utilizando a lipase comercial imobilizada Lipozyme® RM IM (Novozymes) como catalisador da reação, em sistema de ultrassom, sem agitação.

## 2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Utilizou-se como matéria-prima o óleo de vísceras de frango fornecido pelo Grupo Farol de Concórdia-SC. Este óleo (sem tratamento adicional), previamente caracterizado segundo metodologia oficial da American Oil Chemists' Society (AOCS, 2003), apresentava as seguintes características (média  $\pm$  desvio padrão): índice de acidez (em % de ácido oleico) de  $2,5\% \pm 0,2$ ; índice de peróxido (meq  $O_2 \cdot kg^{-1}$  de óleo) de  $0,1 \pm 0,0$ ; índice de saponificação (mg KOH  $g^{-1}$  de óleo) de  $196,6 \pm 2,4$ ; densidade relativa (25°C) de  $0,9 \pm 0,00 \text{ kgL}^{-1}$  (Erig et al., 2013). A composição deste óleo foi determinada por cromatografia em fase gasosa (CG) na EMBRAPA Suínos e Aves, segundo metodologia descrita na literatura (Cunha et al., 2013). A enzima comercial Lipozyme® RM IM,



## XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA

01 a 04 de setembro de 2015  
Fortaleza, Ceará, Brasil

obtida de *Rhizomucor miehei*, disponível na forma imobilizada (Novozymes, Brasil), foi utilizada como catalisador nas reações de etanolise. A atividade desta lipase, previamente determinada, foi de  $3.080,46 \text{ Ug}^{-1}$ . A mesma foi quantificada através do consumo de ácido oleico em reação de esterificação com propanol, utilizando-se a enzima na proporção de 3% (m/m) (Erig et al., 2014).

As reações de etanolise via enzimática foram conduzidas em uma lavadora ultrassônica (frequência de 40 kHz e potência máxima de 132 kW), com controle da temperatura de reação e sem agitação. O reator consistiu de um balão de fundo redondo (capacidade 50 mL) acoplado a um condensador. As amostras do meio foram retiradas ao longo do tempo de reação (tempo zero, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 min). As condições de análise, definidas com base na literatura, foram avaliadas segundo um planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  com triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios. Levaram-se em consideração as principais variáveis que possivelmente influenciam na obtenção de ésteres etílicos: temperatura (50, 55 e 60 °C), proporção molar óleo de e etanol (1:3; 1:6 e 1:9), volume de hexano (0 mL, 20 mL, 40 mL), concentração de enzima (5, 10, 15%, em massa, com relação ao total de substratos) (Batistella et al., 2012; Popiolski, 2011).

As reações foram acompanhadas qualitativamente por cromatografia de camada delgada (TLC), mediante a separação das frações lipídicas presentes nas amostras ao final do tempo de reação. Utilizou-se hexano/éter/ácido acético (80:20:1,v/v/v) como sistema de solvente para a eluição das amostras. A revelação das manchas foi feita com vapor de iodo e alternativamente em câmara de luz ultravioleta a 254 nm (Christie, 1982). O fator de retenção ( $R_f$ ) das manchas de interesse foi calculado dividindo-se a distância (em cm) percorrida pela mancha pela distância percorrida pela frente do solvente.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ácidos graxos majoritários encontrados no óleo de frango foram os seguintes (média  $\pm$  desvio padrão de três repetições): palmítico, C16:0 (24,2%  $\pm$  0,1); palmitoleico, C16:1 (6,3%  $\pm$  0,0); esteárico, C18:0 (6,3%  $\pm$  0,1); oleico, C18:1n9c (38,4%  $\pm$  0,1), e linoleico, C18:2n6c (18,1%  $\pm$  0,1). Com base nesta composição em ácidos graxos, a massa molar calculada para o óleo foi de  $856,2 \text{ g mol}^{-1}$ .

Nesta etapa do trabalho, decidiu-se analisar qualitativamente as amostras por TLC. Esta é uma técnica analítica alternativa, simples, rápida e de baixo custo para acompanhar o progresso das reações de modificação de lipídios, permitindo o monitoramento da presença de ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis, e ésteres alquílicos (Christie, 1982). Esta metodologia tem sido aplicada na literatura para a avaliação do progresso da reação de etanolise de óleo de peixe, visando à formação de 2-monoacilgliceróis (Pfeffer et al., 2007), e no monitoramento de reações de glicerólise para a produção de mono- e diacilgliceróis (Felttes et al., 2012; Monte Blanco, 2013; Santos et al., 2013).

Na análise por TLC das amostras de todos ensaios realizados no planejamento experimental, foi possível obter ésteres na etanolise enzimática do óleo de vísceras de frango mediada por ultrassom, sem agitação, nas condições avaliadas. Com os resultados obtidos (Tabela 1), observa-se que a conversão de triacilgliceróis a ésteres foi incompleta após 240 min de reação.

A Figura 1 apresenta, a título ilustrativo, o resultado qualitativo obtido por TLC para as amostras de algumas reações de etanolise do óleo de frango. Verifica-se a presença de diferentes frações lipídicas nas amostras, a saber (na ordem de eluição para a fase eluente utilizada): monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres, triacilgliceróis e ésteres etílicos (Christie, 1982).

Tabela 1. Planejamento experimental e fator de retenção (Rf) das frações de interesse.

Trat.	T (°C)	Proporção Molar Óleo:etanol (g/g)	[E] (%)	Hexano (mL)	Óleo (g)	Etanol (g)	Enzima (g)	Hexano (mL)	Rf EE	Rf TAG
1)	-1 (50)	-1 (1:3)	-1 (5)	-1 (0)	5,0244	0,8294	0,2929	58,04	0,87	0,54
2)	+1 (60)	-1 (1:3)	-1 (5)	+1 (40)	1,0048	0,1685	0,0605	0,004	0,78	0,29
3)	-1 (50)	+1(1:9)	-1 (5)	+1 (40)	1,0046	0,4910	0,0795	0,008	0,9	0,81
4)	+1 (60)	+1 (1:9)	-1 (5)	-1 (0)	5,0159	2,4273	0,0373	74,14	0,9	0,49
5)	-1 (50)	-1 (1:3)	+1 (15)	+1 (40)	1,0156	0,1761	0,1796	0,004	0,60	0,24
6)	+1 (60)	-1 (1:3)	+1 (15)	-1 (0)	5,0011	0,8100	0,8712	58,04	0,83	0,65
7)	-1 (50)	+1 (1:9)	+1 (15)	-1 (0)	5,0195	2,4401	1,1203	74,14	0,95	0,70
8)	+1 (60)	+1 (1:9)	+1 (15)	+1 (40)	1,0099	0,4913	0,2273	0,008	0,95	0,78
9)	0 (55)	0 (1:6)	0 (10)	0 (20)	1,0074	0,3290	0,1352	0,02	0,98	0,93
10)	0 (55)	0 (1:6)	0 (10)	0 (20)	1,0097	0,3277	0,1382	0,02	0,97	0,83
11)	0 (55)	0 (1:6)	0 (10)	0 (20)	1,0041	0,3287	0,1358	0,02	0,91	0,75

EE: ésteres etílicos. TAG: triacilgliceróis.

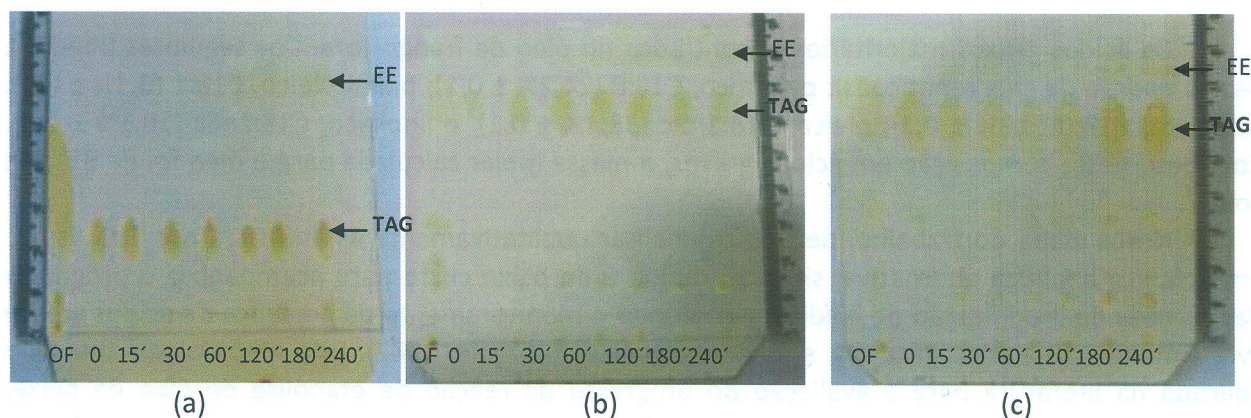


Figura 1. Placa de cromatografia de camada delgada das amostras do meio ao longo da reação de glicerólise do óleo de frango nas seguintes condições: a) 60 °C, proporção molar óleo:etanol de 1:3, 5% de enzima, 40 mL de hexano; b) 60 °C, proporção molar óleo:etanol de 1:9, 15% de enzima, 40 mL de hexano; c) 55 °C, proporção molar óleo: etanol de 1:6, 10% de enzima, 20 mL de hexano.

EE: ésteres etílicos. TAG: triacilgliceróis.



## XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA

01 a 04 de setembro de 2015  
Fortaleza, Ceará, Brasil

Na placa apresentada na Figura 1a, por exemplo, observa-se a presença de ésteres ( $R_f = 0,78$ ) ao longo da reação, confirmando a formação deste produto, embora ainda haja triacilgliceróis ( $R_f = 0,29$ ) que não reagiram. O mesmo comportamento foi observado nas demais reações conduzidas no presente trabalho. Nas placas das Figuras 1b e 1c, o fator de retenção dos triacilgliceróis não reagidos foi 0,78 e 0,75, respectivamente, enquanto o fator de retenção dos ésteres etílicos formados foi 0,95 e 0,91, respectivamente.

Estão sendo feitas análises quantitativas dos produtos das reações de etanolise do óleo de vísceras de frango catalisadas pela lipase Lipozyme® RM IM, de forma a complementar os resultados e verificar os efeitos das variáveis sobre a obtenção de ésteres, identificando, dentre os fatores estudados, aqueles que influenciam significativamente nesta resposta.

Este trabalho indicou a possibilidade de preparar ésteres etílicos a partir de óleo de vísceras de frango, em reação mediada por ultrassom, sem agitação, e catalisada pela lipase comercial imobilizada Lipozyme® RM IM. A matéria-prima utilizada é promissora para a produção de biodiesel no Brasil, devido principalmente à sua grande disponibilidade a um baixo custo. Além disso, vale destacar que este óleo é obtido como subproduto em frigoríficos de abate de frangos, atividade econômica de destaque nos Estados do Paraná e de Santa Catarina.

## 6. REFERÊNCIAS

- Akoh, C.C., Chang, S.W., Lee, G.C., Shaw, J.F., 2007. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. *J. Agr. Food Chem.* 55, 8995-9005.
- ANP. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Lei 11.097. 13 de Janeiro de 2005.
- AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 2003. Champaign: AOCS Press.
- Barros, T. D., Jardine, J.G., 2015. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Agroenergia: Gordura Animal. Disponível em: [www.agencia.cnptia.embrapa.br](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br). Acesso em: 14.fev. 2015.
- Batistella, L., Lerin, L.A., Brugnerotto, P., Danielli, A.J., Trentin, C.M., Popiolski, A., Treichel, H., Oliveira, J.V., Oliveira, D., 2012. Ultrasound-assisted Lipase-catalyzed Transesterification of Soybean Oil in Organic Solvent System. *Ultrason. Sonochem.* 19, 452-458.
- Castro, H. F., Mendes, A.A., Santos, J.C., Aguiar, C.L., 2004. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. *Quím. Nova.* 1, 146-156.
- Christie, W. W., 1982. *Lipid Analysis*. Oxford: Pergamon Press. 2.
- Cunha Jr., A., Feddern, V., de Prá, M.C., Higarashi, M.M., de Abreu, P.G., Coldebella, A., 2013. Synthesis and Characterization of Ethylic Biodiesel from Animal Fat Wastes. *Fuel* 105, 228-234.



XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS  
XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA

01 a 04 de setembro de 2015  
Fortaleza, Ceará, Brasil

- Erig, C. L., Bonissoni, C., Guzzo, M.E., Dalla Rosa, A., Dors, G.C., Feltes, M.M.C., 2014. Comparação da Atividade de Esterificação de Diferentes Lipases Comerciais Imobilizadas. VII Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar. Araquari: IFC. Disponível em: <<http://ocs.arauari.ifc.edu.br/index.php/micti/micti2014/paper/download/232/74>>. Acesso em: 15 fev. 2015.
- Erig, C. L., Bonissoni, C., Gonçalves, L., Dalla Rosa, A., Dors, G. C., Feltes, M.M.C., 2013. Caracterização de Óleo de Vísceras de Frango para ser Utilizado como Substrato em Reações de Etanolise. SBOG 20 Anos. Florianópolis: SBOG.
- Feltes, M.M.C., 2011. Produção de Monoacilgliceróis e Diacilgliceróis Ricos em Ácidos Graxos Ômega-3 a partir da Glicerólise Enzimática de Óleo de Peixe. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). UFSC: Florianópolis.
- Feltes, M. M. C., Villeneuve, P., Baréa, B., Oliveira, D., Ninow, J. L., 2012. Evaluation of the Use of Surfactants as Additives in Enzymatic Glycerolysis Reactions. Eur. J. Lipid Sci. Techn. 114, 1352-1357.
- Gomes, L. F. S., 2005. Potencial de Produção de Biodiesel a partir do Óleo de Frango nas Cooperativas do Oeste do Paraná. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). UNIOESTE: Cascavel.
- Monte Blanco, S.F.M., 2013. Produção de Diacilgliceróis através da Glicerólise Enzimática de Óleo de Peixe. Tese (Doutorado em Engenharia Química). UFSC: Florianópolis.
- Pfeffer, J., Freund, A., Bel-Rhliid, R., Hansen, C.E., Reuss, M., Schmid, R. D., Maurer, S. C., 2007. Highly Efficient Enzymatic Synthesis of 2-Monoacylglycerides and Structured Lipids and their Production on a Technical Scale. Lipids 42, 947-953.
- Popiolski, A. S., 2011. Otimização do Processo de Produção Enzimática de Biodiesel em Sistema Livre de Solvente em Banho de Ultrassom. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Erechim: URI.
- Reaney, M. J.T., Hertz, P.B., McCalley, W.W., 2005. Vegetable Oil as Biodiesel. In: Bailey's industrial oil and fat products. Shahidi, F. (Ed.). New York: John Wiley & Sons. 223-257.
- Santos, J. S., Dors, G., Oliveira, D., Blanco, S. F. M. M., Oliveira, J. V., Furigo Jr, A., Ninow, J. L., Feltes, M. M. C., 2013. Glicerólise de Óleo de Peixe catalisada por Lipase Comercial de *Rhizomucor miehei* em Meio com Surfactante de Grau Alimentício. Quím. Nova 36, 46-51.
- Van Gerpen, J., Shanks, B., Pruszko, R., Clements, D., Knothe, G., 2004. Biodiesel Production Technology. Colorado: National Renewable Energy Laboratory.