

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS AMAZÔNICOS

Gabriela da Costa RALPH¹
Roberto FIGLIUOLO²
Sergio Massayoshi NUNOMURA³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Pesquisador COTI/INPA; ³Orientador COTI/INPA

INTRODUÇÃO

Na atualidade, encontra-se em estudo a utilização do biodiesel na matriz energética da região amazônica, principalmente em comunidades isoladas que não são atendidas pelo fornecimento de energia elétrica do sistema nacional. Neste contexto, leva-se em consideração a sustentabilidade social, ambiental, econômica e o grande potencial que o emprego do biodiesel tem para a região. Uma das ferramentas facilitadoras para o desenvolvimento da produção de biodiesel na região é a atividade extrativista para produção de óleos vegetais que é a principal fonte de biodiesel no país, além disso, as espécies oleaginosas amazônicas possuem considerável potencial produtivo (Correia 2005).

Existem diferentes rotas alternativas para se produzir biodiesel, dentre elas encontra-se o processo de hidrólise seguida da esterificação. A etapa de hidrólise, em especial enzimática, apresenta um diferencial vantajoso quando comparada com a hidrólise química, uma vez que a hidrólise química necessita de catalisadores químicos, temperaturas elevadas, tempos de reação variáveis e altas pressões obtendo-se produtos variáveis quanto a sua natureza e pureza. Em contrapartida, a hidrólise enzimática utiliza baixas temperaturas, lipases como catalisador, meios reacionais específicos e suas variáveis controladas, como produto obtém-se ácidos graxos com pouca modificação (Padilha *et al.* 2007). Neste trabalho, o objetivo foi de estudar os óleos das espécies amazônicas *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng. (uricuri), *Astrocaryum aculeatum* G. F. W. Meyer (tucumã) e *Carapa guianensis* Aublet. (andiroba), preferencialmente com elevados índices de acidez, na produção de biodiesel empregando métodos alternativos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coluna Cromatográfica Filtrante

Realizou-se a cromatografia filtrante em coluna com altura de 9,5 cm e diâmetro interno de 15,3 cm. Utilizou-se 903,51 gramas de sílica gel fase normal da marca Davisil do tipo LC60A 70-200 micras. Após o completo empacotamento da coluna aplicou-se 2,5 L de óleo de andiroba e como eluente utilizou-se 4 L de hexano e coletou-se o filtrado. Após 24 horas aplicou-se mais 4 L de hexano na coluna, coletou-se novamente. Em seguida, concentrou-se todo material filtrado em rota-evaporador a temperatura de 50 °C. Por fim, armazenou-se o óleo filtrado em garrafa de vidro âmbar e a sílica foi guardada para posterior tratamento e recuperação.

Determinação do Índice de Acidez

Pesaram-se cerca de 2,0 g de cada amostra de óleo (andiroba, uricuri e tucumã). Em seguida, adicionaram-se 25 mL de solução neutra de hexano e etanol (2:1), agitou-se e, depois, acrescentaram-se mais 2 gotas de indicador fenolftaleína. Logo depois, titulou-se com solução padrão de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N. Fez-se este procedimento em triplicata para cada óleo e retirou-se a média dos volumes obtidos na titulação. Por fim, calcularam-se os índices de acidez de cada óleo (Moretto e Fett 1989).

Determinação do Índice de Peróxidos

Pesaram-se, aproximadamente, 5 g de cada óleo (andiroba, uricuri e tucumã), adicionaram-se 30 mL da solução de ácido acético e clorofórmio (3:2), e agitou-se até a dissolução da amostra. Depois, adicionou-se 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio e aguardou-se por um minuto com agitação ocasional. Logo após, adicionaram-se 30 mL de água destilada e titulou-se com solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,1 N. Quando se atingiu a coloração levemente amarelada, parou-se a titulação e adicionou-se 0,5 mL de solução aquosa de amido 1%. Continuou-se a titulação até o desaparecimento da coloração escura. Fez-se este procedimento em duplicata para cada óleo e um ensaio em branco, retirou-se a média dos resultados. Por fim, calculou-se o índice de peróxidos (Moretto e Fett 1989).

Determinação do Índice de Iodo

Determinou-se o índice de iodo através do método de Wijs. Primeiro, pesou-se 0,25 g de cada amostra de óleo (andiroba, tucumã e uricuri), depois se adicionou 10 mL de tetracloreto de carbono e 25 mL de solução comercial de Wijs. Após leve agitação, deixou-se em repouso ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este

período, adicionou-se 10 mL de iodeto de potássio 15% e 100 mL de água destilada previamente fervida e resfriada. Titulou-se então com uma solução padrão de tiossulfato de sódio 0,1 N até a coloração amarelo clara. Adicionou-se 1 mL de amido 0,5% e titulou-se novamente com tiossulfato de sódio 0,1 N até o desaparecimento da coloração escura. Este procedimento foi realizado em duplicata para cada óleo e também um ensaio em branco, calculou-se a média dos resultados e por fim o índice de iodo de para cada óleo (Moretto e Fett 1989).

Determinação da Percentagem de Ácidos Graxos Livres

Inicialmente, pesaram-se 2 gramas de cada amostra de óleo. Em seguida, adicionou-se 50 mL de etanol a 95% e 0,5 mL de fenolftaleína. Aqueceu-se a mistura até o aparecimento dos primeiros sinais de ebulição. Ainda quente, titulou-se com solução padrão de hidróxido de sódio 0,1 N até a coloração rosa persistente por quinze segundos. Repetiu-se o procedimento em duplicata para cada óleo e calculou-se a porcentagem de ácidos graxos livres (Moretto e Fett 1989).

Determinação da Densidade

Para determinar a densidade dos óleos de andiroba, tucumã e urucuri pesaram-se dois balões volumétricos de 5 mL para cada óleo. Depois, encheram-se cada um dos balões com óleo até o menisco e pesou-se novamente. Por fim, por cálculo da diferença entre a massa do balão vazio e a massa do balão cheio determinou-se a massa de 5 mL de óleo e assim calculou-se a densidade.

Determinação do Índice de Material Insaponificável

Pesou-se cerca de 2,5 g de cada amostra de óleo, em seguida, adicionou-se 25 mL de hidróxido de potássio etanólico 0,5 N colocou-se em condensador de refluxo mantendo em ebulição por uma hora sob agitação constante. Após este período, transferiu-se o conteúdo para um funil de separação onde, adicionou-se 50 mL de água destilada e agitou-se. Logo após, adicionou-se 50 mL de éter etílico e agitou-se novamente. Após a separação das fases, removeu-se a fase aquosa e a fase etérea foi mantida em um erlenmeyer. Posteriormente retornou-se a fase aquosa para o funil de separação e repetiu-se a extração com éter por duas vezes. Por fim, descartou-se a fase aquosa e as fases etéreas foram transferidas para outro funil de separação. Lavou-se a fase etérea duas vezes com 20 mL de água destilada, e a fase aquosa foram descartadas. Logo em seguida, lavou-se a fase etérea com 20 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio 0,5 N. A fase etérea foi lavada com água destilada para remoção de resíduo alcalino, até que não indicasse mais alcalinidade na fase etérea. A fase etérea foi transferida para um frasco que foi mantido em banho de areia até adquirir massa constante. Com base na massa inicial das amostras e na massa final dos resíduos secos, calcularam-se os teores de insaponificáveis de cada óleo (Moretto e Fett 1989).

Determinação da Cadeia Graxa

A determinação da cadeia graxa do óleo de andiroba foi obtida através da técnica de cromatografia gasosa de alta resolução com detector de ionização de chama (CG - FID). A princípio, prepararam-se as amostras, isto é, foi feita a derivatização em ésteres metílicos. As amostras derivatizadas foram analisadas em CG-FID.

Síntese de Biodiesel pelo Processo de Transesterificação/Esterificação

Realizou-se a síntese de biodiesel pelo processo de transesterificação/esterificação para comparação posterior de resultados. Fez-se a reação com as seguintes condições reacionais: partiu-se inicialmente de 30 gramas de cada óleo (andiroba, urucuri e tucumã), com relação molar óleo/etanol de 1:12, o tempo reacional foi de 24 horas a temperatura de, aproximadamente, 70 °C e agitação constante, o catalisador utilizado foi o ácido clorídrico (HCl) com concentração 1 molar, configurando assim uma reação de catálise ácida homogênea.

Análise de Conversão por Cromatografia em Camada Delgada – Fase Normal

Utilizou-se uma placa cromatográfica de sílica gel 60 em alumínio da Merck (F254) com indicador de fluorescência. As amostras foram aplicadas com capilares de volume calibrado (2µL). A eluição foi feita com o sistema hexano: éter etílico: ácido acético (80: 16: 4), em uma cuba cromatográfica. Após a eluição, revelou-se a placa com uma solução etanólica de 20% de ácido fosfomolibdico, que foi aquecida a 150° C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação dos Índices Físico-Químicos

Os índices físico-químicos foram determinados com o objetivo de mostrar o grau de conservação em que os óleos se encontram. Portanto, obtiveram-se os resultados conforme expostos na tabela 1.

Os índices de acidez e de peróxidos indicam o estado de conservação do óleo (Moretto e Fett 1998 apud Ferreira *et al.* 2001), portanto vemos que o óleo de andiroba já se encontra em estágio de degradação bem elevado pois apresenta

altíssimo índice de acidez. Deve-se levar em consideração que este estado de conservação está diretamente ligado ao método de armazenamento das sementes, ao período em que essas sementes passaram expostas ao ar e a umidade e também a forma de extração do óleo (Silveira *et al.* 2003).

Tabela 1. Resultados Obtidos nas Determinações dos Índices Físico-químicos.

| Índices Físico-Químicos | | | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|---------|---------|-------|---------|
| Óleo | Repetições | 1 | 2 | 3 | Média |
| Andiroba | Índice de Acidez (mg NaOH/ g óleo) | 68,40 | 68,63 | 67,44 | 68,16 |
| | Índice de Peróxidos (meq/ kg óleo) | 0,77504 | 0,77504 | — | 0,775 |
| | Índice de Iodo (mg iodo/100 g óleo) | 15,5027 | 11,7832 | — | 13,64 |
| | Ácidos Graxos Livres (%) | 37,844 | 37,918 | — | 37,88 |
| | Material Insaponificável (%) | 0,167 | — | — | 0,167 |
| | Densidade (g/mL) | 0,86268 | 0,87372 | — | 0,8682 |
| Uricuri | Índice de Acidez (mg NaOH/ g óleo) | 1,93 | 2,05 | 2,43 | 2,14 |
| | Índice de Peróxidos (meq/ kg óleo) | 28,4716 | 27,9833 | — | 28,23 |
| | Índice de Iodo (mg iodo/100 g óleo) | 3,7790 | 3,5088 | — | 3,64 |
| | Ácidos Graxos Livres (%) | 1,024 | 1,109 | — | 1,07 |
| | Material Insaponificável (%) | 0,586 | — | — | 0,586 |
| | Densidade (g/mL) | 0,91774 | 0,91772 | — | 0,91773 |
| Tucumã | Índice de Acidez (mg NaOH/ g óleo) | 11,28 | 10,91 | 11,08 | 11,09 |
| | Índice de Peróxidos (meq/ kg óleo) | 11,3186 | 11,3411 | — | 11,33 |
| | Índice de Iodo (mg iodo/100 g óleo) | 2,9164 | 1,5819 | — | 2,25 |
| | Ácidos Graxos Livres (%) | 5,841 | 5,666 | — | 5,75 |
| | Material Insaponificável (%) | 2,43 | — | — | 2,43 |
| | Densidade (g/mL) | 0,89402 | 0,89028 | — | 0,89215 |

Determinação da Cadeia Graxa

Dos ésteres metílicos de ácidos graxos evidenciados nas análises de CG-FID foram identificados 100% dos contidos no óleo de andiroba, 97,93% dos contidos no óleo de tucumã e 99,05% dos contidos no óleo de uricuri.

No óleo de andiroba pode-se observar que há uma predominância de ésteres de ácidos graxos insaturados, como o ácido oléico (C18:1) apresentando 54,84 % da composição do óleo e o linoléico (C18:2) com 7,76%. Contudo há predominância também de ácido graxo saturado com 28,43% de ácido palmítico (C16:0). O óleo de andiroba analisado possui uma cadeia graxa de cadeia mais longa e insaturada, semelhante à observada para os óleos comestíveis como de soja. Já o óleo de uricuri e tucumã apresentaram composição predominantemente láurica (C12:0) sendo que o óleo de tucumã apresenta 60,04% de ácido láurico e o óleo de uricuri apresenta 46,77% de ácido láurico. Esta é uma característica marcante encontrada nos óleos de sementes de palmeiras. Além disso, observou-se também a predominância de ácido mirístico (C14:0) com 29,93% da composição do óleo de tucumã e 21,83% da composição do óleo de uricuri.

Com base nos ácidos graxos identificados e quantificados em cada óleo calcularam-se as respectivas massas moleculares levando em consideração que esses ácidos graxos são predominantes nos óleos fazendo com que cerca de 99 % da massa do óleo seja devido a estes ácidos graxos determinados (Moretto e Fett 1989). Portanto determinou-se a massa molecular de cada ácido graxo ponderando a sua ocorrência resultando na massa molecular do óleo de andiroba igual a 824,342 g/mol, do óleo de uricuri igual a 681,399 g/mol e do óleo de tucumã igual a 624,125 g/mol.

Tabela 2. Determinação da Cadeia Graxa.

| Óleo | Numeração | Ácidos Graxos | Área percentual média (%) |
|----------|----------------|---------------|---------------------------|
| ANDIROBA | C12:0 | Laúrico | 0,126 |
| | C14:0 | Mirístico | 0,154 |
| | C16:0 | Palmítico | 28,432 |
| | C16:1 cis 9 | Palmitoléico | 0,475 |
| | C18:0 | Esteárico | 8,071 |
| | C18:1 cis 9 | Oléico | 54,842 |
| | C18:2 cis 9,12 | Linoléico | 7,761 |
| | C20:1 cis 5 | Eicosenóico | 0,139 |
| TUCUMÃ | C10:0 | Caprílico | 1,833 |
| | C12:0 | Laúrico | 60,037 |
| | C14:0 | Mirístico | 29,387 |
| | C16:0 | Palmítico | 3,1555 |
| | C18:1 cis 9 | Oléico | 3,5155 |
| URICURI | C10:0 | Caprílico | 4,1185 |
| | C12:0 | Laúrico | 46,7685 |
| | C14:0 | Mirístico | 21,8265 |
| | C16:0 | Palmítico | 12,0325 |
| | C18:0 | Esteárico | 3,4166 |
| | C18:1 cis 9 | Oléico | 13,1305 |

Sínteses de Biodiesel pelo Processo de Transesterificação/Esterificação

Realizaram-se as três sínteses de biodiesel (uma com óleo de andiroba, outra com óleo de uricuri e outra com óleo de tucumã) de acordo com os parâmetros já citados nos procedimentos e ao final delas realizaram-se as análises de cromatografia em camada delgada - fase normal para verificação da conversão da reação e determinação da densidade como método alternativo de verificar se o biodiesel obtido é de boa qualidade e assim obtiveram-se os resultados conforme se segue.

Análise de Conversão por Cromatografia em Camada Delgada – Fase Normal (CCD-FN)

Nomeou-se a amostra de óleo de andiroba usada como padrão de comparação pela letra A, a de óleo de uricuri pela letra U e a de óleo de tucumã pela letra T. Já para as amostras de biodiesel obtido chamou-se de BA o biodiesel de andiroba, BU o biodiesel de uricuri e BT o biodiesel de tucumã, desta forma o resultado obtido consta a seguir na figura 1.

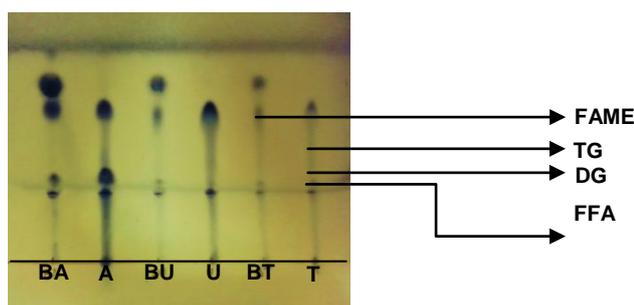


Figura 1. Placa de CCD da Conversão dos Ésteres Metílicos dos Biodiesel de andiroba, uricuri e tucumã.

Identifica-se na placa a presença de todos os constituintes do óleo ainda na sua forma original mesmo depois da reação, isto é, nas amostras BA, BU e BT há a mancha dos éteres metílicos (FAME), porém há também tri, diacilglicerídeos e ácidos graxos (TG, DG e FFA respectivamente) que não foram inteiramente convertidos.

Análise de Conversão por Densidade

Como citado anteriormente, determinou-se ainda a densidade de cada biodiesel obtido nas reações de cada óleo para verificar a conversão em ésteres metílicos. Comparando as densidades do biodiesel de andiroba (0,8708 g/mL) com a

do óleo de andiroba (0,8682 g/mL) sem dificuldades nota-se que a densidade do óleo é menor o que comprova a baixa qualidade do biodiesel, pois o aumento na densidade é indicativo de um grau de pureza menor, pois possivelmente há uma mistura de éster de ácido graxo com tri, di e monoacilglicerídeos não convertidos na reação além de subprodutos de reações laterais. Já comparando a densidade do biodiesel de uricuri (0,87683 g/mL) com a do óleo de uricuri (0,91773 g/mL) observa-se a diminuição da densidade o que mostra um biodiesel de melhor qualidade com aparente grau de pureza maior. E finalmente comparando a densidade do biodiesel de tucumã (0,88107 g/mL) com a densidade do óleo de tucumã (0,89215 g/mL) novamente vê-se que houve uma diminuição na densidade mostrando um biodiesel de qualidade aceitável assim como o biodiesel de uricuri.

CONCLUSÃO

Observa-se que dos três óleos trabalhados, cada um encontrava-se em estado de degradação diferente, sendo que pelos índices físico-químicos determinados, o óleo que aparentemente apresentou estado de degradação mais avançado foi o óleo de andiroba. Pelas análises feitas do biodiesel, o biodiesel de andiroba foi o que mostrou os resultados mais negativos, portanto, conclui-se que o estado de degradação e as características intrínsecas de cada óleo refletem diretamente no desempenho reacional na produção de biodiesel.

REFERÊNCIAS

- Correia, J.C. 2005. Atendimento Energético a Pequenas Comunidades Isoladas: Barreiras e Possibilidades. *T&C Amazônia*, 6: 30-36.
- Ferreira, E.S.; Lucien, V.G.; Silveira, C.S. 2001. Estudo Físico-químico do Óleo Fixo Extraído da Semente de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). Pp. 558-560. In: *Anais do II Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel*. Lavras, Minas Gerais.
- Moretto, E.; Fett, R. 1989. *Óleos e Gorduras Vegetais – processamento e análises*. Ed. da UFSC, 2ª ed. Florianópolis, Santa Catarina, 179 pp.
- Moretto, E. Fett, R. 1998. *Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos*. 1 ed. São Paulo: Livraria Varela, 149 pp.
- Padilha, M.E.S.; Ruiz, W.A. 2007. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 27(2): 285-290.
- Silveira, B.I.; Carioca, C.R.F. 2003. Estudos da Hidrólise de Óleo de Andiroba com Enzimas Imobilizadas. In: *Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentação*. Florianópolis, 7 pp.