ESTUDO DA OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS ORIUNDOS DE ÓLEO RESIDUAL DE FRANGO VIA METODOLOGIA TAGUCHI

Thales Guimarães Rocha [1], Lourembergue Saraiva de Moura Junior [2], Francisco Simão Neto [3], Patrick da Silva Sousa [4], José Cleiton Sousa dos Santos [5]

RESUMO

A crescente demanda por energia, associada à necessidade de se investigar alternativas ecologicamente corretas aos combustíveis fósseis torna a busca por processos industriais com matérias primas baratas e metodologias modernas cada vez mais crescente. A síntese de biodiesel, um éster etílico de origem biodegradável e renovável, pode ser favorecido com a utilização de enzimas como as lipases, proteínas com a finalidade catalítica em óleos e gorduras. O objetivo do presente trabalho foi o estudo da síntese de ésteres etílicos a partir do óleo residual de frango, sendo, para isso, utilizada a metodologia Taguchi com matriz ortogonal padrão L9 para análise das variáveis utilizadas na esterificação realizada e seus respectivos graus de influência na síntese do produto. Como biocatalisador, utilizou-se a lipase Novozyme® RM IM, de Rhizomucor miehei, em um sistema com agitação a 200 rpm e controle de temperatura. Os parâmetros escolhidos para a otimização foram: razão molar (ácido graxo: álcool), tempo de reação (h), temperatura (ºC) e quantidade de biocatalisador por massa de substrato (%). Obteve-se o maior rendimento de conversão em ésteres em 84,42% ± 4,22 e uma relação de sinal-ruído S/R de 38,53. Nesse sentido, concluiu-se por meio da metodologia utilizada que a razão molar (ác:al) e a temperatura da reação (ºC) foram os parâmetros que mais influenciaram as reações de síntese de ésteres, além de se confirmar a possibilidade comercialmente rentável da produção de ésteres etílicos utilizando-se óleo residual de baixo valor agregado.

Palavras-chave:

Lipase. Esterificação. Residual. Taguchi.

[1] UNILAB, IEDS, Discente, e-mail: thales@aluno.unilab.edu.br
[2] UNILAB, IEDS, Discente, e-mail: lourembergue@aluno.unilab.edu.br
[3] UNILAB, IEDS, Discente, e-mail: fcosimao@aluno.unilab.edu.br
[4] UNILAB, IEDS, Discente, e-mail: p.silvasousa7@gmail.com
[5] UNILAB, IEDS, Docente, e-mail: jcs@unilab.edu.br

INTRODUÇÃO

A reação de síntese de ésteres entre um álcool e um ácido carboxílico tem considerável importância industrial na fabricação de lubrificantes, plastificantes, tintas, solventes, sabores e produtos farmacêuticos (GRYGLEWICZ *et al*., 2006). Além disso, metodologias ecológicas para síntese de combustíveis não poluentes, como o biodiesel, tem crescente visibilidade mundial, visto a iminente crise energética embasada no desequilíbrio entre a disponibilidade cada vez menor de petróleo e o gradativo aumento do consumo por energia (DHAWANE; KUMAR; HALDER, 2018).

A pesquisa por fontes alternativas de combustíveis está fortemente ligada a um tema hoje amplamente estudado: a biocatálise. Como exemplo de biocatalisador, as lipases (triacilglicerol acil-hidrolases; EC 3.1.1.3) são classes de enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol a glicerol e ácidos graxos livres (GUPTA *et al*., 2004). Por ser constituído por uma abundante quantidade de lipídios de baixo valor agregado, o óleo de frango residual é uma matéria-prima sustentável e economicamente viável na síntese de ésteres etílicos (AL-ZUHAIR; HASAN; RAMACHANDRAN, 2003).

Para o presente trabalho, a esterificação estudada com a utilização da lipase imobilizada de *Rizomucor miehei* (Novozyme® RM IM) teve como substrato o óleo de frango residual previamente hidrolisado. Para estudo das relações de influência das variáveis reacionais como a razão molar (ácido:álcool), percentual de biocatalisador por massa de substrato (%), temperatura (ºC) e tempo reacional (h), o método de design ortogonal com nove experimentos de Taguchi foi utilizado, de forma a se obter as características qualitativas dos parâmetros reacionais de forma a maximizar a produção de ésteres etílicos de forma simplificada, eficiente e com baixo custo de execução (TAGUCHI, 1986).

METODOLOGIA

2.1 Materiais

A lipase Novozyme® RM IM foi doada pela Novozymes, Espanha. Álcool etílico (P.A 95%) e os demais reagentes utilizados foram obtidos da Vetec (São Paulo, Brasil) e Synth (São Paulo, Brasil). O óleo de residual de frango foi adquirido em um estabelecimento local (Redenção, Brasil) sendo formado por diferentes ácidos graxos, como o ácido mirístico (0,6%), ácido palmítico (24,7%), ácido palmitoléico (7,1%), ácido esteárico (6,0%), ácido oleico (43,4%), ácido linoleico (17,2%) e ácido α-linolenico (1%). Os reagentes utilizados na caracterização da matéria-prima e dos produtos gerados foram todos de grau analítico. Para a elaboração do delineamento experimental do tipo Taguchi, foi utilizado o software Statistica® 10 (Statsoft, EUA).

2.2 Métodos

Para obtenção dos ácidos graxos, a metodologia descrita por Lima *et al.* (2012) foi seguida, sendo ajustado o uso de um sistema de refluxo e aquecimento ao invés de um sistema com ultrassom. Os parâmetros reacionais foram previamente estudados e determinados pelo grupo de pesquisa GENEZ (Grupo de Engenharia Enzimática). As reações ocorreram em frascos de eppendorfs de 2 mL, com controle de tempo e temperatura e agitação mecânica de 200 rpm. A Tabela 1 foi gerada pelo software Statistica®. Para esse trabalho, o método Taguchi com matriz ortogonal de nove experimentos foi utilizado, no qual as quatro variáveis foram distribuídos em três níveis.

Tabela 1: Níveis e variáveis utilizadas no planejamento.

Fonte: elaborado pelos autores.
*valor calculado por massa de substrato.

Assim, para o presente estudo, a matriz ortogonal padrão de L9 foi empregada para examinar os quatro fatores em grupos de três. A letra L e o subíndice 9 representam o quadrado latino e o número de execuções experimentais, respectivamente (Roy, 2001).. No planejamento, os valores das razões S/R (Sinal-Ruído) foram

calculados no software utilizado selecionando-se a função “larger the better”, a fim de se obter observar as estatísticas de desempenho para a melhor conversão em ésteres. Para cada experimento, o valor da razão S/R pode ser calculado por meio da Equação 1, segundo Roy (2001):

(1)

No qual yi é a conversão de ácidos graxos para a amostra correspondente, i é o número de repetições e n é o número de respostas para a combinação de níveis de fator.

A relação S/R prevista nas condições ideais do processo para atingir a conversão máxima foi estimada a partir da Equação (2) (TAGUCHI 1986; CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013):

(2)

No qual é a média de todas as razões de Sinal-Ruído, é a relação S/R ideal para cada parâmetro e é número de parâmetros que influenciam significativamente a esterificação estudada.

A conversão em ésteres foi monitorada pelo índice de acidez, conforme metodologia relatada por Santos (2011). As amostras esterificadas foram tituladas em duplicata, pesando-se, nos erlenmeyers, 0,2 g, com a adição de 5 mL de álcool etílico e 3 gotas de fenolftaleína. Por gotejamento de solução de 0,1 molar de NaOH, foi realizada a titulação dos ésteres produzidos. A Equação 3 para o cálculo do índice de acidez (IA) é dada abaixo (SANTOS, 2011):

(3)

Sendo V o volume de NaOH utilizado para a titulação individual das amostras; F o fator de correção da solução de NaoH, M a molaridade da solução de NaOh em mol/L e m a massa da amostra em gramas. Por fim, os valores de conversão em ésteres (%) foram calculados com a Equação 3, sendo IA e IAi os índices de acidez das amostras com enzima e da amostra inicial (reação sem biocatalisador), respectivamente, calculados em mgKOH/g (Santos, 2011):

(4)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 abaixo apresenta o planejamento experimental com os níveis de 1 a 3 para cada variável reacional, além da conversão percentual em ésteres e a razão S/R para cada reação. Observa-se que a amostra 8 apresentou a maior conversão em ésteres (84,42% ± 4,22) do planejamento, com os níveis máximos (N3) de razão molar entre ácido graxo e álcool (1:8) e para o tempo (24h de reação). A Tabela 3 discrimina a significância de cada variável para o planejamento imposto, apresentando a classificação dos parâmetros com base nos valores de Delta (diferença entre o maior e o menor valor da razão S/R entre os níveis dos parâmetros reacionais) (CHOWDHURY *et al.*, 2014).

Tabela 2: Níveis das variáveis, valores de conversão com erro experimental e as relação sinal-ruído (S/N) obtidas para o planejamento experimental.

Fonte: elaborada pelos autores.

Tabela 3: Classificação dos níveis para cada variável na influência dos maiores resultados de conversão, com o valor Delta apresentado.

Fonte: elaborada pelos autores.

Com os valores de Delta, observa-se que a razão molar (ácido:álcool) representa o nível de maior influência entre todos os parâmetros reacionais, seguido da temperatura (ºC) da reação, o percentual de Novozyme® RM IM e o tempo de reação (h). A Figura 1 mostra os gráficos para cada um dos parâmetros de controle. A maior razão S/R, que corresponde a maior conversão em ésteres sugere o melhor nível para cada um dos parâmetros.

Figura 1: Resultados experimentais da Razão S/R versus os níveis (1, 2 e 3) das variáveis estudadas.



Fonte: elaborada pelos autores.

Com a Figura 1, verifica-se que as condições ótimas de reação para um valor máximo de síntese de ésteres tem como o nível 2 (N2) para a razão molar (1:8) entre ácido e álcool, N3 para o percentual de biocatalisador (15% em relação a massa de substrato), N2 para a temperatura da reação (40ºC) e N3 para o tempo de reação (24h). Com os valores obtidos por meio da Equação 2, para obtenção do valor S/R ótimo, e por meio de redes neurais artificiais do software Statistica®, o valor da máxima conversão em ésteres obtido para cada nível representado na Figura 1 foi de 87,79%.

Como variável de maior influência das reações estudadas a partir do modelo Taguchi robusto L9, a razão molar (ácidos graxos: álcool), é um parâmetro importante no estudo do rendimento da síntese de ésteres, síntese essa que se trata de uma reação reversível (sentido direto e inverso para síntese de ésteres e da hidrólise do éster, respectivamente). Estudos na literatura sugerem o uso de uma maior concentração de álcool nas reações de esterificação (SÁ *et al*., 2017), de modo que a reação tenha o equilíbrio deslocado para a direita (sentido direto), com o catalisador agindo no sentido da síntese de ésteres. (SÁ *et al*., 2017) (LIMA, 2018).

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, é possível concluir a viabilidade da utilização da lipase Novozyme® RM IM na síntese de ésteres etílicos por meio de um substrato de baixo valor agregado, como o óleo de frango estudado. Com o modelo Taguchi robusto aplicado ao experimento, alterações aos valores dos níveis N1, N2 e N3 dos parâmetros reacionais que menor apresentaram influência no estudo, como o tempo de reação (h) e a quantidade de biocatalisadores (%), podem ser feitos a fim de se otimizar o planejamento e diminuir custos em escala industrial.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio financeiro das Agências Brasileiras de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) (BP3-0139-000005.01.00/18) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) projetos 422942/2016-2 e 409058/2016-5.

REFERÊNCIAS

AL-ZUHAIR, S.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K.B. **Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p.1155-1163, mar. 2003.

ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in

the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 7, p.257-270, jul. 2016.

BABICZ, I. *et al*. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 1, p.4-6, 2010.

CALISKAN, H. Environmental and enviroeconomic researches on diesel engines with diesel and biodiesel fuels. **Journal Of Cleaner Production**, v. 154, p.125-129, jun. 2017.

CHAKRABORTY, R.; ROYCHOWDHURY, D. Fish bone derived natural hydroxyapatite-supported copper acid catalyst: Taguchi optimization of semibatch oleic acid esterification. **Chemical Engineering Journal**, v. 215-216, n. 1, p.491-499, jan. 2013.

CHOWDHURY, A. *et al*. Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physico-chemical characterization of the product. **Industrial Crops And Products**, v. 52, p.783-789, jan. 2014.

DHAWANE, S. H.; KUMAR, T.; HALDER, G. Recent advancement and prospective of heterogeneous carbonaceous catalysts in chemical and enzymatic transformation of biodiesel. **Energy Conversion And Management**, v. 167, n. 1, p.176-202, jul. 2018.

GRYGLEWICZ, S. *et al*. Esters of dicarboxylic acids as additives for lubricating oils. Tribology International, v. 39, n. 6, p.560-564, jun. 2006.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P.. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 64, n. 6, p.763-781, jun. 2004.

LIMA, Ana Paula de. **Desenvolvimento, caracterização e aplicação de novos catalisadores poliméricos heterogêneos baseados em poliestireno sulfonado e polissulfona para produção de biodiesel metílico a partir do ácido oleico**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, Minas Gerais, 2018.

LIMA, Larissa P. *et al*. Production of free fatty acids from waste oil by application of ultrasound. **Biomass Conversion And Biorefinery**, v. 2, p.309-315, jul. 2012.

ROY, R.K.. Design of Experiments Using the Taguchi Approach: 16 Steps to Product and Process Improvement. **United States: John Wiley & Sons**, Inc., 2001.

SÁ, A. G. A. *et al*. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends In Food Science & Technology**, v. 69, p.95-105, nov. 2017.

SANTOS, José Cleiton Sousa dos. **Estudo de parâmetros nas reações de síntese enzimática de biodiesel por intermédio de fluidos supercríticos**. 2011. 102 f. 58 Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SKORONSKI, E. *et al*. Stability of immobilized Rhizomucor miehei lipase for the synthesis of pentyl octanoate in a continuous packed bed bioreactor. Brazilian Journal Of Chemical Engineering, v. 31, n. 3, p.633-641, set. 2014.

TAGUCHI G., KONISHI S. Taguchi methods, orthogonal arrays and linear graphs: Tools for quality engineering. **Dearbom: American supplier institute**, p. 35-38, 1987.