

## X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

"Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro"



Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Universidade Severino Sombra

Vassouras – RJ – Brasil

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE COM MAGNETITA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL****TAVARES\*<sup>1</sup>, A.S.; AMARAL<sup>2</sup>, P.F.F.; FINOTELLI<sup>3</sup>, P.V.**<sup>1</sup>Aluno da EQ/UFRJ    <sup>2</sup>Professora do DEB/UFRJ    <sup>3</sup>Professora do DPN/UFRJ<sup>1</sup> Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro<sup>2</sup> Departamento de Engenharia Bioquímica - Universidade Federal do Rio de Janeiro<sup>3</sup> Departamento de Produtos Naturais – Universidade Federal do Rio de JaneiroEndereço – UFRJ, Av. Pedro Calmon, 550 - Cidade Universitária, Rio de Janeiro, 21.941-901, RJ,  
email: pffamaral@gmail.com

**RESUMO** - A transesterificação enzimática é fonte alternativa na produção de biodiesel por ser mais específica. O objetivo do trabalho é produzir e caracterizar lipase imobilizada em magnetita para a recuperação e reaproveitamento da enzima na produção de biodiesel. Para a imobilização da lipase, obtida do cultivo da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 e produzida em biorreator, a enzima foi colocada em contato com a magnetita, feita por co-precipitação alcalina de  $\text{FeCl}_2$  e  $\text{FeCl}_3$ , e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5 em agitador rotatório por 2, 4, 6 e 24 h. O primeiro tempo de contato é o mais adequado devido ao maior rendimento de imobilização. Foi testada uma síntese do éster etílico com óleo de soja, etanol (3:1) e o nanocatalisador a 0,05 p/p sob agitação, 50°C e por 48 h, tendo bom grau de conversão de 51,92%.

**Palavras chave:** enzimas, nanopartículas magnéticas, biocombustíveis.

## INTRODUÇÃO

A procura constante pelo desenvolvimento sustentável tem fomentado a quantidade de pesquisas que levem ao maior uso de tecnologias limpas, principalmente aquelas que podem reduzir o uso de combustíveis fósseis. Nesse sentido, o biodiesel surgiu como forte alternativa, pois pode ser originado de gorduras animais ou de óleos vegetais presentes na mamona, no dendê, no girassol, no amendoim, na soja, entre outras espécies, as quais são bastante abundantes no Brasil (Marchetti *et. al*, 2007). O processo mais utilizado atualmente para a produção de biodiesel é a transesterificação de triacilgliceróis contidos nos óleos vegetais ou gorduras animais com o etanol ou o metanol estimulado por um catalisador (Fukuda *et. al*, 2001), formando ésteres etílicos e metílicos, respectivamente, e glicerina como subproduto. Tal reação pode ser realizada através do uso de catalisadores ácidos, básicos ou enzimáticos. De forma geral, as indústrias químicas utilizam a catálise básica para a síntese desses ésteres. No entanto, esse processo possui vários inconvenientes, como a baixa seletividade do catalisador, levando a indesejáveis reações paralelas (Cruz Jr *et. al*, 2008).

Dessa forma, a catálise enzimática tem se mostrado promissora em vários estudos já realizados. A lipase por participar desse tipo de reação, ser de fácil acesso e por isso ter baixo custo tem sido alvo de inúmeras pesquisas com resultados bastante satisfatórios. Entretanto, por ser uma enzima, a sua utilização em sua forma livre inviabiliza o processo devido às frágeis configurações estruturais. Com isso, a imobilização veio a resolver essa questão, já que esse método permite que a enzima imobilizada seja resgatada com a sua estrutura e função mantidas, sem perdas e reutilizada (Dalla-Veccchia *et. al*, 2004). O uso de nanopartículas magnéticas, como a magnetita, em suporte de imobilização de enzimas oferece algumas vantagens tais como maior área de superfície específica para ligação de maior quantidade de enzima, menor resistência à transferência de massa, além das enzimas imobilizadas poderem ser seletivamente separadas da mistura reacional pela aplicação de campo magnético (Bai *et al*, 2005).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Síntese da Magnetita

A magnetita foi preparada por coprecipitação alcalina de Fe (II) e Fe (III) sob tratamento térmico. Para isso, foi feita uma purificação de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50 % (p/v) e, em seguida, a reação do sulfato ferroso purificado com  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . O cloreto ferroso obtido foi adicionado à solução de cloreto férreo em soluções equimolares de 0,5 M, com a temperatura mantida a 60°C por 15 minutos sob agitação mecânica em banho-maria. Posteriormente, foi gotejada solução de hidróxido de amônio 25% até se obter pH entre 11 e 12 por mais 15 minutos. A solução com o pó da magnetita foi então centrifugada e o precipitado seco em estufa a 35°C.

Caracterização do Suporte: A magnetita foi analisada em espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (IRPrestige-21 Series da Shimadzu) e análise de difração de raio-x (DRX) usando o difratômetro X' Pert PRO Panalytical Philips.

### Micro-organismo

A levedura utilizada para a produção de lipase foi uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682) selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro. E preservadas em meio YPD – agar contendo em (p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e Agar-agar 3%.

### Síntese da Lipase

As células preservadas em meio YPD foram inoculadas de forma estéril com alças de platina em 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL. Após 48 h em shakers a 160 rpm e 28°C, um volume de células correspondentes à concentração inicial de 1,0  $\pm$  0,1 mg p.s. cel/mL foram centrifugadas (3000 rpm) por 10 minutos e ressuspensas em meio de cultivo modificado (1% de extrato de lêvedo, 0,64% de peptona e 2% de glicose) servindo como inóculo para a produção de lipase em biorreator de 2 L com 1,5 L de meio. As condições de produção foram: 28°C, 650 rpm, vazão de oxigênio de 1,5 L/min por 20

horas. Após isso, o meio no biorreator foi retirado e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante usado como extrato bruto de lipase.

#### Atividade do Extrato Bruto:

Acompanhou-se a hidrólise de uma solução de p-nitrofenil laurato (pNFL) a 560  $\mu$ M em DMSO e em tampão fosfato de potássio a 50 mM e pH 7. Adicionou-se 0,2 mL de extrato bruto a 1,8 mL do substrato a 37°C e a reação foi acompanhada em espectrofotômetro a 410 nm durante 100 segundos. A atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1  $\mu$ mol de substrato por minuto.

#### Teor de Proteína do Extrato Bruto:

Utilizou-se a metodologia desenvolvida por Bradford (1976).

#### **Imobilização da Lipase**

A imobilização da lipase por adsorção física foi feita em triplicata com 1 mL do extrato bruto, 9 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,5 e 200 mg de nanopartículas magnéticas de magnetita e um controle (não contendo o suporte). Condições: 2, 4, 6 e 24 horas a 150 rpm e 25 °C. Após, meio foi centrifugado (6000 rpm, 15 minutos), os precipitados lavados com tampão, lyophilizados e armazenados a 10°C.

#### **Produção do Éster Etílico**

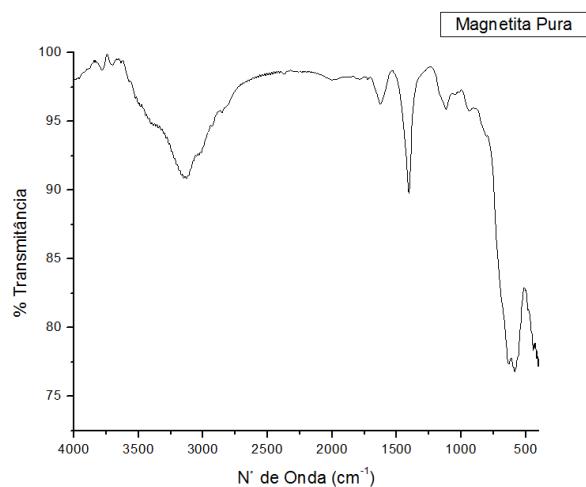
Foi feita uma síntese teste do éster etílico utilizando óleo de soja e etanol na razão 3:1 e enzima imobilizada a 0,05 p/p em erlemeyer de 50 ml e um controle (sem o biocatalisador). As duas amostras foram levadas ao banho de agitação a 50°C, deixando reagir por 48h.. Após esse tempo, aplicou-se um campo magnético para a retirada da nanopartícula. Esses, então, foram postos em funil de separação a fim de decantar a glicerina do éster etílico.

Determinação do Rendimento: O grau de conversão foi obtido por diferença (entre o teste com biocatalisador e controle), quantificando-se os triglicerídeos não reagidos após a separação do glicerol com o kit enzimático Laborlab. O grau de conversão foi calculado pela diferença entre a concentração de triglicerídeo remanescente no controle (sem catalisador) e na amostra (da reação com

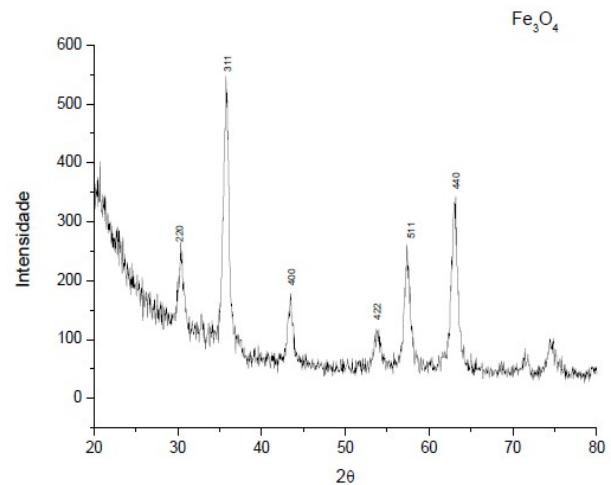
catalisador) dividido pela concentração triglycerídeo remanescente no controle e multiplicado o resultado por 100.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O suporte apresentou vibrações, no infravermelho, bem próximas às características da magnetita, segundo Maity et al. (2009), como mostra a Figura 1. A estrutura cristalina do suporte produzido é confirmada pelos picos bem definidos e próximos ao padrão do óxido de ferro (Bedê, 2010), como mostra a Figura 2.



**Figura 1 - Espectro de FTIR da magnetita**



**Figura 2 - Difratograma da magnetita**

A atividade enzimática é medida seguindo ao longo do tempo o aparecimento do produto ou o desaparecimento do substrato. É expressa geralmente em unidades de

atividade enzimática (U), que corresponde à quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 $\mu$ mole de substrato por minuto, a 25°C e em condições definidas de pH, concentração de substrato, entre outras. A medida da atividade de uma enzima é a determinação da taxa de reação inicial numa situação em que a concentração de substrato é bem maior que a concentração de enzima e de produto. Para se ter certeza, utiliza-se sempre o início da fase linear da reação. No caso, acompanha-se a atividade da lipase através da reação de hidrólise de p-nitrofenil laurato (branco), obtendo-se como produto o ácido láurico e o p-nitrofenol laurato (amarelo) e, por isso, utiliza-se a absorbância como parâmetro para a medida da atividade enzimática.

A atividade lipásica no extrato bruto após produção em biorreator com *Y. lipolytica* foi de 12061,50 U/L e a concentração de proteína foi de 83,21  $\mu$ g/mL. O extrato bruto foi colocado em contato com a magnetita por diferentes tempos e o rendimento da imobilização foi calculado pela diferença entre a atividade da enzima no extrato bruto e a atividade do sobrenadante após o período de contato com o suporte, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1 - Relação entre atividade hidrolítica e o rendimento de imobilização**

Tempo (h)	Atividade hidrolítica (U/L)	Concentração de proteína ( $\mu$ g/mL)	Rendimento de imobilização (%)
0	12061,5 $\pm$ 552,2	83,21 $\pm$ 2,7	0
2	58,07 $\pm$ 37,4	9,3 $\pm$ 5,1	99,03
4	26,01 $\pm$ 27,5	4,4 $\pm$ 4,6	99,60
6	45,87 $\pm$ 7,6	22,7 $\pm$ 3,1	99,24
24	26,68 $\pm$ 18,5	4,2 $\pm$ 2,1	99,50

\*O tempo zero corresponde aos valores da enzima livre.

Os resultados obtidos para a quantificação de glicerol na amostra do éster etílico produzido e no controle foram de 3,93  $\pm$  1,0 g/L e 8,14  $\pm$  0,3 g/L, nessa ordem. Isso

quer dizer que a catálise pareceu bastante eficiente, visto que a quantidade de glicerol ainda ligado ao éster etílico foi bem menor que no controle, já que neste não havia o biocatalisador. Por meio das proporções de ácidos graxos no óleo de soja, em que se leva em consideração o ácido Linolênico (7%), Linoléico (56%), Esteárico (4%), Palmítico (11%) e Oléico (22%) (COSTA NETO, 2002) e pela estequiometria, pode-se calcular o grau de conversão da reação. Esse primeiro teste obteve um grau de 51,92% aproximadamente.

Conforme as expectativas, a atividade hidrolítica e a concentração de proteína nos sobrenadantes e nas lavagens foram bem mais baixas em relação às quantidades iniciais. Com isso, pode-se afirmar que grande parte da enzima está ligada ao suporte. O tempo de contato mais adequado para a imobilização até o momento foi de 2 horas, sendo o biocatalisador resultante desse processo utilizado nas reações de transesterificação. O grau de conversão da reação de transesterificação foi de 51,92%.

## CONCLUSÃO

Pode-se afirmar até então que a imobilização da lipase na magnetita é promissora, uma vez que os rendimentos de imobilização foram bastante altos, em torno de 99%. O tempo de imobilização mais adequado até o momento foi o de 2 horas e o biocatalisador obteve cerca de 50% de conversão dos triglicerídeos na reação de transesterificação.

## REFERÊNCIAS

- BAI, S., GUO, Z., LIU, W., SUN, Y. (2005) “Resolution of (±)-menthol by immobilized *Candida rugosa* lipase on superparamagnetic nanoparticles” Food Chemistry, v. 96, p.1-7
- BRADFORD, M.M. (1976) “A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding” Anal Biochem, v. 72, p. 248-254
- BEDÊ, P.M. (2010), Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações biomédicas. Instituto Militar de Engenharia, Praia Vermelha - RJ

(dissertação de mestrado), 73p

CRUZ JR., A., PACHECO, S.M.V., FURIGO JR., A. (2008) “Imobilização de Lipase de Candida antarctica B em Esferas de Quitosana para a Obtenção de Biodiesel por Transesterificação de Óleo de Mamona” II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel.

DALLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M.G., SOLDI, V. (2004) “Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros” Química Nova, v. 27, nº 4, p. 623-630

FUKUDA, H., KONDO, A., NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. (2001) “Journal of Bioscience and Bioengineering” v. 92, nº 5, p. 405-416

MAITY, D. (2009) “Studies of magnetite nanoparticles synthesized by thermal decomposition of iron (III) acetylacetone in tri(ethylene glycol)” Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 321, Issue 19, p. 3093–3098

MARCHETTI, J.M., MIGUEL V.U.,ERRAZU, A.F. (2007) “Possible methods for biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews” v.11, p.1300-1311

COSTA NETO, P.R.C. (2002) “Obtenção de ésteres alquílicos (Biodiesel) por via enzimática a partir de óleo do soja” Tese de Doutorado, Departamento de Química da Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 152 p

Agradecimentos ao PIBIC pelo fornecimento do auxílio financeiro.

## AGRADECIMENTOS