

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida rugosa* EM SUPORTE HIDROFÓBICO MESOPOROSO (MCM 41) PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

R. R. de SOUZA¹, R. D. M. FERREIRA¹

¹ Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Engenharia Química, Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABAM/DEQ/UFS)
E-mail para contato: rrouza@ufs.br

RESUMO – As lipases têm uma cadeia de oligopeptídeos e a região que circunda o sítio ativo das lipases é hidrofóbica, logo, elas reconhecem superfícies hidrofóbicas. A imobilização é uma das estratégias mais utilizadas quando se deseja transmitir as características aspiradas de catalisadores heterogêneos tradicionais para um biocatalisador. No caso dos suportes inorgânicos, destacam-se os mesoporosos quando se trata de imobilização de lipase. O MCM 41, utilizado neste trabalho, compreende um grupo de materiais mesoporosos constituídos de sílica e alumina, que garantem os requisitos necessários de um suporte adequado. A lipase de *Candida rugosa* foi adquirida pelo laboratório Sigma e imobilizada por adsorção, em pH 7,0 e 8,0 e massa do suporte 0,30 g e 0,45 g. A melhor condição operacional para produção do biocatalisador foi com pH 7,0 e massa de suporte 0,30 g, obtendo 99,2 % de eficiência de imobilização. Na imobilização, a melhor condição foi a de pH 7,0 e massa de suporte igual a 0,30 g, pois quando comparadas às outras mostrou maior estabilidade e ativação da enzima, coincidente com os valores ótimos encontrados na literatura. Na aplicação do biocatalisador utilizando o óleo de oliva. Os resultados mostraram uma queda da conversão após 10 minutos de reação, sugerindo que houve uma inativação ou até mesmo desnaturação da enzima no meio, tendo uma conversão global de 41 %. Para a enzima livre a conversão global foi de 52 %.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Lipase

Lipases são enzimas capazes de catalisar reações de hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos. Sua aplicabilidade é enorme visto que além da reação de hidrólise podem catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não-aquosos ou restritos a água. Por esse motivo, as lipases são excelentes alternativas aplicáveis às indústrias de alimentos, oleoquímicas, farmacêuticas e de biossensores (SILVA *et. al.*, 2014).

1.2. Adsorção

Esse método de imobilização se baseia na adsorção da enzima sobre um material relativamente poroso. A adsorção física fundamenta-se em interações interfaciais não covalentes, incluindo ligação de hidrogênio, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (YU *et. al.*, 2013). Os materiais utilizados como suportes são os mais diversos, como a hidroxilapatita, alumina, sílica, carvão ativado (REGULY, 2000). Uma boa imobilização depende da orientação das cargas e hidrofobicidade do suporte, bem como do tamanho de seus poros, tanto para maior estabilidade da interação quanto para maior especificidade do processo. Ramos *et. al.* (2014) estudou a aplicação de duas organobetonitas com hidrofobicidades diferentes como suporte na adsorção física de lipase de *Candida rugosa* avaliando sua atividade imobilizada e livre, obtendo como pH e temperatura ótimos uma faixa de 5,5 a 7,0 e 35 a 45 °C, respectivamente. Os suportes mesoporosos de sílica são excelentes opções para imobilização de enzimas devido a sua grande área superficial, elevado volume e atoxicidade (YU *et. al.*, 2013). Essa é a forma mais simples, econômica e rápida de se imobilizar enzimas (GUPTA *et. al.*, 2013). Devido às ligações fracas as quais são submetidas, problemas de desorção e desnaturação são bastante comuns, e podem ser ocasionadas por pequenas variações de pH, temperatura, força iônica, e até pela presença do substrato.

1.3. Suporte

Chen *et. al.* (2011) estudou o efeito da hidrofobicidade de membranas usadas como suporte para imobilização de lipase por ligação covalente sobre a atividade e estabilidade da enzima, obtendo melhores resultados quando usou a membrana de maior hidrofobicidade. Estudos mostram que a região que circunda o sítio ativos das lipases é hidrofóbico, por isso, superfícies hidrofóbicas são reconhecidas como substrato natural, possibilitando sua ativação interfacial (FERNANDEZ-LAFUENTE *et. al.*, 1998). É possível predizer que o suporte mais desejável deve ter elevada área superficial, ser térmica e quimicamente estável, resistente a contaminações e de baixo custo (KANDASAMY *et. al.*, 2010). O MCM 41 é um suporte que contempla tais características e faz parte da família de suportes com arranjos hexagonais e poros uniformes e de tamanho bem definido, com canais construídos com matriz de sílica e alumina (KRESGE *et. al.*, 2012).

1.4. Biodiesel

O biodiesel é definido como uma mistura de ésteres monoalquís de cadeia longa de ácido-graxo derivado de fontes de lipídio renováveis, como óleo vegetal ou animal (HOEKMAN, *et. al.*, 2012). É um biocombustível de primeira geração (transforma de forma direta a biomassa em biocombustível) que veio como candidato à substituição do diesel com uma proposta ambientalmente mais correta, pois é biodegradável, renovável, mais lubrificante, não possui enxofre e possui melhor ponto de fugor. A principal forma de transformar óleo em biodiesel é pela reação de transesterificação. Dentre as possíveis rotas de produção, a enzimática, apesar de mais cara, é a rota em maior ascensão, pois diminui os problemas de subprodutos devido a alta especificidade da enzima e aumenta a velocidade da reação. Cerveró *et. al.* (2013) estudou a transesterificação do óleo de soja com etanol na presença da Novozyme 435 (lipase de *Candida antártica*), obtendo como condições ótimas de operação: 5 g de enzima por 100 g de óleo, temperatura de 37 °C e proporção álcool/óleo

de 3:1. As principais fontes de lipídeo para produção de biodiesel vêm da gordura animal e óleo de mamona, soja e dendê. No entanto há estudos que avaliam a eficiência de outras fontes de óleo, tais como oliva, canola, gordura animal, palma, colza, milho e microalgas, Gog (2012) fez um apanhado dos principais óleos utilizados e seus rendimentos, obtendo para o óleo de soja, por exemplo, um rendimento igual a 92%. A reação de transesterificação é representada na Figura 1.

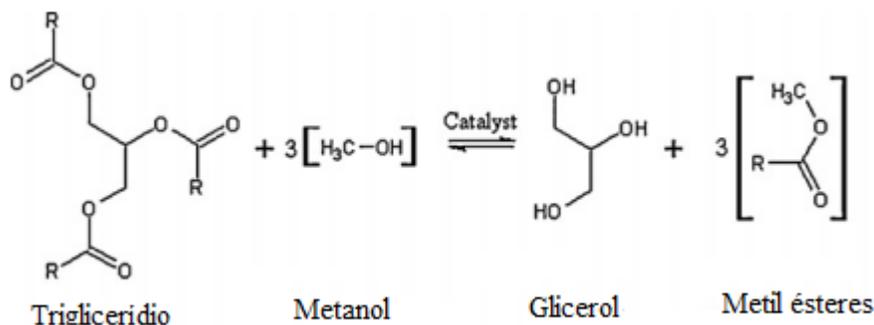


Figura 1: Reação de transesterificação.

O álcool é posto em excesso nesse tipo de reação, pois isso favorece a produção de biodiesel, deslocando o equilíbrio para formação deste, já que é um processo reversível. Entretanto, em casos que utilizam biocatalisador, o metanol empregado na reação pode inibir a atividade da lipase, afetando sua estabilidade (TRAN *et. al.*, 2013).

2. METODOLOGIA

2.1. Determinação da atividade enzimática

Uma curva de calibração foi feita utilizando-se a lipase e o p-NFL (p-nitrofenillaurato) como substrato. A solução da lipase foi elaborada com concentração de 0,1g/100 mL em tampão fosfato de potássio pH 6, 7 e 8 e diluída para formação da curva de calibração. Para o substrato, foi utilizada uma proporção de 1 mL de DMSO para 0,0180 g de p-NFL em 100 mL de solução tampão. As duas soluções foram colocadas numa cubeta de 2 mL na proporção de 1,8 mL de substrato para 0,2 mL de enzima, e ficaram em contato por um tempo padronizado em 40 s para posterior análise em espectrofotômetro com comprimento de onda igual a 410 nm.

2.2. Imobilização da enzima

Foi colocado sob agitação constante uma massa do suporte MCM 41 devidamente tratado com HNO₃, em contato com 20 mL da solução de lipase. De tempos em tempos foram retiradas amostras do sobrenadante e medidas sua atividade e proteína de acordo com as metodologias já descritas. A porcentagem de imobilização foi calculada de acordo com as Equações 1 e 2.

$$E_{imob} (\%) = U_{teor} \cdot 100U_0 \quad (1)$$

$$U_{teor} = U_0 - \frac{U_s}{m_{sup}} \quad (2)$$

Onde E_{imob} é a eficiência de imobilização, U_{teor} são unidades de enzima teoricamente ativas, U_0 são unidades de enzima iniciais, U_s unidades de enzima que se perderam na primeira lavagem e m_{sup} a massa do suporte.

2.3. Reação de transesterificação

Em um béquer, foi misturado azeite de oliva Extra Virgem Galo com metanol numa proporção de 4:1. Em seguida, adicionou-se 0,05 g do biocatalisador e deixou-se agitar à temperatura ambiente. Três amostras de 1 g cada foram coletadas nos tempos de 30, 60, 120, 150 e 180 minutos. Tais amostras foram diluídas em 25 mL de álcool etílico e tituladas com NaOH 0,25 N. Outro procedimento semelhante foi feito usando um volume de 15 % de solução de lipase 0,1 g/100 mL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação do pH e da massa do suporte sobre a atividade enzimática

A Figura 2 mostra a curva de calibração da enzima em pH 6,0, mostrando sua relação com a absorbância obtida.

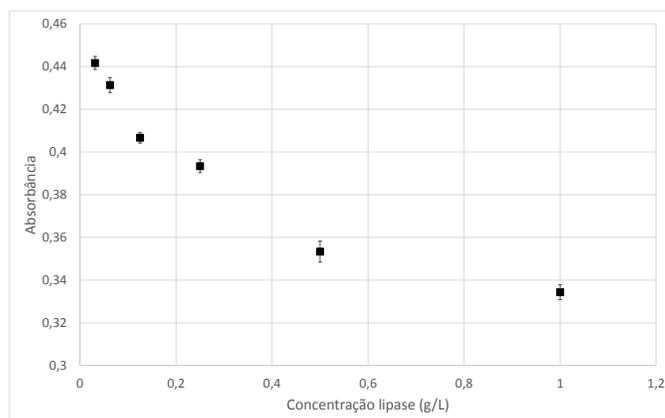


Figura 2: Curva de atividade enzimática representada pela relação entre a concentração da enzima e a absorbância em pH 6,0.

Sabe-se que quanto maior a concentração da enzima, melhor é sua atividade, pois uma unidade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de catalizar a reação com taxa de formação de produto de 1 $\mu\text{mol/s}$, e a formação de p-NF é notada pela intensificação da cor

amarela medida no espectrofotômetro. No entanto, o comportamento obtido ao se utilizar um meio em pH 6,0 foi o oposto do esperado. O pH é um dos fatores que podem influenciar a atividade da enzima, mudando o estado de ionização dos componentes do sistema, o que pode desnaturar a enzima. Portanto, a curva mostra uma queda na absorbância com o aumento da concentração enzimática, podendo significar que houve desnaturação da lipase, impedindo a catálise da reação e consequentemente formação do produto.

Devido ao efeito negativo do pH 6,0 sobre a enzima, apenas o pH 7,0 e 8,0 foram estudados durante a imobilização em conjunto com a influência da massa do suporte no estudo da influência dos efeitos estéricos e de conformação. A Figura 3 mostra a curva obtida na imobilização da lipase a pH 7,0 para comparação entre as massas de suporte utilizadas.

Nota-se que há uma grande afinidade entre a enzima e o suporte nos primeiros 10 minutos de reação, como considerável queda de atividade no sobrenadante. No entanto, para uma menor massa de suporte, a absorbância no tempo de 10 minutos foi menor que para a outra massa de suporte, o que sugere que uma maior quantidade de enzima migrou do meio para o suporte e que os efeitos estéricos proporcionados por uma massa excessiva de suporte afetaram negativamente a adsorção.

A Figura 4 compara os pHs estudados usando 0,30 g de suporte. A utilização de pH 7,0 é ligeiramente melhor que a utilização do pH 8,0, pois nos primeiros 10 minutos há uma redução de atividade 10 % maior.

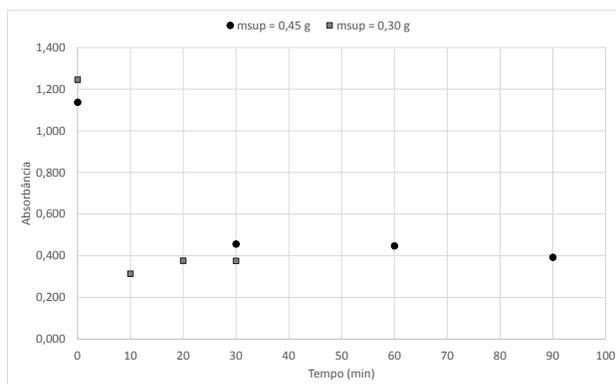


Figura 3: Curva de absorbância versus tempo de adsorção em pH 7,0 com massa de MCM 41 de 0,30 e 0,45 g.

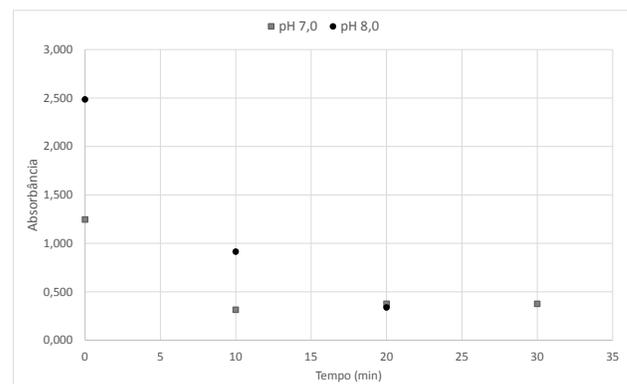


Figura 4: Curva de absorbância versus tempo de adsorção com massa de MCM 41 igual a 0,30 g e pH 7,0 e 8,0.

Outra observação que pode ser feita através dos números apresentados acima, é que o tempo ótimo para a adsorção foi de 10 minutos, como pode ser visto um aumento da atividade no sobrenadante nos tempos posteriores, mostrando que a agitação pode ter causado a dessorção da lipase.

3.2. Aplicação no substrato sintético

A Figura 5 mostra a sequência evolutiva de intensificação da cor conforme a reação acontecia. Assim, nesta figura temos a coloração da mistura reacional com: a-22 minutos; b- 38 minutos; c-98 minutos; d-128 minutos; e- 218 minutos; f- 298 minutos.

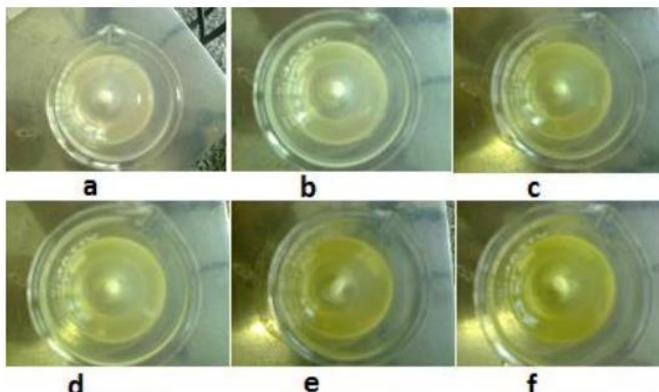


Figura 5: Intensificação da cor do p-NF conforme processamento da reação.

A Figura 6 e 7 exibem as curvas da concentração de p-NF em termos de atividade pela reação de 0,05 g e 0,1 g do biocatalisador com o substrato, respectivamente.

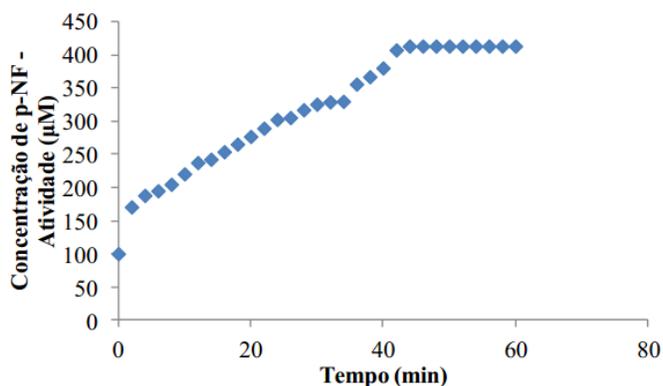


Figura 6: Curva da concentração de p-NF em termos de atividade pela reação de 0,05 g de biocatalisador com o substrato.

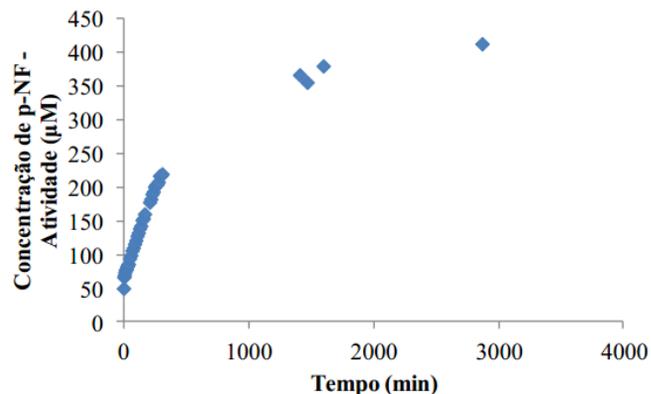


Figura 7: Curva da concentração de p-NF em termos de atividade pela reação de 0,10 g de biocatalisador com o substrato.

Nota-se que a menor massa leva um tempo maior para alcançar a estabilização, o que é esperado, pois com uma massa menor de biocatalisador a reação se processa de forma mais lenta. A Figura 8 mostra que conforme se aumenta a concentração de p-NF, há diminuição da concentração do substrato, que vai sendo consumido durante a reação. Isso significa que o biocatalisador está funcionando de acordo com o esperado, fazendo a conversão de substrato em produto.

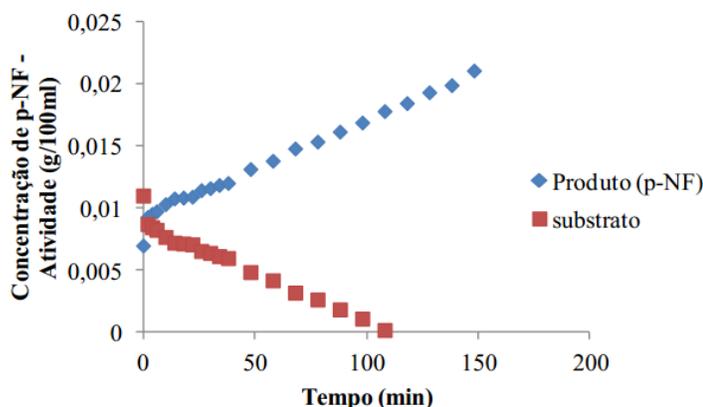


Figura 8: Conversão de p-NFL em p-NF pela ação de 0,01 g de biocatalisador.

3.3. Aplicação no óleo de oliva

Seguindo a metodologia descrita no item 2.3, foi calculada a porcentagem de ácido graxo livre (FFA) e a conversão da reação ($XA(\%)$) através das Equações 4 e 5.

$$FFA = \frac{N_{NaOH} \cdot V_{NaOH} \cdot MM_{\text{óleo}}}{m_a} \quad (4)$$

$$XA(\%) = \frac{FFA - FFB}{FFA} \cdot 100 \quad (5)$$

Onde N_{NaOH} é a concentração da base utilizada na titulação, V_{NaOH} é o volume gasto na titulação, $MM_{\text{óleo}}$ é a massa molar aproximada do óleo de oliva e, FFB é a porcentagem de ácido graxo livre no óleo puro.

A Tabela 2 mostra a conversão da reação contendo 15 % de água e enzima livre. Neste caso, obteve-se a maior porcentagem de conversão no tempo de 180 minutos. Tais valores, se comparados aos da Tabela 3, revelam que a atividade da enzima livre é maior que a da enzima imobilizada.

Tabela 2: Porcentagem de conversão da reação de transesterificação - titulação usando 15 % de água.

Tempo (min)	0	30	60	90	120	150	180
X (%)	0	28,6	50	50	50	50	52,4

Tabela 3: Porcentagem de conversão da reação de transesterificação - titulação com biocatalisador.

Tempo (min)	0	30	60	90	120	150	180
X (%)	0	0	9,1	28,6	28,6	9,1	41,2

4. CONCLUSÃO

Na imobilização, a melhor condição foi a de pH 7,0 e massa de suporte igual a 0,30 g, pois quando comparadas às outras mostrou maior estabilidade e ativação da enzima. Essa imobilização obteve 99,2 % de eficiência e apresentou pH coincidente com os valores ótimos encontrados na literatura.

Com a condição de pH e massa do suporte definidas, foi avaliada a cinética da reação de produção de p-NF com massas diferentes de biocatalisador. A menor massa deu origem a uma curva mais definida por conta da menor velocidade da reação, possibilitando melhor visualização da conversão de substrato em produto. A curva de conversão, portando, ratifica a eficiência do biocatalisador produzido.

Na aplicação do biocatalisador utilizando o óleo de oliva, no entanto, os resultados mostraram uma queda da conversão após 10 minutos de reação, sugerindo que houve uma inativação ou até mesmo desnaturação da enzima no meio. A maior conversão obtida foi de aproximadamente 41 %, enquanto que 52 % de conversão foram obtidos utilizando-se solução de enzima livre.

5. REFERÊNCIAS

- CERVERÓ, J. M.; LUQUE, I. S.. *Novozym 435-catalyzed synthesis of fatty acid ethyl esters from soybean oil for biodiesel production*. Biomass and Bioenergy, 2013.
- CHEN, G.; KUO, C.; CHEN, C. *Effect of membranes with various hydrophobic/hydrophilic properties on lipase immobilized activity and stability*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÈN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.. *Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports*. Chemistry and Physics of Lipids, 93, 2008.
- GOG, A.; ROMAN, M.; TOS, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. *Biodiesel production using enzymatic transesterification e Current state and perspectives*. Renewable Energy, 39, 2012.
- KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S. *Immobilization of Rhizopus oryzae lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme*. Process Biochemistry, 46, 2011.
- KANDASAMY, R.; KENNERDY, L. J.; VIDYA, C. *Immobilization of acidic lipase derived from Pseudomonas gessardii onto mesoporous activated carbon for the hydrolysis of olive oil*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 62, 2010.
- REGULY, J. C. *Biotecnologia dos Processos Fermentativos*, Vol 3, Editora Universitário/UFPE, 2000.
- TRAN, D. T.; CHEN, C. L.; CHANG, J. S.. *Effect of solvents and oil content on direct transesterification of wet oil-bearing microalgal biomass of Chlorella vulgaris ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized lipase as the biocatalyst* Bioresource Technology, 2013.