

AVALIAÇÃO DAS VELOCIDADES DAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASE DE *BURKHOLDERIA CEPACIA* IMOBILIZADA

J.H. DANTAS¹, M. L. HARTH¹, E.F. SOSTER¹, P. A. ARROYO¹, F. F. de MORAES¹
e G. M. ZANIN¹

¹ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: ikedantas@yahoo.com.br

RESUMO – A produção de éster a partir de óleo vegetal é realizada nas mais variadas escalas com possibilidade de se obter rendimentos apreciáveis, no entanto, somente a análise da cinética de reação por meio de um modelo fundamentado nas velocidades elementares das reações que constituem o mecanismo do processo pode determinar as etapas limitantes da reação e assim, permitir o desenvolvimento de melhorias na seleção das condições dos processos estudados. O ajuste desse modelo aos dados experimentais de produção de éster do óleo de canola catalisada por lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica com a superfície modificada, mostrou que duas etapas limitam o desenvolvimento reacional. A primeira limitação cinética ocorre na conversão de triacilgliceróis em éster e diacilgliceróis. Já a segunda limitação ocorre na última etapa de reação do processo, a conversão dos monoacilgliceróis em ésteres. Os resultados mostraram que as etapas limitantes da reação ocorrem quando há mudanças de polaridade.

1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas em reações tem atraído a atenção por exibirem alta atividade, permitirem alcançar rendimentos elevados mesmo em condições brandas de reação. No entanto, as maiores desvantagens desses biocatalisadores são a estabilidade, capacidade de reutilização e preços elevados. Desde muito tempo a imobilização em suportes sólidos tem sido a forma mais eficiente de superar esses inconvenientes (Jaeger *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2012). Mas recentemente os usos de materiais mesoporosos formados principalmente por sílica indicam incrementos importantes quanto ao aumento de atividade e estabilização das enzimas, principalmente as lipases.

Essas enzimas são utilizadas como biocatalisadores para a hidrólise do éster, alcoólise, acidólise, aminólise e interesterificação em várias aplicações. Sugere-se que a limitação à transferência de massa é um dos fatores que possui maior influência no rendimento uma vez que as lipases são ativas na interface dos substratos (Jaeger *et al.*, 1999; Nouredini e Zhu, 1997; Slinn e Kendall, 2009). A melhora tanto do rendimento quanto da qualidade da síntese de éster pode ser obtida estudando a cinética dessa reação, além de indicar as etapas limitantes da reação (Yahya *et al.*, 1998).

Diante das informações, as equações matemáticas obtidas a partir do desenvolvimento de um modelo de velocidades elementares de reação foram empregadas para avaliar o rendimento em éster e as concentrações dos tri, di, mono acilgliceróis presentes no meio reacional uma vez que existem uma dinâmica na concentração desses compostos ao longo

dos seis ciclos de reutilização do biocatalisador utilizado na produção de éster do óleo de canola e etanol catalisado por lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica de porosidade controlada modificada com octadecil-tri-metoxi-silano.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

A enzima lipase de *Burkholderia cepacia* e octadecil-tri-metoxi-silano com 90% de pureza foram adquiridas da Sigma Co, St. Louis, MO, EUA. O etanol absoluto P.A. empregado foi da marca Merck. A sílica de porosidade controlada foi fornecida pela Corning Glass Works, EUA (Corning, NY).

2.2. Ativação da superfície da sílica

A reação de silanização foi conduzida a temperatura de 60 °C em um reator agitado a 180 rpm num banho termo estatizado com agitador orbital. 10 g de sílica de porosidade controlada com umidade de 0,4 % em relação a massa da partícula foi adicionada a um reator de 205 mL ligado a condensador, 24 mL de etanol foi adicionado. A reação foi iniciada com adição de 1,2 mL de octadecil-tri-metoxi-silano com 90 % de pureza. O tempo total de reação foi de 3 horas. Ainda quente o material foi filtrado e enxaguado por duas vezes com 50 mL de etanol absoluto e 2 vezes com o mesmo volume de água ultra pura. O material então foi levado a estufa para secagem por 24 horas a 105 °C. Logo que seco o material foi acondicionado em dessecador para as etapas de imobilização.

2.3. Imobilização da lipase

Em um tubo de ensaio, 3 g da solução sólida de lipase de *Burkholderia cepacia* foi homogeneizada em 10 mL de hexano a temperatura ambiente em vortex a baixa velocidade. Outro tubo de ensaio 5 g de sílica de porosidade controlada modificada com octadecil-tri-metoxi-silano foi adicionado e rapidamente vertido no tubo contendo a solução enzimática em fase orgânica. Em seguida, após homogeneização o tubo de ensaio foi acondicionado dentro de um dessecador e com a aplicação controlada de vácuo evaporou-se todo o solvente. Quando nenhuma gota de solvente pode ser identificada, aplicou-se vácuo intenso. O biocatalisador ficou armazenado por 2 dias até que os primeiros testes fossem realizados. Todas as metodologias foram realizadas em duplicata.

2.4. Reação de transesterificação

Os ensaios para a síntese de ésteres etílicos foram conduzidos em reatores de 50 mL, acoplados a condensadores. Os reatores e condensadores foram mantidos em temperatura e agitação constantes utilizando banhos termostatizados e agitadores magnéticos. A condição de operação dos ensaios foi temperatura de 40 °C, 1 g de biocatalisador e razão molar óleo: álcool de 9:1 com o tempo de reação monitorado de (0 - 72 horas) com retiradas das amostras em tempos pré-determinados. Após o tempo de 72 horas o biocatalisador foi recuperado por filtração a vácuo, lavado com hexano, seco e logo em seguida adicionado a um meio reacional novo quando se deu início a uma nova batelada (Dantas *et al.*, 2013).

2.5. Análise das Amostras

Para identificação e quantificação dos triacilglicerídeos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ésteres em cromatografia em fase líquida de alta eficiência foi utilizado o método adaptado de Holcapek *et al.*, (1999). A preparação da amostra foi realizada coletando 0,2 mL de amostras do meio reacional, que foram aquecidas para inativação da enzima, enxaguadas a quente, centrifugadas, separadas do meio líquido e diluídas em isopropanol. Depois filtradas e armazenadas para posterior análise. O método analítico de quantificação foi fundamentado na construção de um gradiente ternário com tempo total de análise de 42 minutos. A condição inicial foi de 30 % de A + 70 % de B, 100 % de B em 15 min, 50 % de B + 50 % de C em 24 min, seguida por 12 min de eluição isocrática de 50 % de B e 50 % de C. Nos últimos 6 min foi retomado o gradiente inicial (30 % de A + 70 % de B), para restabelecer as condições iniciais de operação da coluna. A coluna foi operada a 40 °C, com detecção UV-VIS a 210nm, com injeção de 20 µL e vazão de 1 mL.min⁻¹. As curvas de calibração foram construídas a partir de diluições consecutivas das misturas de padrões de trioleína, 1,2-dioleína, 1-monooleína e oleato de etila e as quantificações foram realizadas somando as áreas relativas das espécies químicas comuns, submetidas à curva de calibração (Dantas *et al.*, 2013).

O modelo fenomenológico fundamentado nas velocidades elementares de reação desenvolvida a partir das três reações elementares de caráter reversível que regem a reação de transesterificação está descritos nas equações de (1) a (3).



As velocidades de consumo e/ou produção dos componentes do meio reacional, triacilglicerol (Tri), álcool etílico (EtOH), éster etílico (EE), glicerol (G), monoacilglicerol (M) e diacilglicerol (Di) são representadas, em função do tempo, pelas Equações de (4) a (9) (Fedosov e Xu, 2011).

$$\frac{d[Tri]}{dt} = -k_1 [Tri][EtOH] + k_2 [Di][EE] \quad (4)$$

$$\frac{d[Di]}{dt} = k_1 [Tri][EtOH] - k_2 [Di][EE] - k_3 [Di][EtOH] + k_4 [M][EE] \quad (5)$$

$$\frac{d[M]}{dt} = k_3 [Di][EtOH] - k_4 [M][EE] - k_5 [M][EtOH] + k_6 [EE][G] \quad (6)$$

$$\frac{d[EE]}{dt} = k_1 [Tri][EtOH] - k_2 [Di][EE] + k_3 [Di][EtOH] - k_4 [M][EE] +$$

$$+k_5[M][EtOH]-k_6[G][EE] \quad (7)$$

$$\frac{d[EtOH]}{dt} = -k_1[Tri][EtOH] + k_2[Di][EE] - k_3[Di][EtOH] + k_4[M][EE] +$$

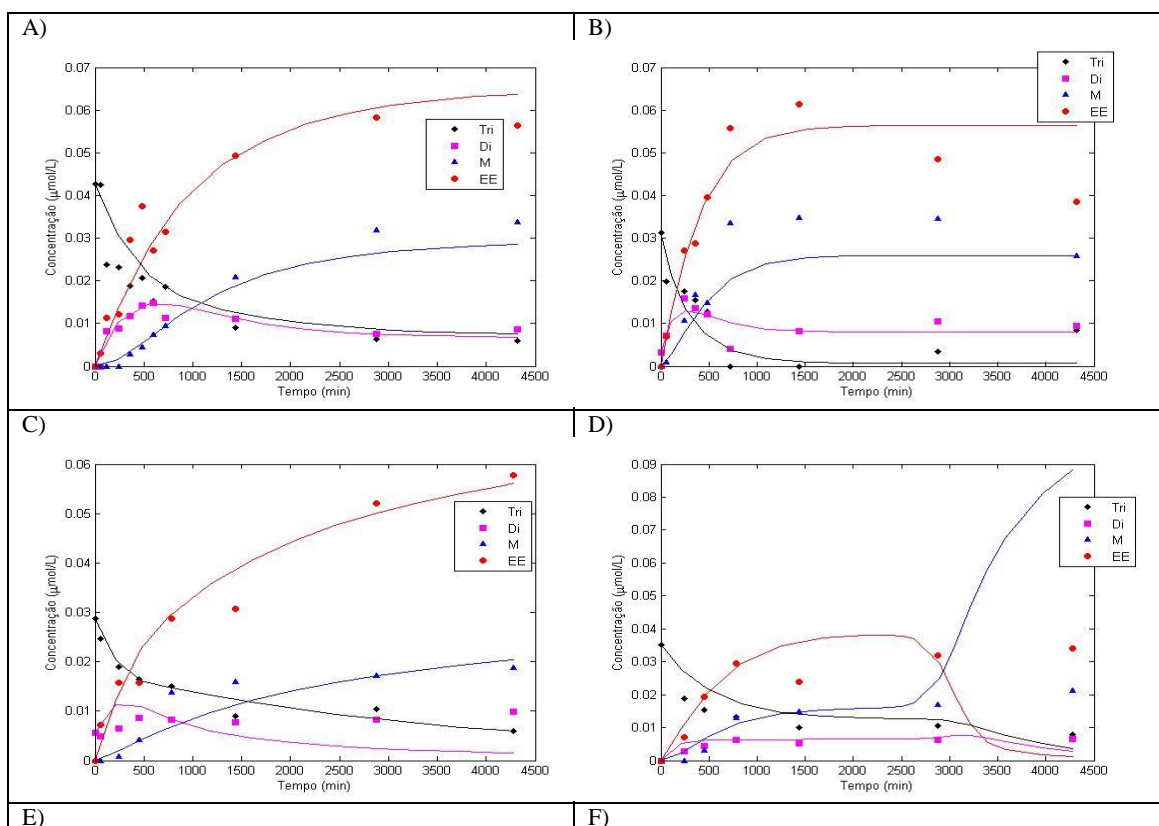
$$-k_5[M][EtOH] + k_6[G][EE] \quad (8)$$

$$\frac{d[G]}{dt} = k_5[M][EtOH] - k_6[G][EE] \quad (9)$$

Em que os valores de k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_5 , e k_6 são as constantes de velocidade da reação das Equações de (1) a (3). O sistema de equações diferenciais foi resolvido numericamente utilizando a sub-rotina ode23tb da biblioteca do MatLab 7.0 e os valores experimentais foram comparados aos gerados pelo modelo por meio de uma função objetivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que o modelo fenomenológico desenvolvido ajustou-se bem aos dados experimentais, com exceção aos dados da Figura 1E em que o ajuste dos dados divergiu para o triacilglicerol. No entanto o valor do R^2 foi sempre menor que 1,2%. Como pode ser verificado na Figura 1.



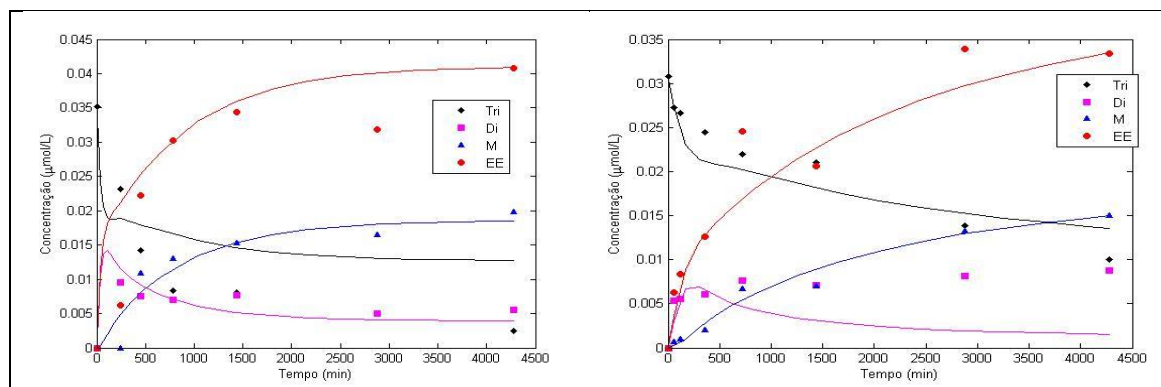


Figura 1: Curvas da cinética de produção de ésteres etílicos dos ciclos de reutilização do biocatalisador. A) ciclo 1, B) ciclo 2, C) ciclo 3, D) ciclo 4, E) ciclo 5, F) ciclo 6. Triacilglicerol (\square), diacilglicerol (Δ), monoacilglicerol (\circ), éster (\odot).

Os valores das constantes de velocidade da reação Equações (1) a (3) gerados pelo modelo fenomenológico descrito pelas Equações de (4) a (9), assim como o rendimento em éster no final da reação são apresentados na Figura (2). Os resultados indicaram que as constantes de velocidade da reação de conversão de triacilglicerol em diacilglicerol, k_1 , foram inferiores em relação às constantes de velocidade da reação reversa k_2 . Tal resultado foi verificado em todos os ciclos de reutilização do biocatalisador. Mas nos ciclos de reutilização 3, 4, 5, e 6 as diferenças nessas constantes de velocidade foram muito superiores, quando comparadas às diferenças que os dois primeiros ciclos de reutilização apresentaram.

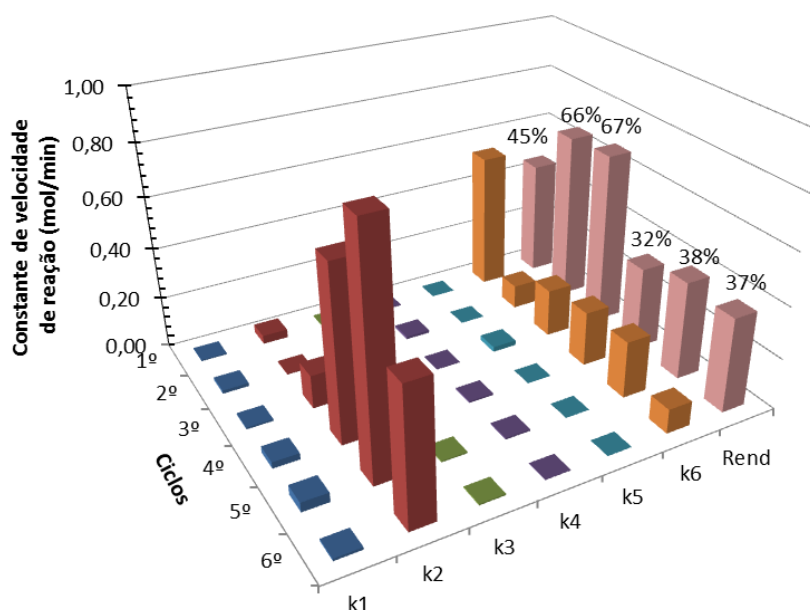


Figura 2: Constantes de velocidade das reações intermediárias da reação global de transesterificação e rendimento final em função dos ciclos de reutilização do biocatalisador

Também o valor da constante de velocidade k_5 da reação de produção de éster, Equação (3), partindo do monoacilglicerol foi menor que a velocidade de reação reversa k_6 em todos os ciclos de reação. Foi interessante identificar que as duas reações descritas são as que envolvem a inversão na polaridade quando o reagente passa a produto. Essa inversão de polaridade ocorre quando o triacilglicerol, um composto com características apolar, é consumido formando o diacilglicerol, composto polar e éster etílico e também quando o monoacilglicerol, um composto polar, é consumido formando o éster etílico, um composto

menos polar e glicerina.

Tal observação, comprovada pelas diferenças nos valores das constantes de velocidade mostra que a resistência à transferência de massa foi decorrente das mudanças de polaridade do meio reacional e que a polaridade da superfície da matriz de imobilização, sílica recoberta com octadecil-tri-metoxi-silano, pode ter contribuído para reduzir esse efeito, já que para a enzima livre, nas mesmas condições de operação, o rendimento alcançado foi de 30 %.

Foi possível observar também, pela análise da Figura (2), que o rendimento de produção de éster aumenta do primeiro até o terceiro ciclo da reutilização da enzima, alcançando rendimento de 67%, depois os rendimentos máximos alcançados não são superiores a 38%. Tal redução no rendimento ocorreu exatamente quando houve aumento nas constates de velocidade reversa de consumo de triacilglicerol e produção de éster, k_2 , ou seja, nos ciclos 4,5 e 6. Esses resultados indicam que as etapas limitantes do processo são decorrentes das limitações difusionais como relatado por Nouredini e Zhu, (1997) e Slinn e Kendall, (2009). Assim, mostrou-se que as etapas que mais são influenciadas por essa limitação são as de consumo de triacilglicerol e produção de éster.

CONCLUSÃO

O modelo fenomenológico desenvolvido ajustou-se bem aos dados experimentais e o valor do R^2 foi sempre menor que 1,2%. As duas reações que causam a inversão na polaridade são as reações limitantes do processo e devido à diferença nos valores das constantes de velocidade mostra que a resistência à transferência de massa está presente nessas etapas. A matriz apolar utilizada na imobilização pode ter contribuído para reduzir o efeito de limitação difusional pois, o rendimento em éster obtido para a enzima imobilizada foi superior ao rendimento obtido pela enzima livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e à CAPES pela bolsa e auxílio financeiro para realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

DANTAS, J.H., PARIS, L.D., BARÃO, C.E., ARROYO, P.A., SOARES, C.M.F., VISENTAINER, J.V., MORAES, F.F., ZANIN, G.M. Influence of alcohol: oil molar ratio on the production of ethyl esters by enzymatic transesterification of canola oil. *African J. Biotechnol.*, 12: 12, 2013.

FEDOSOV, S.N., XU, X. Enzymatic synthesis of biodiesel from fatty acids. Kinetics of the reaction measured by fluorescent response of Nile Red. *Biochem. Eng. J.*, v.56 p.172-183, 2011.

HOLČAPEK, M., JANDERA, P., FISCHER, J., PROKEŠ, B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *J. Chromatogr. A* v. 858, p.13-31, 1999.

JAEGER, K.E., DIJKSTRA, B.W., REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* v.53 p.315-351. 1999.

NOUREDDINI, H., ZHU, D. Kinetics of transesterification of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* V.74 p.1457-1463. 1997.

SLINN, M., KENDALL, K. Developing the reaction kinetics for a biodiesel reactor. *Bio. Technol.* v.100 p.2324-2327. 2009.

YAHYA, A.R.M., ANDERSON, W.A., MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enz. Micro. Technol.* v.23 p.438-450. 1998.

ZHOU, Z., INAYAT, A., SCHWIEGER, W., HARTMANN, M. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. *Microp. Mesop. Materials* v.154 p.133-141. 2012.