

ESTABILIDADE OPERACIONAL DA LIPASE DE *Mucor circinelloides* IMOBILIZADA EM POLIURETANO NA ETANÓLISE DO ÓLEO DE BABAÇU EM REATOR DE LEITO FIXO

G. S. S. ANDRADE¹, A. K. F. CARVALHO² e H. F. DE CASTRO²

¹ Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciência e Tecnologia

² Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena

E-mail para contato: grazielle.andrade@unifal-mg.edu.br

RESUMO – A estabilidade operacional de células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano foi determinada na etanólise contínua do óleo de babaçu em meio contendo terc-butanol como solvente. As etanólises foram conduzidas em reator de leito fixo (volume útil de 310 cm³) empacotado com 27 g do biocatalisador, operando a 35°C e tempo espacial de 4,8 h. O desempenho do sistema foi avaliado utilizando células imobilizadas não tratadas (controle) e tratadas com solução de glutaraldeído (0,1%) e Aliquat® 336 (0,1%). A comparação do desempenho do reator indicou que o biocatalisador tratado com glutaraldeído permitiu manter estável a operação do sistema por 15 dias sem redução relevante da concentração dos ésteres de etila ($55,2 \pm 4,0$ m/m%), correspondendo a rendimentos médios de $67,8 \pm 6,5\%$, revelando um tempo de meia-vida do biocatalisador de 42,8 dias.

1. INTRODUÇÃO

O uso de processos enzimáticos em substituição à catálise química tradicional desponta como uma alternativa adequada para que sejam desenvolvidos processos eficientes de obtenção de produtos de interesse não agressivos do ponto de vista ecológico (Abbaszadeh *et al.*, 2012). Entretanto, muitas aplicações industriais desses biocatalisadores são ainda limitadas pelo seu alto custo de produção e baixa produtividade, pois sendo em sua maioria enzimas extracelulares requer etapas posteriores de separação purificação e imobilização em suporte, por processos complexos para uso prático (Robles-Medina *et al.*, 2009).

Como forma de reduzir estes custos, diversos estudos estão sendo direcionados na utilização de células íntegras de fungos filamentosos como biocatalisadores. Grande parte desses estudos reporta a utilização de células imobilizadas *in situ* em suporte adequado. Esta estratégia tem apresentado resultados promissores empregando diferentes fungos produtores de lipase intracelular para mediar reações de hidrólise, esterificação e principalmente transesterificação de óleos vegetais, visando à obtenção do biodiesel (Fukuda *et al.*, 2009).

Em trabalhos anteriormente desenvolvidos células do fungo *Mucor circinelloides* imobilizadas em poliuretano apresentaram elevado desempenho como biocatalisador na etanólise de óleo de

babaçu (Andrade *et al.*, 2012). Utilizando os dados gerados em reatores agitados operados em regime de batelada, estudos foram conduzidos em regime de fluxo contínuo comparando a estabilidade operacional do sistema imobilizado, mediante a utilização de agentes de ativação (glutaraldeído) e líquido iônico (sal de amônio quaternário de cloreto de amônio-Aliquat® 336), uma fonte versátil e acessível para uma família inteiramente nova de líquidos iônicos hidrofóbicos. Aliquat® 336 tem sido usado com sucesso em diversos segmentos, incluindo como agente modificador da permeabilidade em membranas poliméricas, principalmente latex, PVC e poliuretano ou como aditivo na bioencapsulação de lipase em matrizes sol-gel (Souza *et al.*, 2012).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Os experimentos foram realizados empregando a linhagem do fungo *Mucor circinelloides* URM 4182 adquirida da coleção de culturas da Micoteca URM (CCB/UFPe). Como suporte de imobilização foi utilizado espumas de poliuretano comercial (Scotch-Brite^{MR}) cortadas em cubos de 6 mm, com densidade aparente de $0,02 \pm 0,01 \text{ g/cm}^3$ e diâmetro médio de poros de $0,36 \pm 0,14 \text{ mm}$. O fungo foi cultivado em meio de cultura líquido composto por óleo de oliva (comercial) 30g/L, peptona (Himedia) 70g/L, NaNO_3 (Vetec) 1g/L, KH_2PO_4 (Synth) 1g/L e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec) 0,5g/L, previamente autoclavados ($121^\circ\text{C}/15 \text{ min}$). Como materiais de partida foram utilizados óleo de babaçu refinado (Pulcra Chemicals) e etanol anidro (Cromoline). Terc-butanol (Cromoline) foi utilizado como solvente. As células imobilizadas foram tratadas com glutaraldeído 25% (Cromoline) e cloreto de metiltrioctilamônio (Aliquat 336®, Sigma-Aldrich).

2.2. Metodologia experimental

Em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultura, foram inoculados assepticamente 1×10^6 esporos/mL do fungo, juntamente com 100 cubos de poliuretano. Os frascos foram incubados por 72 h a 30°C sob agitação orbital (170 rpm). A biomassa imobilizada foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, lavada com água e tratada com soluções de glutaraldeído ou Aliquat 336 (0,1% em tampão fosfato pH 7,0) por 1h a 25°C . As células foram recuperadas por filtração a vácuo, lavadas com água e acetona e secas em bomba de alto vácuo. As reações de transesterificação em fluxo contínuo foram realizadas em reator de leito fixo, conforme Figura 1 (diâmetro interno= 45 mm, comprimento = 190 mm e volume total = 310 cm^3), operando numa vazão de 0,13mL/min, por 15 dias. A mistura reacional composta por óleo de babaçu e etanol (razão molar 1:6 óleo/etanol) e terc-butanol como solvente foi mantida a 35°C . A coluna foi empacotada com 27g de células imobilizadas (densidade média de $0,102 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$) correspondendo a um volume útil de 270 cm^3 . O monitoramento do processo foi efetuado pela quantificação dos ésteres de etila formados por cromatografia e da viscosidade dos ésteres purificados.

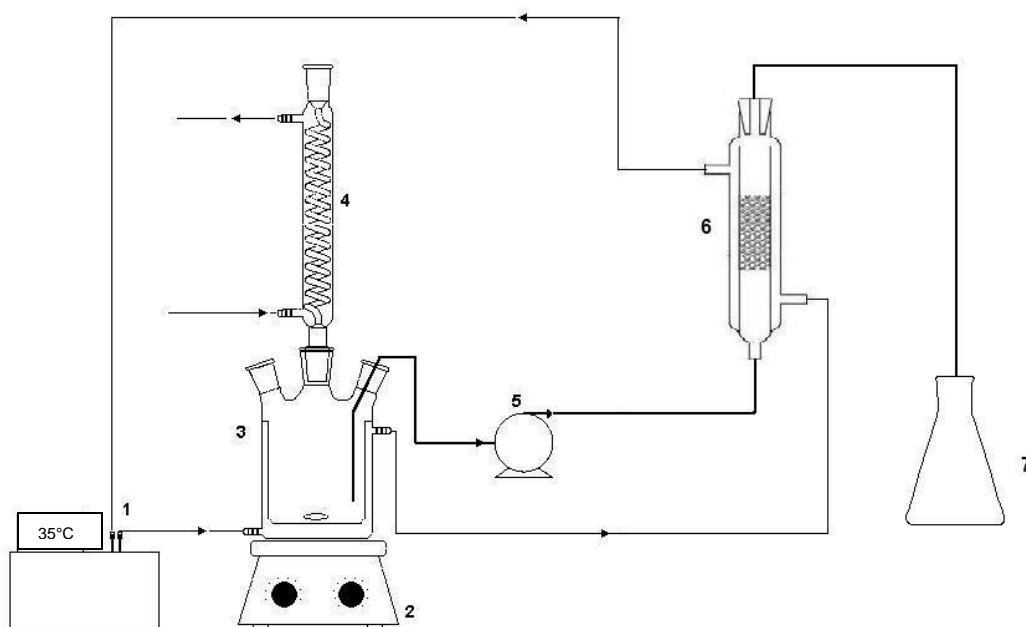


Figura 1. Esquema simplificado do reator de leito fixo. 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Tanque de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo leito fixo, 7- Saída de produto.

2.3. Metodologia analítica

A atividade enzimática das células imobilizadas foi determinada pelo método modificado de hidrólise do azeite de oliva (Andrade *et al.*, 2012). A umidade das células íntegras imobilizadas foi determinada em balança de secagem acoplada a lâmpada de infravermelho (Marte, Modelo ID 50). Os ésteres de etila foram monitorados por cromatografia de fase gasosa (Varian 3800) (Urioste *et al.*, 2008). Os valores da viscosidade absoluta dos produtos purificados foram medidos a 40°C em viscosímetro (Brookfield, Modelo LVDVII) empregando o cone CP 42.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células imobilizadas sem tratamento (controle) apresentaram atividade hidrolítica média de 65,7 U/g. O tratamento com GA não afetou negativamente a atividade catalítica do biocatalisador sendo obtido valor similar da ordem de 63,2 U/g. No entanto, o tratamento com Aliquat® 336 reduziu o valor médio de atividade para 39,2 U/g, indicando uma acentuada desnaturação da lipase intracelular pela ação desse agente hidrofóbico. Esse comportamento não foi observado na imobilização de lipase extracelular, como reportado por Souza *et al.*, 2012.

O comportamento dinâmico da formação dos ésteres de etila nas etanólises do óleo de babaçu em fluxo contínuo, catalisado pelos biocatalisadores tratados e não tratado (controle) nas mesmas condições operacionais mostrado na Figura 2 (a-c) indica diferentes desempenhos em função do

biocatalisador utilizado.

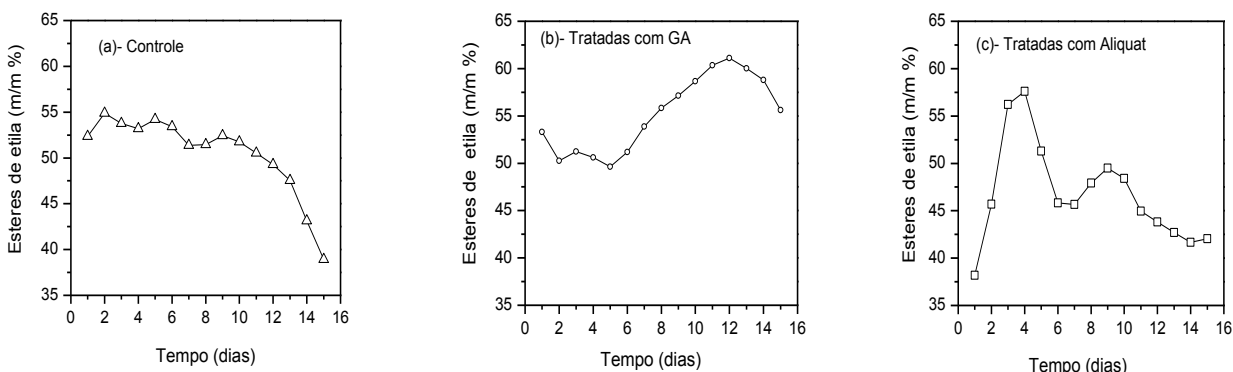


Figura 2 – Concentração total dos ésteres etílicos formados na etanólise do óleo de babaçu catalisado por células de *M. circinelloides* 4182 imobilizadas (a) sem tratamento – reação controle, (b) tratadas com GA e (c) tratadas com Aliquat 336

No sistema controle (Figura 2a) empregando células imobilizadas não tratadas, apesar de ter sido constatado uma estabilidade inicial do reator, a atividade de biocatalisador foi gradativamente reduzida ao longo do tempo resultando num decréscimo da ordem de 40% na concentração de ésteres formados. A concentração média de ésteres foi da ordem de $50,5 \pm 4,4\%$ m/m, correspondendo a rendimento de transesterificação de 67,8% e produto com viscosidade de 9,1 cSt. O emprego das células imobilizadas tratadas com GA (Figura 2b) gerou uma oscilação inicial não diretamente correlacionada com atividade do biocatalisador, seguida da formação crescente dos ésteres de etila. O valor máximo alcançado foi de 61,4% m/m, correspondendo a 75,5% de rendimento e produto com viscosidade de 8,4 cSt. Por outro lado, a utilização das células tratadas com Aliquat® 336 provocou acentuada oscilação na concentração de ésteres formados (Figura 2c) ao longo de todo o período de operação do reator. A concentração de ésteres de etila variou entre 35,2 a 63,8% (rendimentos de 43,3 a 78,5%), com valores de viscosidade entre 13,5 e 8,7cSt, respectivamente.

A partir dos resultados mostrados na Figura 2(a-c) foram determinadas as constantes de desativação (k_d) e o tempo de meia-vida dos biocatalisadores ($t_{1/2}$) pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo de desativação de primeira ordem. Os resultados obtidos são listados na Tabela 1. Dentre os sistemas testados, o tratamento das células imobilizadas com GA demonstrou ser o mais eficiente promovendo uma elevada estabilidade da atividade catalítica do biocatalisador, revelando um tempo de meia-vida de 42,8 dias, cerca de 1,65 vezes superior em relação ao biocatalisador controle.

Tabela 1 –Estabilidade operacional das células de *M. circinelloides* imobilizadas na etanolise do óleo de babaçu operando em fluxo contínuo

Biocatalisador	$k_d (\text{dia}^{-1}) \times 10^3$	$t_{1/2} (\text{dias})$
Controle	26,7	25,9
GA 0,1%	16,2	42,8
Aliquat 0,1%	33,8	20,5

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem a viabilidade técnica de aplicação de células integras de *M. circinelloides* imobilizadas em poliuretano para mediar a síntese enzimática de biodiesel em fluxo contínuo, em função de sua satisfatória estabilidade operacional quando tratadas com glutaraldeído. Esses resultados se comparam favoravelmente com os dados descritos na literatura. O estudo das variáveis que interferem no processo em fluxo contínuo está em fase de desenvolvimento visando alcançar rendimentos similares aos obtidos em regime de batelada.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPEMIG e ao CNPq pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIAS

- ABBASZAADEH, A.; GHOBADIAN, B.; OMIDKHAH, M. R.; NAJAFI, G. Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Convers. Manage.*, 138-148, 2012.
- ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 84, p. 183– 188, 2012.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochem. Eng. J.*, v. 44, p. 2–12, 2009.
- ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, P.A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol. Adv.*, v. 27, p. 398-408, 2009.
- SOUZA, R. L.; RESENDE, W. C. S.; BARÃO, C. E.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, O. A A., et al. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol-gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. *J. Mol. Catal B: Enzym.*, v. 84, p. 152–159, 2012.
- URIOSTE, D.; CASTRO, M. B. A.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. *Quim. Nova*, v. 31, p. 407-412, 2008.