



XXII CONGRESSO  
BRASILEIRO DE  
ENGENHARIA QUÍMICA  
23 a 26 de Setembro de 2018  
Hotel Maksoud Plaza  
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO  
SOBRE O ENSINO DE  
ENGENHARIA QUÍMICA  
27 a 28 de Setembro de 2018  
USP  
São Paulo – SP

# COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO CATALÍTICO A PARTIR DA COMBINAÇÃO DE LIPASES LIVRES E IMOBILIZADAS NA SÍNTERE DE ÉSTERES ETÍLICOS

ARAKI CA<sup>1</sup>, MARCUCCI SMP<sup>1</sup>, MAEDA CH<sup>1</sup>, ARROYO PA<sup>1</sup>, ZANIN GM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: carina.araki@gmail.com

**RESUMO** – *O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso combinado da lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) com a de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) na produção de ésteres etílicos do óleo da polpa da macaúba. Os resultados obtidos por meio das enzimas livres foram comparados àqueles observados para as enzimas imobilizadas. Em ambos os casos, observou-se a sinergia entre os biocatalisadores. O procedimento de imobilização influenciou o desempenho biocatalítico: 77,7 ± 3,2% de rendimento em ésteres foram obtidos com o par de lipases imobilizadas e 67,9±1,3% com o par de livres.*

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a produção enzimática de biodiesel tem atraído atenção dos pesquisadores por apresentar diversas vantagens em relação aos métodos químicos. Exemplos disso são: a possibilidade de conduzir as reações com a quantidade estequiométrica de álcool; de trabalhar em condições amenas de temperatura e pressão; e de empregar matérias-primas com elevado teor de ácidos graxos livres (Poppe *et al.*, 2015).

Nessa técnica, o emprego de mais de um biocatalisador pode viabilizar maiores rendimentos em ésteres comparados àqueles alcançados por uma única lipase. Tal fato pode ocorrer devido às diferenças que essas enzimas apresentam em relação à especificidade pela quebra das ligações ésteres em determinadas posições dos glicerídeos, bem como à especificidade a um tipo específico de ácido graxo (Poppe *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2015).

Outro aspecto da biocatálise é que as enzimas podem ser utilizadas na forma imobilizada, o que permite a recuperação e reutilização do biocatalisador. Para tanto, normalmente, é preciso selecionar um suporte com elevada área específica e tamanho de poros adequado, como pode ser o caso da zeólita ZSM-5 com estrutura hierárquica de poros (Mitchell *et al.*, 2011).



XXII CONGRESSO  
BRASILEIRO DE  
ENGENHARIA QUÍMICA  
23 a 26 de Setembro de 2018  
Hotel Maksoud Plaza  
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO  
SOBRE O ENSINO DE  
ENGENHARIA QUÍMICA  
27 a 28 de Setembro de 2018  
USP  
São Paulo – SP

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do uso combinado da lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) com a de *Thermomyces lanuginosus* (LTL), livres e imobilizadas, na obtenção de ésteres etílicos do óleo de macaúba.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

Lipases de *Thermomyces lanuginosus* ( $\geq 100.000$  U g<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich) e de *Burkholderia cepacia* (Amano Lipase PS,  $\geq 30.000$  U g<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich). Zeólita ZSM-5 com adição de mesoporos (razão Si/Al  $\cong 17$ , OAS) modificada com 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (área específica de 252 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> e distribuição de tamanho de poros centralizada em 12 nm). Óleo da polpa de macaúba (índice de acidez de 60,3  $\pm$  0,1 mg KOH g<sup>-1</sup>, massa molar de 617,7  $\pm$  0,3 g mol<sup>-1</sup>, Montes Claros, MG), etanol (99,9%, Anidrol) e tricosanoato de metila (99%, Sigma-Aldrich)

### 2.2. Procedimento de Imobilização

Foram preparadas soluções enzimáticas, contendo cerca de 10 mg de proteína em 25 mL de tampão fosfato (pH 7,0). Essas soluções foram adicionadas a 1 g de suporte em erlenmeyers de 50 mL. Os frascos foram mantidos em banho Dubnoff com agitação a 25 °C, por 2 horas. Depois, permaneceram por 24 horas a 4 °C. As suspensões foram lavadas com 100 mL de tampão fosfato (pH 7,0), filtradas e secas a vácuo em dessecador (Soares *et al.*, 2004).

### 2.3. Atividade de Hidrólise

Em erlenmeyers de 125 mL, 0,1 g de enzima imobilizada ou 1 mL de solução enzimática foi adicionado a 2 mL de tampão fosfato (pH 7,0) e 5 mL de uma emulsão de goma arábica e azeite de oliva. Os frascos foram mantidos com agitação por 10 minutos a 37°C. As amostras foram tituladas com KOH 0,02 mol L<sup>-1</sup> e indicador fenolftaleína. A atividade específica (U mg<sup>-1</sup>) foi definida como a quantidade de mmol de ácido graxo formado por minuto, por mg de proteína presente no biocatalisador (Soares *et al.*, 2004).

### 2.4. Reações Para Obtenção de Ésteres

Em reatores de vidro encamisado de 30 mL, foram adicionados 10 g de óleo, 2,23 mL de etanol (razão molar de 1 : 3) e 6% (g g<sup>-1</sup>) de biocatalisador em relação à massa de óleo. Os sistemas foram mantidos com agitação magnética, a 45 °C. No caso das misturas de lipases, utilizou-se a razão mássica de LBC : LTL de 1:3. Os produtos reacionais foram analisados por cromatografia a gás. O tricosanoato de metila (C23) foi utilizado como padrão interno para quantificação dos ésteres formados na reação.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Atividade de Hidrólise

Na Tabela 1 pode-se observar que os valores de atividade específica para as lipases

imobilizadas foram menores, pois os procedimentos de imobilização podem provocar mudanças conformacionais nas enzimas para uma forma inativa, bem como ocasionar impedimentos estéricos (Villeneuve *et al.*, 2000).

Tabela 1 – Atividade específica das lipases na reação de hidrólise do azeite de oliva a 37 °C.

Biocatalisador*	Atividade (U mg <sup>-1</sup> )	
	Livre	Imobilizada
LBC	115 ± 2	66 ± 9
LTL	95 ± 2	68 ± 8

\* LTL = lipase de *Thermomyces lanuginosus*; LBC = lipase de *Burkholderia cepacia*.

### 3.2. Reações Para Obtenção de Ésteres

De acordo com a Figura 1a e 1b, em 48 horas, os maiores rendimentos em ésteres foram obtidos com o uso combinado tanto das lipases livres, quanto das imobilizadas.

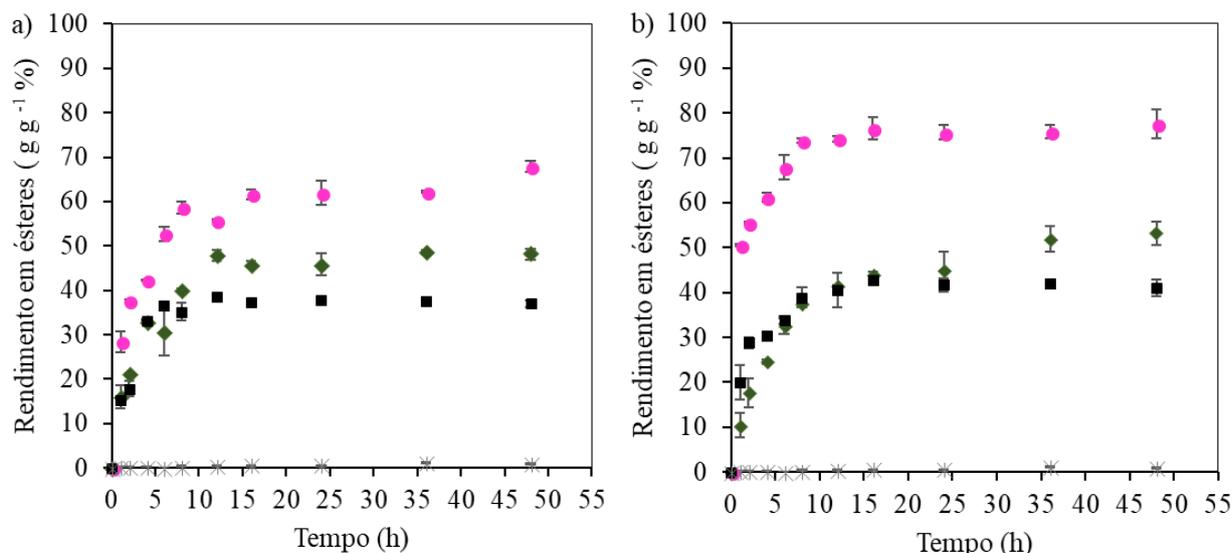


Figura 1 – Rendimentos em ésteres etílicos do óleo de macaúba obtidos por meio do uso individual da LBC (—■—), da LTL (—◆—), da combinação destas (—●—) e sem biocatalisador (—\*—) a) Lipases livres. b) Lipases imobilizadas.

Esses resultados demonstram que houve sinergia entre os biocatalisadores estudados. Tal comportamento pode ocorrer porque a LBC é uma lipase não regioselectiva e a LTL é 1,3-regioselectiva (Su *et al.*, 2015). Ao mesmo tempo, enquanto a TLL é muito ativa em relação à maioria dos grupos acil, independentemente do comprimento da cadeia ou do grau de insaturação, a BCL apresenta alta especificidade em relação ao ácido caprílico e palmítico (Chang *et al.*, 1999; Fernandez-Lafuente *et al.*, 2010; Poppe *et al.*, 2015).



XXII CONGRESSO  
BRASILEIRO DE  
ENGENHARIA QUÍMICA  
23 a 26 de Setembro de 2018  
Hotel Maksoud Plaza  
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO  
SOBRE O ENSINO DE  
ENGENHARIA QUÍMICA  
27 a 28 de Setembro de 2018  
USP  
São Paulo – SP

Ainda pode-se notar a melhora no desempenho catalítico das enzimas após imobilizadas. Isso pode ter ocorrido devido ao processo de imobilização por ligação covalente, pois este pode restringir as mudanças conformacionais das enzimas, proporcionando maior estabilidade à temperatura e à presença de álcoois de cadeia curta em relação às enzimas livres (Salehi *et al.*, 2016).

#### 4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi demonstrado que, nas condições estudadas, o uso da mistura de LBC com LTL proporciona maior rendimento em ésteres do que os obtidos com as lipases utilizadas separadamente. Também ficou evidente que o processo de imobilização utilizado influenciou positivamente o desempenho catalítico das lipases, de modo que foram obtidos rendimentos maiores do que os observados para as enzimas livres.

#### 5. REFERÊNCIAS

CHANG Q L, LEE C H, PARKIN K L, Comparative selectivities of immobilized lipases from *Pseudomonas cepacia* and *Candida antarctica* (fraction B) for esterification reactions with glycerol and glycerol analogues in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* v. 25, p. 290-297, 1999.

FERNANDEZ-LAFUENTE R, Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as na industrial biocatalyst. *J. Mol. Catal. B Enzym.* v. 62, p. 197-212, 2010.

MITCHELL S, PÉREZ-RAMÍREZ J, Mesoporous zeolites as enzyme carriers: Synthesis, characterization, and application in biocatalysis. *Catal. Today*, v.168, p. 28–37, 2011.

POPPE K, MATTE C R, PERALBA M do C R, FERNANDEZ-LAFUENTE R, RODRIGUES R C, AYUB M A Z, Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. *Appl. Catal. A Gen.* v. 490 p. 50-56, 2015.

SALEHI Z, GHAFAROKHI H H, KODADADI A A, RAHIMNIA R, Thiol and urea functionalized magnetic nanoparticles with highly enhanced loading capacity and thermal stability for lipase in transesterification. *J. Ind. Eng. Chem*, v. 35, p. 224–230, 2016.

SOARES C M F, DOS SANTOS O A, OLIVO J E, DE CASTRO H F, DE MORAES F F, ZANIN G M, Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol–gel encapsulated lipase activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 29, p. 69-79, 2004.

SU F, PENG C, LI G L, XU L, YAN Y J, Biodiesel production from woody oil catalyzed by *Candida rugosa* lipase in ionic liquid. *Renew. Energy*, v. 90, p. 329–335, 2016.

VILLENEUVE P, MUDERHWA J M, GRAILLE J, HAAS M J, Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B Enzym.* v. 9, p. 113–148, 2000.