

# SELEÇÃO DO SUPORTE DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Candida rugosa* VISANDO A HIDRÓLISE DO ÓLEO DE GORDURA RESIDUAL NA SÍNTESE DE BIODIESEL POR HIDROESTERIFICAÇÃO

C.M.P.O. EMIDIO<sup>1</sup>, L.K. SANTOS<sup>2</sup>, A. J. SCHWANKE<sup>3</sup>, S. PERGHER<sup>3</sup>, D. L. FLUMIGNAN<sup>2</sup>, A. V. PAULA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista – Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Orgânica - CEMPEQC

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia de Materiais

E-mail para contato: [camile.emidio@gmail.com](mailto:camile.emidio@gmail.com), [ariela@fcfar.unesp.br](mailto:ariela@fcfar.unesp.br)

**RESUMO** – As lipases são enzimas capazes de hidrolisar triacilgliceróis transformando-os em ácidos graxos livres e glicerol, o que possibilita sua aplicação na reação de hidrólise de óleos e gorduras residuais (OGR). O OGR é uma matéria prima para produção do biodiesel que apresenta como vantagens a redução do custo de produção pelo seu baixo valor de mercado e o reaproveitamento de resíduo, contribuindo para um desenvolvimento sustentável. Neste trabalho, objetivou-se a seleção de um imobilizado de lipase de *Candida rugosa* visando-se maximizar a hidrólise do OGR. Foram avaliados diferentes suportes de imobilização (caulim e argila montimorillonita KSF comercial) a partir da metodologias de imobilização em meio aquoso. As reações de hidrólise foram conduzidas na temperatura de 45°C, por 6h, empregando razão água:óleo 3:1 (v/v). As reações foram acompanhadas pelo teor de ácidos graxos livres, calculando-se o grau de hidrólise (%). O imobilizado que apresentou melhor resultado foi o suporte montimorillonita KSF comercial, sua conversão em ácidos graxos em 6 horas alcançou 43,01%. Portanto, a lipase de *Candida rugosa*, imobilizada possui viabilidade para sua aplicação na hidrólise de OGR visando à síntese de biodiesel.

## 1. INTRODUÇÃO

As lipases são denominadas de glicerol ésteres hidrolases e pertencem ao grupo das hidrolases. A partir dessas enzimas os triacilgliceróis sofrem um processo de hidrólise em três etapas, inicialmente são transformados em diacilgliceróis, em seguida a monoacilgliceróis e glicerol em todas as etapas são produzidos ácidos graxos livres (SANTOS, 2015).

Trata-se de um grupo importante de enzimas para aplicações biotecnológicas em diversos setores como de detergentes, têxtil, alimentício, farmacêutico, cosmético, indústrias de papel e biocombustíveis (FERREIRA-DIAS, 2013).

No campo dos biocombustíveis as lipases podem ser aplicadas na hidrólise de óleos vegetais ou gorduras animais para produção do biodiesel. O biodiesel vem se consolidando no mercado mundial como uma alternativa sobre os combustíveis petroquímicos pois possui algumas características vantajosas, tais como, alto número de cetano; baixo conteúdo de enxofre e de compostos aromáticos, maior ponto de fulgor, teor médio de oxigênio, caráter não tóxico e biodegradabilidade, menor emissão de partículas de HPA, CO e CO<sub>2</sub>, além de ser proveniente de fontes renováveis (BAGLEY, 1998; HAAS, 2001; PETERSON, 2002).

O processo de hidroesterificação é a técnica mais atual na produção de biodiesel, consistindo numa reação de hidrólise seguida por uma reação de esterificação. Esse processo possibilita o uso de qualquer matéria-prima graxa, independentemente dos teores de acidez e umidade (SANTOS, 2015).

Com a hidroesterificação, o reaproveitamento do OGR na produção de biodiesel se torna uma possibilidade para redução do custo da matéria-prima diminuindo o valor de mercado e de conscientização sobre a importância da preservação ambiental, pois reaproveita um resíduo e o transforma em uma alternativa energética, contribuindo para um desenvolvimento sustentável menos poluente (COSTA NETO, 2001).

## 2. OBJETIVO

Avaliar a viabilidade de aplicação de lipases inespecíficas, imobilizadas em diferentes suportes, na reação de hidrólise do óleo de gordura residual para a síntese de biodiesel por hidroesterificação.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Matérias Primas: o óleo de gordura residual utilizado no projeto foi cedido pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Campus Matão. As enzimas são lipases *Candida rugosa* (L1754, EC. 3.1.1.3, tipo VII, atividade hidrolítica 3577,46 U/g, teor de proteína 16 % m/m) obtida da Sigma-Aldrich e *Candida antartica* da Novozymes, e os suportes de imobilização foram Caulim e Montimorillonita KSF comercial cedidos pelo Laboratório de Peneiras Moleculares (LABPEMOL) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

### 3.1. Imobilização em meio aquoso

Para imobilização por adsorção física, em meio aquoso, a enzima foi solubilizada em uma solução tamponante de fosfato com pH 7 e 25 Mm. Submeteu-se a solução enzimática numa proporção suporte/enzima de 0,5g/10 ml em um tubo falcon. O tubo permaneceu em agitação por 24 horas em temperatura ambiente. Após as 24 h centrifugou-se a 5000 rpm por 10 min e separou o imobilizado (PAULA, 2012).

### 3.2. Determinação da atividade hidrolítica

A dosagem da atividade enzimática foi realizada através da metodologia descrita por Paula (2012).

### 3.3. Rendimento de imobilização da lipase

O rendimento da imobilização da lipase foi calculado usando a Equação 2 (PAULA, 2012):

$$\eta(\%) = \frac{U \times 100}{U_0} \quad (2)$$

Em que: U = unidades de atividade hidrolítica total no derivado imobilizado, U<sub>0</sub> = unidades de atividade hidrolítica oferecidas para imobilização.

### 3.4. Aplicação dos derivados imobilizados em reações de hidrólise em óleo de gordura residual

Para as reações de hidrólise em óleo de gordura residual, preparou-se uma emulsão de 2,5 g de óleo, 7,5 g solução tampão fosfato pH 7 e 0,075 g de goma arábica com 2,5 % de catalisador em relação a massa total. A mistura foi inserida em um reator de 50 mL, que foi mantido sob agitação moderada, sob temperatura de 45 °C, por 6 horas. A cada duas horas foi retirado uma alíquota de aproximadamente 0,5g da fase orgânica e determinado o teor de ácidos graxos livres e índice de acidez.

### 3.5. Índice de Acidez

Adicionaram-se 10 ml de álcool e duas gotas do indicador fenolftaleína na alíquota retirada da reação de hidrólise do OGR em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Em seguida titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M (SILVA, 2010). A estimativa do índice de acidez em mg de KOH/g de óleo foi calculada segundo a Equação 3.

$$IA = \frac{V * F * 5,61}{P} \quad (3)$$

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação, F = fator da solução de hidróxido de sódio, P = massa da amostra (g)

## 4. RESULTADOS

A lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada por adsorção física em meio aquoso, em dois suportes Montmorillonita KSF Comercial e Caulim. Ambos os derivados imobilizados apresentaram diminuição da atividade hidrolítica, em relação ao valor fornecido pela lipase na forma livre, conforme dados apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Atividade hidrolítica da lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada em diferentes suportes.

Catalisador	Atividade Hidrolítica (U/g)	Rendimento de Imobilização (%)
<i>Candida rugosa</i> livre	3377,46	-
<i>Candida rugosa</i> imobilizada em Caulim	232,9	33,63
<i>Candida rugosa</i> imobilizada em Mont. KFC	96,96	14,01

Analisando os dados da Tabela 1, a lipase de *Candida rugosa* imobilizada que forneceu maior atividade foi imobilizada em suporte o caulim, com rendimento de imobilização de 33,63 %. Segundo os dados encontrados da literatura (PAIVA, 2008), o suporte caulim está sendo considerado para as imobilizações de lipases devido sua afinidade e baixo custo e a argila Montmorillonita a elevada capacidade de troca catiônica e a capacidade de expansão interlamelar.

Todos os sistemas imobilizados foram empregados como catalisadores da reação de hidrólise do óleo de gordura residual apresentando como resultado os teores de acidez (Tabela 2) e comportamento de conversão do óleo em ácidos graxo livres em decorrer do tempo (Gráfico 1).

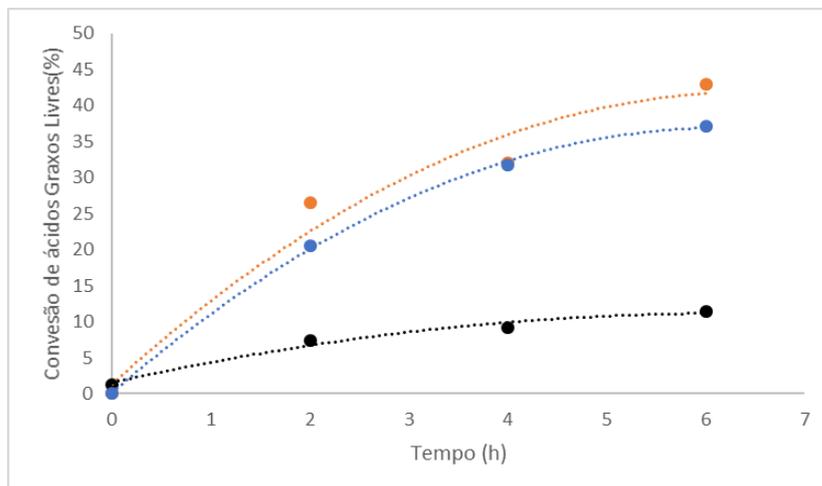
**Tabela 2:** Acidez no meio reacional da hidrólise do OGR ao decorrer do tempo nos imobilizados de *Candida rugosa*.

Catalisador Enzimático	2 horas	4 horas	6 horas
	Acidez mg NaOH/g	Acidez mg NaOH/g	Acidez mg NaOH/g
<i>Candida rugosa</i> - Caulim	40,99	63,29	73,78
<i>Candida rugosa</i> - Mont	52,75	63,72	85,59

A hidrólise do substrato, que nesse caso é o triacilglicerol, ocorre via hidrólise sequencial dos grupos acila do glicerídeo liberando diacilgliceróis, monacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos ocasionando o aumento de acidez no meio durante o decorrer do tempo.

Os resultados revelaram que a conversão máxima em 6 horas obtida empregando caulim e Montmorillonita KSF como suportes, foram 37,3 % e 43,01%, respectivamente. Comparando os imobilizados com a Novozym 435 – *Candida antártica* imobilizada - enzima com 8000 U/g de atividade hidrolítica, pode-se observar que a enzima *Novozym 435* forneceu um valor de hidrólise muito menor que a *Candida rugosa*, isso pode ser decorrente de ser uma enzima 1-3-específica. Segundo os dados encontrados por Talukder et al. (2010) a lipase *Candida rugosa* hidrolisou 99% do óleo residual após 10 h de reação. O reuso dos imobilizados não foi realizado no presente trabalho, porém está previsto nas próximas etapas da pesquisa.

Gráfico 1: Conversão do OGR em ácidos graxos livres dos imobilizados de *Candida rugosa* em caulim e Montimorillonita KFC da enzima *Novozym 435*



Legenda: O ícone ● representa o suporte caulim e ● o suporte Montimorillonita KFC e o ● Novozym 435.

## 5. CONCLUSÃO

A partir deste estudo, observamos a viabilidade da aplicação da enzima *Candida rugosa* na hidrólise do óleo de gordura devido sua conversão de 43,01 % em 6 horas dado que corrobora a literatura já existente e possibilita sua aplicação na síntese de biodiesel por hidroesterificação.

## 6. REFERÊNCIAS

BAGLEY, S. T.; GRATZ, L. D.; JOHNSON, J. H.; MCDONALD, J. F.; Effects of an oxidation catalytic converter and a biodiesel fuel on the chemical, mutagenic, and particle size characteristics of emissions from a diesel engine Environ. Sci. Technol. 1998, 32, 1183

COSTA NETO, P. R. Obtenção de lipídeos estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa. 2001, 185p.

FERREIRA-DIAS, S.; SANDOVAL, G.; PLOU, F.; VALERO, F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. Eletronic Journal of Biotechnology, v. 17, nº 3, p. 1-38, 2013.

GOMES, F. M. et al. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. Quím. Nova, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 710-718, July 2006

HAAS, M. J.; SCOTT, K. M.; ALLEMAN, T. L.; MCCORMICK, R. L.; Energy Fuels 2001, 15, 1207

PAIVA, L. B. de; MORALES, A. R.; DIAZ, F. R. V.. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. *Cerâmica*, São Paulo, v. 54, n. 330, p. 213-226, June 2008

PAULA, A. V. Reestruturação da gordura de leite por Interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais. 2011. 212 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.

PETERSON, C. L.; COOK, J. L.; THOMPSON, J. C.; TABERSKI, J. S.; Continuous flow biodiesel production *Appl. Eng. Agric.* 2002, 18, 5.

SANTOS, L.K., et al.; Estado da arte da aplicação do processo de hidroesterificação na produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixa qualidade. *Principia*, [s.l.], v. 1, n. 28, p.178-190, 31 dez. 2015. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba.

SILVA, G. S. Imobilização de lipase em matriz polimérica para produção de bioaroma. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP, 2010.

TALUKDER M. M. R., WU J. C., FEN N. M., MELISSA Y. L. S., “Two-step lipase catalysis for production of biodiesel,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 49, no. 2, pp. 207–212, 2010.