



Transesterificação Enzimática de Óleo de Girassol.

Kennedy Costa da Conceição^{1,2}; Rachel Freire Boaventura^{1,2}; Micael Nunes Melo^{1,2}; Silvana Mattedi³; Álvaro Silva Lima^{1,2}; Cleide Mara Faria Soares^{1,2}; Laiza Canielas Krause^{1,2}; Alini Tinoco Fricks^{1,2}

¹ Universidade Tiradentes - Kennedycosta16@hotmail.com - rachelfreire7@hotmail.com - micaelcedro@hotmail.com

² Instituto de Tecnologia e Pesquisa - cleide_mara@itp.org.br - alini_tinoco@itp.org.br - aslima2001@yahoo.com.br - laiza_canielas@hotmail.com

³ Universidade Federal da Bahia - silvana@ufba.br

RESUMO

Uma das tendências mais prementes da indústria é a utilização de enzimas imobilizadas a fim de torná-las térmica e operacionalmente estáveis. Diversos processos de imobilização de enzimas são utilizados, dentre eles destacam-se o encapsulamento pela técnica sol-gel, a adsorção física e a ligação covalente. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi aplicar a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada por ligação covalente em suporte de sílica preparado pela técnica sol-gel na presença de líquido iônico prótico hidrofóbico (C4 -butirato de N-metilmonoetanolamônio) na transesterificação de óleo de girassol visando a produção de ésteres etílicos. Todas as reações foram conduzidas com 60U de enzima/ 1,5g de óleo e à 40 °C. As variáveis estudadas foram: razão molar óleo:álcool (1:3 – 1:6), adição de água ao meio reacional (0-4 % (m/m)) e percentual de terc-butanol (0-40 % (v/v)) e foi avaliada a cinética de reação no intervalo de 0 a 48 horas. A condição que propiciou o maior rendimento em ésteres etílicos foi: razão molar óleo:etanol 1:3, adição de 0,5 % de água ao meio reacional e presença de terc-butanol (10 %), fornecendo 50 % de conversão. Na melhor condição, após 48 h de reação, a conversão a ésteres etílicos foi de 70 % e verificou-se que o sistema permaneceu em estado estacionário até 6 h de reação com conversão de 39 %. A lipase LTL imobilizada por ligação covalente em suporte preparado na presença de líquido iônico hidrofóbico mostrou-se altamente promissora como catalisador na transesterificação de óleo de girassol com vistas à produção de biodiesel.

Palavras-chave: Ésteres etílicos, Imobilização, Lipase de *Thermomyces Lanuginosus*.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas atuam como catalisadores biológicos acelerando as reações químicas das células vivas (TORTORA *et al.*, 2005). A estrutura complexa das enzimas possibilita à mesma características vantajosas como um alto grau de especificidade (BORZANI *et al.*, 2001). Segundo Raita *et al.* (2010) a síntese biocatalítica é uma abordagem promissora e ambientalmente amigável

em comparação com as reações químicas catalisadas convencionalmente.

As enzimas, como toda proteína natural, são constituídas de uma ou mais cadeias de aminoácidos ligados covalentemente por meio de ligações peptídicas. A composição dos aminoácidos e a sequência destes na cadeia são características particulares de cada enzima, sendo que, induz uma conformação tridimensional própria,



essencial à atividade catalítica. Esta atividade é exercida pelo sítio ativo, que pode ser definido como a parte da estrutura da enzima que atua em contato direto com a substância (substrato) a ser transformada (FABER, 1997).

Dentre as enzimas, as lipases são as mais amplamente utilizadas em síntese orgânica devido a fatores como a disponibilidade de grande número de preparações comerciais, ampla especificidade e estabilidade relativamente melhor em meios contendo solventes orgânicos (em comparação com outras enzimas) (KAPOOR e GUPTA, 2012).

Lipases catalisam com grande eficiência a alcoólise de óleos vegetais e constitui, portanto uma alternativa limpa para a produção biodiesel, tradicionalmente obtido por catálise básica que leva à obtenção de produtos com menor grau de pureza, dificuldade na utilização de etanol no meio reacional, principalmente o etanol hidratado, e impossibilidade de reutilização do catalisador.

A transesterificação enzimática utilizando lipases tem potencial para superar os problemas da catálise alcalina. Enzimas não formam sabões e podem esterificar os ácidos graxos livre, o glicerol pode ser facilmente recuperado sem tratamento complexo, o consumo de energia no processo é mais baixo, há uma drástica redução na quantidade de efluentes e as enzimas podem ser reutilizadas (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

Apesar das vantagens incontestáveis da utilização de lipases como catalisadores na indústria, sua aplicação prática esbarra em alguns obstáculos, destacando-se a intolerância a solventes orgânicos (cruciais para a solubilização de muitos substratos), baixa estabilidade térmica, custos com purificação e, especificamente na produção de biodiesel, a lenta cinética da reação. Uma estratégia para contornar

estes inconvenientes e conferir estabilidade térmica e a solventes e reduzir os custos com o biocatalisador é a imobilização de lipases, o que torna viável a recuperação do biocatalisador, permitindo o seu reuso, e o desenvolvimento de processos que operem continuamente.

Uma etapa importante para a obtenção destes biocatalisadores imobilizados é a seleção do suporte e métodos de imobilização que permitam obter biocatalisadores ativos e com elevada estabilidade térmica (MENDES et al, 2008).

A fim de obter biocatalisadores imobilizados com maiores atividade e estabilidade, a literatura relata o uso de aditivos no processo de imobilização com intuito de proteger a enzima, evitar a inativação, reter a camada de água ao redor do biocatalisador e maximizar os efeitos dispersantes das moléculas da enzima e facilitadores de transporte de massa, podendo ele estar presente ou ausente no meio de dispersão (KATO et al., 2011; SOARES et al., 2005; HARA et al., 2010). Diferentes tipos de aditivos são utilizados nas técnicas de imobilização, como por exemplo: albumina, ciclodextrina, polietilenoglicol (PEG) e líquidos iônicos (LI) com diferentes famílias de cátions e ânions (VILLENEUVE et al., 2000; SOARES et al., 2004 e 2005; HARA et al., 2010; LEE et al., 2007). Os trabalhos publicados relativos à utilização de LI em processos de imobilização, em sua maioria, relatam rendimento de imobilização acima de 100 % (LEE et al., 2007).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi imobilizar a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) pelo método sol-gel na presença de LIPs por ligação covalente e verificar o potencial de aplicação do biocatalisador obtido na produção de ésteres etílicos de óleo de girassol, trazendo assim uma alternativa aos problemas referentes à utilização de



catalisadores químicos na obtenção de biodiesel.

2. METODOLOGIA

2.1 Síntese da sílica obtida pela sol-gel.

As matrizes para imobilização da enzima foram preparadas empregando a metodologia anteriormente estabelecida por Soares et al. (2005) com algumas modificações conforme descrito a seguir: à solução etanólica, TEOS dissolvido em álcool etílico absoluto em atmosfera inerte de nitrogênio, foi lentamente adicionado ácido clorídrico dissolvido em água ultra pura (solução pré-hidrolisante). A temperatura foi mantida a 35 °C e sob agitação, durante 90 minutos. A etapa seguinte foi a adição da enzima e solução hidrolisante, por fim a obtenção da enzima imobilizada pelo método de encapsulamento (EN-C4).

2.2 Imobilização em Matrizes Hidrofóbicas contendo lipase encapsulada por Ligação Covalente (LC).

À enzima encapsulada na presença de LI C4 (EN-C4) foi adicionada uma sobrecarga de lipase LTL pela técnica de ligação covalente. O procedimento de ativação do suporte foi similar ao descrito por Soares *et al.* (1999). A ativação do suporte consistiu primeiramente em envolver o suporte por completo com glutaraldeído 2,5 % preparado em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH=7,0) sob vácuo por 10 min. Em seguida, o vácuo foi interrompido e o material transferido para um béquer, no qual adicionou-se 4,6 mL de solução de glutaraldeído por grama de EN-C4. A reação foi processada à temperatura ambiente durante uma hora. Posteriormente, o suporte ativado foi transferido para um funil de Buckner, lavado com água para eliminação do

excesso de glutaraldeído e mantido sob vácuo por 30 min para posterior adição de 35 mL de heptano sob agitação de 10 min. Posteriormente procedeu-se à etapa da imobilização, após esse período uma solução contendo LTL livre preparada em água Milli-Q (0,3 g de enzima (261,9 U)/10 mL de água) foi adicionada e mantida sob agitação por um período de 3 h. Após esse período, o mesmo foi conservado à 4 °C durante 24 h. Na sequência procedeu filtração à vácuo do biocatalisador, lavagem com heptano, e 1 h sob vácuo. LTL imobilizada obtida por sobrecarga de enzima por ligação covalente foi designada por LC. A partir dessa etapa segue-se com a avaliação da atividade da enzima por meio de hidrólise utilizando-se o método descrito por Soares et al. (1999). A estabilidade operacional do imobilizado foi também determinada por hidrólise de azeite de oliva em regime de bateladas consecutivas. O número de ciclos foi processado até que a atividade inicial fosse reduzida em pelo menos 50 %.

2.2 Reação de Transesterificação Enzimática de Óleo de Girassol.

As lipases imobilizadas em LC foram utilizadas como catalisadores em reações de transesterificação de óleo de girassol. As reações foram conduzidas em frascos hermeticamente fechados imersos em banho termostatzado com agitação a 150 rpm empregando-se etanol e óleo de girassol (1,5 g, 1,7 mmol) como fonte de triglicerídeos. Foi investigada a melhor condição para transesterificação com 12 h de reação e biocatalisador imobilizado em quantidade suficiente para fornecer 60 U/g de óleo. As variáveis estudadas foram: razão molar óleo:etanol (1:3 a 1:12), adição água (0 a 4 % (m/m) com respeito à massa de óleo, adição de co-solvente (5 a 40% (v/v)) e na melhor condição, a cinética de reação (3 a 48 h).

Ao final da reação a mistura foi centrifugada por 2 minutos para



separação da enzima. As amostras foram lavadas por 3 vezes com solução saturada de NaCl para remoção do glicerol formado. Os ésteres etílicos de ambas as fases (aquosa e orgânica) foram extraídas com hexano. A fase orgânica foi tratada com Na₂SO₄ anidro. Após a evaporação do solvente a quantificação dos ésteres foi realizada por cromatografia gasosa (CG) conforme norma EN14103.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da sobrecarga nos biocatalisadores imobilizados.

A sobrecarga de LTL sobre o método de imobilização por ligação covalente (LC) resulta em efeitos distintos na área superficial quando o processo se dá por encapsulamento. Observa-se na Tabela 3 uma maior área superficial para LC (63 m²/g), provavelmente devido a presença das moléculas de glutaraldeído para a formação do “braço espaçador” que permitem a ligação das moléculas de lipase, o que constitui uma justificativa para maior área superficial em LC. E ainda associando-se a análise da área superficial à estabilidade operacional, verificou-se que o biocatalisador imobilizado com maior estabilidade operacional foi o obtido pelo método de ligação covalente.

Tabela 3: Área superficial do suporte preparado com o precursor TEOS e LTL imobilizada.

BI	Ciclos	Área superficial (m ² /g)
EN	10	13
LC	16	63

3.3 Produção de Biodiesel

A partir da seleção do melhor método de imobilização da LTL foi realizada a produção de ésteres etílicos por via enzimática. O biocatalisador imobilizado selecionado foi LTL imobilizado por LC em sílica.

3.3.1 Variação da razão molar óleo: álcool.

Como LC apresentou maior potencial de aplicação para a produção de ésteres etílicos estudou-se o efeito das variáveis razão molar óleo:etanol e adição de água ao meio reacional na transesterificação. A maior conversão foi obtida na razão molar óleo:etanol 1:3 (35 %) (tabela 4). A proporção óleo:álcool é conhecida por afetar a velocidade de reação e o excesso de álcool pode levar à desnaturação da enzima (ANTCZAK *et al*, 2009). Menores conversões em ésteres etílicos podem ser consequência do aumento concentração de etanol em sistemas enzimáticos. Em catálise química o álcool em excesso a partir da razão molar estequiométrica óleo:etanol é considerado necessário para assegurar as taxas de reação mais elevadas, mas, devido à sua baixa solubilidade em triglicéridos, o etanol não dissolvido também pode inibir a etanolise enzimática em maiores razões molares óleo:etanol (NOGUEIRA *et al*, 2010).

Além disso, trabalhos na literatura apontam que altas quantidades de álcool tendem a diminuir a polaridade do meio inativando a enzima por remoção da água estrutural da enzima (NOURENDDINI *et al.*, 2005; SALIS, *et al.*, 2005).



Tabela 4: Efeito da razão molar na conversão à ésteres etílicos utilizando LTL imobilizada por LC.

Razão molar óleo:etanol	Conversão a ésteres etílicos (%)
1:3	34,6
1:4	2,25
1:6	0
1:9	0
1:12	0

3.3.2 Adição de água ao meio reacional

A água no meio reacional é conhecida por influenciar fortemente a velocidade de transesterificação de óleos vegetais (KAIEDA *et al.*, 2001). Neste estudo quantidades conhecidas de água (0-4%) foram adicionados ao sistema a fim de determinar a melhor quantidade de água a ser adicionado ao sistema. A conversão a ésteres etílicos foi aumentada para 49 % com a adição de 0,5 % de água ao meio reacional utilizando razão molar óleo:etanol 1:3, 40 °C e 12 h de reação. (Figura 3).

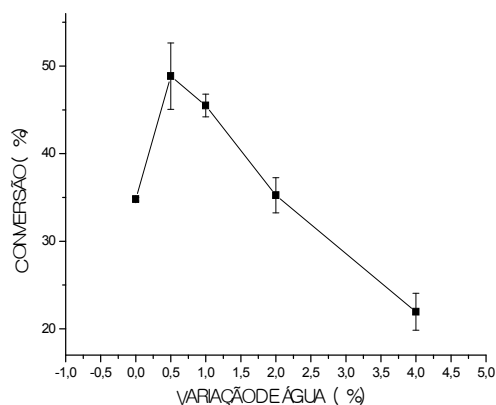


Figura 3: Conversão de ésteres etílicos catalisada por lipase a 40°C: variação da quantidade de água adicionada ao sistema reacional. Razão molar 1:3.

A presença de água favorece a abertura da chamada “tampa” composta

pela tríade catalítica que compõe o sítio ativo, o que possibilita a ativação da lipase na interface óleo/água, viabilizando a reação, ou seja, a água atua na manutenção da conformação ativa da enzima, entretanto, o aumento da adição de água pode estimular a reação de hidrólise do substrato, competindo com a reação de transesterificação e minimizando consideravelmente sua atividade (NOUREDDINI *et al.*, 2005).

3.3.3 Adição de Terc-butanol como co-solvente ao meio reacional.

Nas melhores condições reacionais, avaliou-se o efeito da presença de terc-butanol ao sistema. Valores similares de 5 - 40 % (v/v). O perfil de conversão de ésteres pode ser observado na figura 4. As conversões máximas dos ésteres etílicos na ausência e presença de terc-butanol foram similares, cerca de 49 e de 53,5 %, respectivamente. A adição de maiores concentrações de co-solventes implica em decréscimo do rendimento à ésteres, possivelmente devido a influência negativa da inativação causada pelo excesso do co-solvente, e também por se reduzir a sua atuação catalítica das células integras imobilizadas. (ANDRADE G.S.S, 2012).

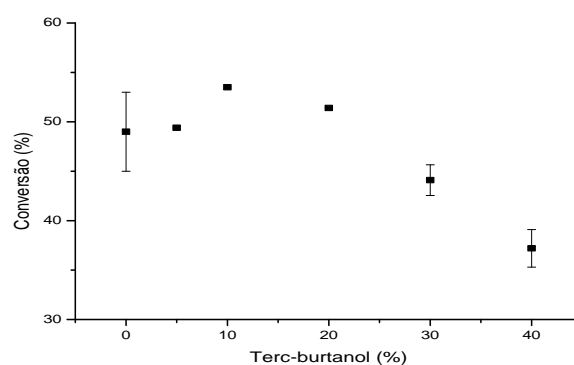


Figura 4: Conversão de ésteres etílicos catalisada por lipase em função da variação da concentração de co-solvente. Razão molar óleo:etanol 1:3, 0,5% de água, 40°C.



3.4 Cinética de reação

Neste estudo adotou-se a melhor condição experimental. O rendimento em ésteres etílicos foi monitorado de 3 a 48 horas. O perfil cinético de conversão a ésteres pode ser observado na figura 5 com máxima conversão de cerca de 70 % após 48 h de reação.

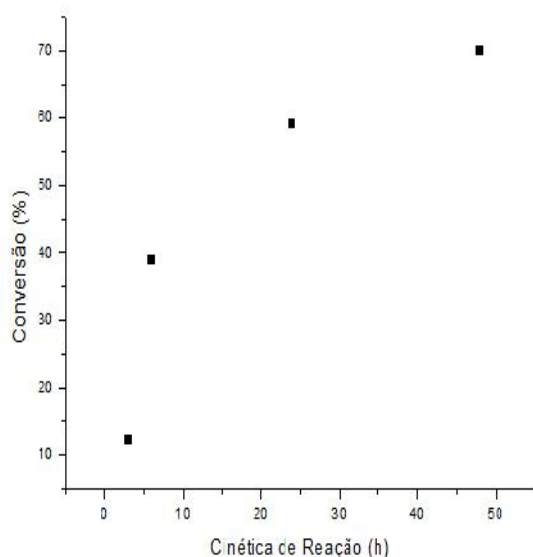


Figura 5: Cinética de conversão a ésteres etílicos à 40 °C utilizando lipase imobilizada por LC: razão molar óleo:etanol 1:3, 0,5% de adição em água, 10 % de co-solvente.

4. CONCLUSÕES

Dentre as variáveis estudadas a razão molar (1:3), adição de água (0,5 %), presença de co-solvente (10 %) e temperatura de 40 °C foi considerada ótima para síntese de ésteres etílicos de óleo de girassol catalisada por lipase LTL imobilizada em suporte preparado na presença de líquido iônico (butirato de *N*-metilmonoetanolamônio). Obteve-se até o momento 70 % de ésteres etílicos após 48 h de reação. Estudos adicionais estão em andamento com intuito de alcançar 100 % de rendimento em ésteres etílicos por esta via biotecnológica.

5. AGRADECIMENTOS

Capes, CNPq, FAPITEC-SE.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, G.S.S.; **Tese De Doutorado em biotecnologia Industrial: produção de Biodiesel a partir de oleos vegetais usando células íntegras co elevada atividade lipolítica (glicerol éster hidrolase E.C. 3. 1. 1.3) imobilizadas**, 2012.

ANTCZAK, M. S. ; KUBIAK, A. ; ANTCZAK, T. ; BIELECKI, S. **Enzymatic biodiesel synthesis- key factors affecting efficiency of the process. Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia industrial Volume I**. 1 ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: A Textbook**. 3. ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, Cap. 1, 2, 3, 1997.

HARA, P.; MIKKOLAB, J.P.; MURZINB, D.Y.; KANERVA, L.T. **Supported ionic liquids in Burkholderia cepacia lipase-catalyzed asymmetric acylation. J.Mol Catal B-Enzym**. v.21, n.12, p.1-6, 2010.

FJERBAEK, L. CHRISTENSEN, K. V., NORDDA, H. L.B. **A review of current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1313, 2009.

KAIEDA, M., SAMUKAWA, T., KONDO, A., FUKUDA, A. H. **Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free**



system. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 91, p. 12-15, 2001.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. **Lipase promiscuity and its biochemical applications. Process Biochemistry** (47) 555–569, 2012.

KATO, K.; NAKAGAKI, S.; NISHIDA, M.; HIRAO, K. **Enzyme encapsulation in silica particles prepared using enzyme-assisted sol-gel reactions in ionic liquids. J Ceram JPN.**, v. 119, n. 2, p. 140-143, 2011.

LEE, S.H., DOAN, N. T. T., HA, S. H., KOO, Y.M. **Using ionic liquids to stabilize lipase within sol-gel derived silica. Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic** V.45, P. 57-61, 2007a.

MENDES, A.A., RODRIGUES, D.S., FERNANDEZ-LAFUENTE, M. F. R., GUIBAN, J. M., PALOMO, J. M. **Regioselective monohydrolysis of per-o-acetylated-1-substituted - glucopyranosides catalysed by immobilized lipases. Tetrahedron**, v. 64, p. 10721-10727, 2008.

NOURENDINI, H; GAO, X e PHILKANA, R.S. **Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. Bioresource Technology**.v.96, p769-777, 2005.

RAITA, M.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOJANA, N. **Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in tert-butanol system. Process Biochemistry** (45) 829–834, 2010.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M. e SOLINAS, V. **Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. Journal of Biotechnology**. V. 119, p. 291-299, 2005.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. **Characterization and utilization of Candida rugosa lipase immobilized on controlled pore sílica. Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, (2), p. 745-757, 1999.

SOARES, C. M. F.; SANTOS, J. E. ; OLIVO, J. E.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. **Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity. Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic**. V. 29, p. 69-79, 2004.

SOARES, C.M.F.; DE CASTRO, H.F.; ITAKO, J.E.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M., **Characterization of sol-gel bioencapsulates for hydrolysis and synthesis. Applied Biochemistry Biotechnology**., v. 121, n. 121, p. 845-859, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia. Tradução atual por Roberta Marchiori Martins**. 8ª Ed, Porto Alegre: Artmed, 2005.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HOSS, M. J. **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, Journal of .Molecular Catalysis B-Enzymatic**. v. 9, p. 113-148, 2000.