

## Área: Engenharia de Alimentos

# TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM MEIO ORGÂNICO CATALISADA POR EXTRATO LIPOLÍTICO MICROBIANO DE *Penicillium crustosum* E *Sporidiobolus pararoseus*

Lenir I. R. Ferraz\*, Gêssica Possebom\*, Nádia Ligianara D. Nyari\*, Aline M. Moreira\*,  
Ilizandra A. Fernandes\*, Natália Paroul\*, Débora de Oliveira\*\* e Helen Treichel\*\*\*

\*Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões- Erechim, RS.

\*\*Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Alimentos.

\*\*\* Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.

\*E-mail: [lenir.r.ferraz@ibest.com.br](mailto:lenir.r.ferraz@ibest.com.br)

**RESUMO** – Os extratos enzimáticos de *Penicillium crustosum* e de *Sporidiobolus pararoseus* produzidos no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos-URI-Campus Erechim, foram testados em quatro diferentes formas de apresentação: Extrato enzimático bruto (EEB), extrato enzimático precipitado (EEP), extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI) e extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI). Os diferentes extratos foram investigados quanto à capacidade de catalisar a síntese de biodiesel em meio orgânico. A natureza e formas de apresentação da enzima afetaram as taxas de conversão obtidas. Os melhores resultados obtidos foram de 4,68%, obtida com o extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI) de *Penicillium crustosum*, seguida de 3,86%, obtida com extrato enzimático bruto (EEB) do mesmo micro-organismo. Resultados estes, que se encontram de acordo com alguns trabalhos encontrados na literatura, quando utilizado os mesmos substratos e extratos enzimáticos não comerciais.

**Palavras-chave:** Transesterificação, micro-organismo, catalise.

## 1 INTRODUÇÃO

Grande parte das enzimas são moléculas de proteínas complexas que agem como catalisadores em reações bioquímicas. Elas são formadas por células de todos os seres vivos. Estes catalisadores biológicos são extremamente eficientes e muito específicos nas suas funções, desta forma, o uso de enzimas para novas aplicações industriais vem crescendo muito nos últimos tempos, vindo de encontro ao apelo da diminuição a agressões ambientais.

Enzimas lipolíticas, como lipases e esterases, constituem um importante grupo de enzimas associadas com o metabolismo de degradação de lipídios. Os micro-organismos produtores de lipase podem ser encontrados no solo e em diversos resíduos oleosos. Os aspectos biológicos, fisiológicos e de aplicação industrial das lipases vêm sendo bastante estudados devido à sua ação sobre substratos insolúveis em água (TREICHEL *et al.*, 2010).

O potencial de aplicações industriais dessas enzimas abrange, além da indústria de alimentos, como aditivos (modificação de aromas), a química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêutica e a área médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos) (KAPOOR *et al.*, 2012). O uso de lipases não comerciais, obtidas a partir de matérias-primas renováveis e de baixo custo, podem ser relevantes para o desenvolvimento de processos utilizando enzimas como catalisadores, que sejam economicamente viáveis (SALIHU *et al.*, 2012; TREICHEL *et al.*, 2010). Com a finalidade de aproveitar o potencial catalítico das enzimas, e reunir as vantagens dessas proteínas sobre os catalisadores químicos, tem-se estudado formas de torná-las insolúveis ao meio reacional.

A transesterificação ou alcoólise é uma reação onde os substratos são um álcool de cadeia curta, geralmente, metanol ou etanol e triglicerídeos provenientes do óleo ou da gordura. Os produtos obtidos são alquil ésteres de ácidos graxos, ou seja, o biodiesel e o subproduto é o glicerol, o qual é comercializado em diversos setores industriais. Usualmente, a reação é catalisada com a finalidade de aumentar sua velocidade e rendimento, sendo os catalisadores empregados, álcalis, ácidos ou enzimas, de acordo com as características da matéria-prima (MA; HANNA, 1999). Com relação ao álcool, o etanol apresenta-se como o substrato alcoólico mais adequado para produção de biodiesel no contexto brasileiro, uma vez que, o país possui autossuficiência em sua produção e este é totalmente renovável, sendo usualmente obtido da fermentação da cana de açúcar.

A metodologia comercial de obtenção de biodiesel utiliza frequentemente catalisadores alcalinos para a transesterificação de óleos ou gorduras. Entretanto, esta metodologia requer alto gasto energético, apresenta dificuldade na recuperação do catalisador e do glicerol e alta poluição ambiental devido ao efluente que gera, o qual deve passar por etapas de separação, purificação e tratamento, tornando o processo oneroso e impulsionando a pesquisa na busca de técnicas alternativas (FJERBAEK *et al.*, 2009).

Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar os concentrados lipolíticos de *Penicillium crustosum* e de *Sporidiobolus pararoseus*, em diferentes formas de apresentação, para aplicação como catalisadores na transesterificação enzimática em meio orgânico para produção de biodiesel.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As fontes de lipases utilizadas nos testes foram os respectivos micro-organismos: fungo filamentoso *Penicillium crustosum* e a levedura *Sporidiobolus pararoseus*. As lipases foram produzidas em escala laboratorial, por fermentação em estado sólido, utilizando farelo de soja como substrato e seguiram procedimento padrão descrito por VARGAS *et al.*, (2008) e FERRAZ *et al.*, (2012) para o fungo filamentoso e a levedura, respectivamente. Assim também ocorreu para o preparo das enzimas, quanto aos processos de

concentração com sulfato de amônio e imobilização em alginato de sódio com carvão ativado. As enzimas foram obtidas nas diferentes formas de apresentação: extrato enzimático bruto (EEB), extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI), extrato enzimático precipitado (EEP) e extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI).

#### *Imobilização dos extratos lipolíticos:*

Para a imobilização em alginato de sódio e carvão ativado, adicionou-se em 16,5 g de água destilada, 0,75 g de alginato de sódio, 12,5g de sacarose, 3 mL de solução enzimática, 5 mL de glutaraldeído e 0,75 g de carvão ativado, após 24 horas em geladeira, as esferas foram lavadas com água destilada e tampão acetato 0,1 M pH 4,8 para medida de atividade.

#### *Dosagem da atividade de esterificação:*

A atividade de esterificação foi determinada através da reação de síntese do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1). Aliquotas de 500 $\mu$ L foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionando a cada alíquota 15mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v). A quantidade de ácido consumido foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05M até pH 11.

#### *Esterificação enzimática:*

Esta etapa foi realizada preparando-se a mistura reacional formadas por óleo comercial SOYA e etanol (com 40 mL de n-hexano). Razão molar foi mantida 3:1 com excesso de álcool em todas as reações. Após dissolução completa dos substratos, os concentrados lipolíticos livres e imobilizados (10% p/p) foram adicionados. As reações foram conduzidas em *shaker* com agitação constante de 150 rpm e temperatura de 40°C.

#### *Conversão das Reações:*

A quantificação dos ésteres foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar modelo RT-WAX de 30m de comprimento, diâmetro interno de 0,25mm e com a seguinte programação: temperatura inicial da coluna de 40°C (8 min.), 40-220 °C (7°C/min), 220- 250°C (10°C/min), 250°C (10 min.), temperatura do injetor 250 °C, detector a 275 °C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste H<sub>2</sub>(56 kPa). As amostras foram diluídas em n-hexano (1:10). A conversão das reações foi determinada acompanhando a redução da área do pico do agente limitante.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A partir dos resultados da Tabela 1, pode-se observar que a maior conversão em biodiesel foi de 4,68%, obtida com o extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI) de *Penicillium crustosum*, seguida de 3,86%, obtida com EEB. Resultados estes, encontram-se de acordo com alguns trabalhos encontrados na literatura, quando utilizado os mesmos substratos e extratos enzimáticos não comerciais.

SILVA *et al.*, (2007) sugerem que razões molares mais altas de óleo: álcool podem resultar em uma reação de transesterificação mais eficiente, devido talvez ao aumento da área de contato entre o álcool e os triglicerídeos. ZENEVICZ, (2011), avaliando a produção de ésteres etílicos, utilizando diferentes lipases como catalisadores em diferentes formas de obtenção, em meio orgânico utilizando a lipase comercial Novozym 435 imobilizada, como catalisador, obteve 22,3% de conversão em biodiesel.

O mesmo autor, em sequência ao seu trabalho, obteve resultados similares de produção de ésteres etílicos em solvente orgânico utilizando lipases não comerciais obtidas por fermentação em estado sólido de *Penicillium brevicompactum* e *Rhizopus* sp. Neste, os extratos enzimáticos em suas diferentes formas de obtenção, conduziram a produções insignificantes de biodiesel, variando numa faixa de 0,1 a 3,7% de conversão. Isto se deve, segundo o autor, pelo fato da ausência de possíveis interferentes que se liguem ao sítio ativo da enzima fazendo com que ela perca sua atividade, diminuindo a produção de ésteres.

**Tabela 1 - Conversões em ésteres etílicos utilizando os extratos em diferentes formas de obtenção de *Sporidiobolus pararoseus* (a), de *Penicillium crustosum* (b).**

	Atividade de síntese (U/g)	Conversão (%)
Extrato enzimático bruto (EEB)	290,63	0,18
Extrato enzimático precipitado (EEP)	295,67	0,15
Extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI)	209,46	0,21
Extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI)	203,03	0,74

(a)

	Atividade de síntese (U/g)	Conversão (%)
Extrato enzimático bruto (EEB)	202,67	3,86
Extrato enzimático precipitado (EEP)	209,28	0,64
Extrato enzimático bruto imobilizado (EEBI)	240,59	4,68
Extrato enzimático precipitado imobilizado (EEPI)	228,76	0

(b)

PREDRABON, (2011) realizou um estudo testando a alcoólise enzimática de diferentes óleos vegetais utilizando lipase de *Penicillium brevicompactum* fermentada em diferentes misturas de farelos. As maiores conversões foram obtidas na amostra de extrato obtido utilizando a mistura de farelo de arroz e casca de arroz como substratos (2,88%) e na amostra de extrato da mistura farelo de soja mais casca de arroz obteve-se 2,48% de conversão, ambas utilizando óleo de oliva como substrato para a alcoólise.

Os extratos enzimáticos brutos de *Penicillium brevicompactum* obtidos a partir de torta de babaçu e farelo de mamona foram estudados por SILVA *et al.*, (2010), como catalisadores para a produção de biodiesel. Conversões de 1,21 e 0,93% em biodiesel foram obtidas, respectivamente para cada extrato testado. Porém, quando os extratos de torta de babaçu (80% de umidade, 72 h) e de farelo de mamona (70% de umidade, 96 h) foram precipitados, conversões de 15,05 e 6,47% foram obtidas, respectivamente.

Melhores resultados foram obtidos, porém, por CHANG *et al.*, (2005), em estudo de alcoólise enzimática usando Novozym 435 imobilizada como catalisador, óleo de canola e metanol como substratos e n-hexano como solvente. Os autores verificaram que, entre vários tratamentos, a maior conversão em biodiesel metílico (96,5%) foi obtida após 12 h de reação, 45 °C, 50% de enzima, razão molar metanol:óleo de 4:1. A menor conversão (22,4%) foi obtida após 16 h de reação, 55 °C, 20% de enzima e razão molar entre os substratos de 5:1 com adição de 5% de água.

#### 4 CONCLUSÃO

Esses resultados demonstram a necessidade de novos estudos, levando em consideração que o custo para a produção das lipases microbianas é muito baixo, o que impulsiona o interesse por essas enzimas na aplicação de produtos de alto valor agregado.

Tendo em vista trabalhos já publicados, indicando que fatores como razão molar, tempo de reação, temperatura e concentração de enzima influenciam fortemente no rendimento das reações, os dados obtidos indicam a necessidade de continuidade deste trabalho no sentido de investigar a otimização dos parâmetros de reação, bem como a busca do aprimoramento da metodologia de análise dos ésteres obtidos.

#### 6 REFERÊNCIAS

- FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. **A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 5, p. 1298-1302, 2009.
- MA, F. HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, v. 70, p. 1-15, 1999.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N.. Lipase **promiscuity and its biochemical applications.** *Process Biochem.* 48:1-15; 2012.
- TREICHEL, H.; LIVEIRA, O.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J V.. **A review on microbial lipases production.** *Food and Bioproc. Technol.*, v. 3, p.182-196, 2010.
- SALIHU, A., ALAM, M. Z., ABDULKARIM, M. I., SALLEH, H. M. **Lipase production: Na insight in the utilization of renewable agricultural residues.** *Resources, Conservation and Recycling.* 2012; 58:36-44.

SILVA C., WESCHENFELDER T. A., ROVANI S., CORAZZA F. C., CORAZZA M. L., DARIVA C., OLIVEIRA J. V. **Continuous production of fatty ethyl esters from soybean oil in compressed ethanol.** *Industrial Engineering Chemistry Research*. 2007; 46:5304- 5309.

PREDABON S. M. **Produção e caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium brevicompactum* em bioreator de leito fixo utilizando resíduos agroindustriais como substrato.** 2011; Dissertação de Ms., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil.

SILVA M.F., FREIRE D.M.G., CASTRO A.M., DI LUCCIO M., MAZUTTI M.A., OLIVEIRA J.V., TREICHEL H., OLIVEIRA, D. **Concentration, partial characterization and immobilization of enzymatic extract from *P. brevicompactum* by solid state fermentation of babassu cake and castor bean cake.** 2011; *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

VARGAS, G. D. L. P., TREICHEL, H. OLIVEIRA, D. BENETI, S. C. FREIRE, D. M. G., DI LUCCIO, M. **Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, p. 47–54, 2008.

ZENEVICZ, M. C. P.. **Avaliação da atividade enzimática de lipases e aplicações em reações de interesse utilizando GLP pressurizado.** 2011. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.