

Área: Engenharia de Alimentos

ESTUDO DA ESTABILIDADE OPERACIONAL EM RECICLO CONTÍNUO DIRETO DA LIPASE B DE *Candida antarctica* IMOBILIZADA EM ESPUMA FLEXÍVEL DE PU DE DENSIDADE 30 E

18

Angela Antunes*, Aline Matuella Moreira Ficanha, Mateus Bopsin, Katarine Lia
Dorigon Levandoski, Jamile Zeni, Rogério Marcos Dallago

*Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de
Alimentos,*

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS

**E-mail: nenaantunes@gmail.com*

RESUMO – Os processos que utilizam lipases são especialmente atraentes em função das diferentes aplicações. A enzimas imobilizadas possibilita uma maior estabilidade e a produção de biocatalisadores com aplicações industriais. O poliuretano permite o reuso da enzima reduzindo os custos de produção além de facilidade no processo. O presente trabalho teve como objetivo a imobilização da lipase *Candida antarctica* B (Novozyme) em espuma flexível de PU de densidades diferente (D18 e D30), avaliando a capacidade de reuso na síntese do etiloleato. Para a avaliação do processo de reutilização, após cada reação a quantificação da atividade de esterificação, o excedente do produto da reação de esterificação era retirado. Em seguida uma nova quantidade de solução padrão- 5mL (ácido oleico:etanol) era adicionado ao imobilizado e era realizado uma nova reação e assim sucessivamente até o imobilizado atingir 50% da sua atividade residual inicial. A quantificação da atividade de esterificação foi realizada por titulometria. Ao final do estudo foi observado um total de 6 e 4 ciclos com atividade residual de 50 % para os imobilizados em espuma flexível de PU- D18 e D30 respectivamente. Para a enzima livre o número de ciclos foram 4, porém, com atividade enzimática menor que 20%.

Palavras-chave: PU flexível, imobilização, reciclo.

1 INTRODUÇÃO

As lipases têm sido utilizadas com grande sucesso com para catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação, pois representam melhorias significativas no processo, principalmente no que se refere aos custos operacionais, como no tempo de reação, consumo de energia, mão de obra e alta

atividade catalítica (PIRES-CABRAL et al., 2010). Sendo utilizados tanto na indústria (alimentos, cosméticos e perfumes, biomédicos, pesticidas, detergentes) e em níveis acadêmicos (BRÍGIDA et al., 2010).

Ésteres etílicos (oleatos) também podem ser utilizados como plastificantes e lubrificantes, aditivos biológicos e fluidos hidráulicos, sendo assim uso têm sido dificultados devido aos baixos valores e a incapacidade de reutilização, além de técnicas para a conservação de alimentos através da adição de ésteres etílicos. No entanto, a maior parte destes produtos é obtida por via química. Sendo assim, sugere a incorporação de novas técnicas para a produção de compostos biodegradáveis, biocompatíveis e essencialmente não-tóxicos. Em resumo, a produção biotecnológica destes produtos na indústria de alimentos esses compostos têm várias vantagens sobre os ésteres sintéticos, tais como degradabilidade; podem ser sintetizadas a partir de substratos renováveis, condições reacionais brandas envolvidos, elevado grau de pureza alcançado e a baixa toxicidade (NETA et al., 2012).

O objetivo do presente estudo foi desenvolver através do método de esterificação do ácido oleico com etanol a produção de ésteres de oleato de etila utilizando uma lipase do tipo B de *Candida antarctica* imobilizada em situ em espuma flexível de poliuretano (PU), sendo conhecida pela capacidade e versatilidade de imobilizar enzimas, enfatizando a atividade do catalizador e estabilidade operacional em reações de esterificação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A enzima utilizada foi a lipase de *Candida antarctica* B (Novozyme NZL-102-LYO-HQ) e as proporções dos monômeros, surfactantes, extensores de cadeia e água para as diferentes densidades de estudos foram cedidas pela Tasca Estofados e Cia (empresa fabricante de espuma flexíveis de poliuretano). Para o imobilizado D30 utilizou-se as proporções dos monômeros (68,85%), surfactantes (0,6%), extensores de cadeia (28,47%) e água (1,95%), para o imobilizado D20 as proporções dos monômeros foram (57,35%), surfactantes (0,76%), extensores de cadeia (37,55%) e água (2,86%) e para o imobilizado D18 as proporções dos monômeros (58,71%), surfactantes (0,98%), extensores de cadeia (37,98%) e água (2,35%), para as porcentagens dos componentes do PU deve-se levar em consideração a volatilidade dos mesmo. Os solventes utilizados foram hexano (Quimex 97% de pureza), metanol (Quimex 97% de pureza) e etanol (Quimex 97% de pureza).

2.1 Imobilização

O procedimento experimental para imobilização da *Candida antarctica* B (CALB) em espuma flexível de PU se deu com o emprego da enzima em estado líquido, com preparo de solução enzimática (2 g em 20 mL de água destilada). O imobilizado foi produzido pela mistura da enzima em solução (correspondendo a 10 % do volume total dos monômeros). O processo de preparo para imobilização da CALB em espuma flexível de PU inicia com a mistura dos monômeros (poliol e copolímero) em um béquer, os quais são homogeneizados por 15 segundos. Em seguida é adicionada a essa mistura a solução enzimática a qual também se faz a homogeneização. Após é incorporado a mistura do béquer, a ASA (amina, silicone e água), em concomitante é feita a adição do estanho, e por fim é vertido ao béquer o isocianato o qual dá o início do processo de polimerização. A mistura de

todos os compostos que fazem parte do PU é vertida para um recipiente retangular de alumínio (recipiente que dará forma ao polímero) previamente untada com vaselina sólida. Para ambas as densidades o procedimento de imobilização foi o mesmo.

Após aproximadamente 1 minuto ocorreu a expansão da espuma e a completa polimerização da mesma, possibilitando visualizar algumas características da espuma formada, como conformação, flexibilidade, maciez, firmeza, porosidade interna e resistência (LUCAS et al., 2001; SANTOS, 2011). Cabe ressaltar que o método de imobilização utilizado nesta pesquisa consiste no método de encapsulamento, onde ocorre a formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a em uma estrutura tridimensional, realizando o “confinamento” da proteína no polímero insolúvel, resultando no biocatalisador imobilizado (DALLA-VECCHIA et al., 2004; GONÇALVES, 2007).

2.2 Atividade Enzimática- Esterificação

A atividade de esterificação foi realizada pela quantificação da reação de síntese do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1 (v/v)). A reação foi conduzida a 40 °C, 160 rpm por 40 min. Esta foi iniciada pela adição da enzima (0,1 g) ao meio reacional, em frascos de vidro com tampa, mantidos em agitador orbital. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata no início da reação. A cada amostra foram adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração de éster de oleato de etila segundo Paroul et al. (2010 e 2011). A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com NaOH 0,05 M até pH 11. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada baseando em Brígida et al. (2010).

2.3 Determinação do Rendimento

O rendimento do imobilizado foi calculado pela porcentagem da razão da atividade total da enzima livre em solução utilizado na imobilização e da atividade total do imobilizado (o qual considera a massa total de imobilizado produzido (BRÍGIDA et al., 2010).

2.4 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional foi realizada em batelada de 24 horas, tanto para espuma de densidade 30 como para a de densidade 18. Este procedimento foi realizado no final de cada ciclo de reação, no qual, o produto (fase líquida) foi removido com uma pipeta e foi mantida a fase sólida (derivado imobilizado). As reações foram repetidas até o derivado chegar a uma atividade de esterificação residual maior ou igual a 50 % da atividade inicial.

Depois de transcorrido o tempo das reações de síntese (40 minutos de reação), o meio reacional foi removido de cada um dos sistemas, após a remoção do meio reacional, o derivado imobilizado foi submetido a

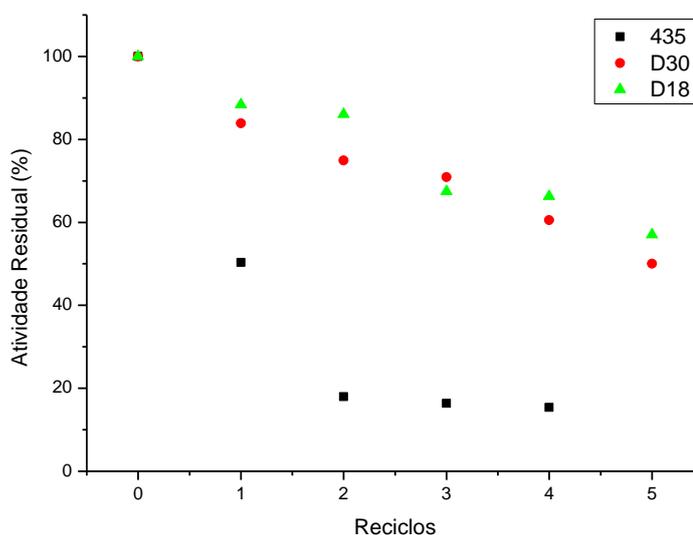
uma etapa de lavagem com os diferentes solventes, sendo eles, hexano, metanol, etanol (1 vez com 5 mL de cada um dos solventes), o mesmo procedimento foi avaliado para a solução padrão de síntese (ácido oleico:etanol). Após, o meio foi centrifugado a 5000 rpm. Retiram-se os solventes sobrenadantes, deixou-se o derivado em estufa a 40 °C por aproximadamente 24 horas para a evaporação do solvente residual, com exceção ao frasco reacional do imobilizado da solução padrão. Posteriormente, as mesmas quantidades de solução padrão foram adicionadas ao derivado para a próxima reação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reutilização de enzimas em mais de um ciclo de reação é um dos principais objetivos da imobilização, este fato é importante para as enzimas devido ao seu preço elevado, visto que, o custo da enzima é um dos principais problemas quando se refere a sua aplicação industrial. Normalmente, considera-se que uma enzima pode ser reutilizada até a sua atividade ser maior ou igual a 50 % do valor da atividade inicial (FICANHA et al., 2015).

A possibilidade de reutilizar a lipase de *Candida antarctica* B imobilizada foi determinada por reações de síntese de oleato de etila empregando dois diferentes métodos de reusos: Reuso contínuo (sem lavagem) e a cada 24 horas com lavagem em diferentes solventes orgânicos, apresentados nas Figuras 1.

Figura 1 - Número de ciclos da lipase imobilizada em PU de densidade D30, D18 e da lipase Novozyme 435 com reuso contínuo.



Como pode-se observar na Figura 1, a lipase imobilizada em poliuretano de densidade D30 e D18, apresentou um número de ciclos igual a 5, com atividade residual em torno de 50% no 5 ciclo, ou seja, estas enzimas imobilizadas (D30 e D18) poderiam ser utilizadas em torno de 5 vezes em um mesmo processo reacional para síntese do oleato de etila. Já a lipase Novozyme 435, no processo reacional para síntese do oleato

de etila, perdeu 50% de sua atividade residual no 1 ciclo, e a partir do 2 ciclo apresentou atividade residual em torno de 20%.

Ao se comparar a enzima lipase Novozyme 435 com a lipase imobilizada no suporte de poliuretano de diferentes densidades, D30 e D18, pode-se verificar que a enzima imobilizada no poliuretano, independentemente de sua densidade, apresenta um número maior de ciclos e com atividade residual superior a 50%. Nyari, (2013), estudando o processo de imobilização de CALB em PU rígido obteve 30 ciclos em sistema de reuso contínuo, resultado este, superior aos obtidos no presente estudo com PU flexível.

4 CONCLUSÃO

Os resultados do ciclo contínuo demonstraram a possibilidade de reutilizar a enzima imobilizada D30 e D18 por até 5 vezes, considerando 50% de atividade residual, em contrapartida, observou-se que a enzima comercial Novozyme 435 apresentou apenas 1 ciclo no mesmo processo.

5 REFERÊNCIAS

- BRÍGIDA, A. I. S.; CALADO, V. M. A.; GONÇALVES, L. R. B.; COELHO, M. A. Z. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 832-838, 2010.
- DALLA VECCHIA, C.; BOWER, R. G.; THEUNS, T.; BALOGH, M. L.; MAZZOTTA, P., FRENK, C. S. Quenching cluster cooling flows with recurrent hot plasma bubbles. **Monthly Notices of the Royal Astronomical Society**, v. 355, p. 995-1004, 2004.
- FICANHA, A. M. M.; NYARI, N. L. D.; LEVANDOSKI, K.; MIGNONI, M. L.; DALLAGO, R. M. Estudo da imobilização de lipase em sílica obtida pela técnica sol-gel. **Química Nova**, v. 38, p. 364-369, 2015.
- GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. Dissertação-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2007.
- NETA, N. S.; CUNHA, J. A. C.; SANCHO, S. O.; ABREU, R. F. A.; PONTES, D. F.; CARIOCA, J. O. B.; TEIXEIRA, J. A. (2012). Enzymatic Production of Ethyl Oleate Ester Using a Lipase from *Candida antarctica* B. **Holos-Issn** v. 2, p. 1807-1600, 2012.
- PAROUL, N.; BIASI, A.; ROVANI, A. C.; PRIGOL, C.; DALLAGO, R.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Enzymatic production of linalool esters in organic and solvent-free system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, p. 583-589, 2010.
- PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Solvent-free geranyloleate production by enzymatic esterification. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 323-329, 2011.
- PIRES-CABRAL, P.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Modelling the production of ethyl butyrate catalysed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams. **Chemical and Biochemical Engineering**, v. 33, p. 148-158, 2007.

SANTOS, R. D. **Produção Enzimática de Poli (ϵ -Caprolactona) em Dióxido de Carbono Supercrítico.**
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis/SC, 2011.