

EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DE LIPASE NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE SOLKETILA

José Miguel Júnior, João Vitor Bernardes Dimas, Nalanda Ribeiro Mendes de Melo, Adriano Aguiar Mendes.

¹Universidade Federal de Alfenas/Instituto de Química, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro – 37130-001 - Alfenas-MG, Brasil, jose.junior@sou.unifal-mg.edu.br, joao.dimas@sou.unifal-mg.edu.br, nalanda.melo@sou.unifal-mg.edu.br, adriano.mendes@unifal-mg.edu.br.

Resumo

Este estudo objetiva a produção enzimática de ésteres de solketila a partir de óleo de soja usado em fritura por hidroesterificação. Este processo consiste de uma primeira etapa de completa conversão do óleo residual em ácidos graxos livres (AGLs) por hidrólise enzimática catalisada por lipase de *Candida rugosa* (LCR) e esterificação dos AGLs resultantes com solketal em um sistema isento de solventes. Nesta segunda etapa, lipase Eversa® Transform 2.0 imobilizada por adsorção física em partículas pré-tratadas do epicarpo (casca) de *Acrocomia aculeata* (macaúba), um resíduo lignocelulósico, foi usado como catalisador. A concentração de proteína imobilizada neste suporte foi de $25,2 \pm 1,3$ mg/g oferecendo um carregamento inicial de proteína de 40 mg/g de suporte. A máxima conversão de AGLs na etapa de esterificação de 71% foi alcançada após 150 min de reação a 46°C usando uma concentração de biocatalisador de 17% m/m, e razão molar de AGLs:solketal de 1:1,6. O biocatalisador reteve 72% de sua atividade original após dez bateladas de esterificação realizadas a 46°C, enquanto a 60°C a lipase imobilizada reteve apenas 19% de sua atividade inicial.

Palavras-chave: Ésteres de solketila. Óleo de fritura. Lipase. Hidroesterificação.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra – Química.

Introdução

Ésteres de solketila são uma importante classe de compostos químicos amplamente usados como aditivos em combustíveis, agentes antimicrobianos e bioplastificantes produzidos convencionalmente por reações de esterificação e/ou transesterificação empregando catalisadores químicos clássicos – ácidos ou básicos (Mariam *et al.*, 2022; Neamtu *et al.*, 2019; Perosa *et al.*, 2016; Sultanova *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2014). Em geral, estes sistemas de reação são conduzidos em altas temperaturas (de 90 a 150 °C) e requerem grandes volumes de solventes orgânicos tóxicos para atingir altos rendimentos (Mariam *et al.*, 2022; Neamtu *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2014). Portanto, a utilização de lipases como catalisadores é de grande interesse devido às suas vantagens com relação à rota química tradicional porque atuam em condições brandas que reduzem a demanda de energia. Além disso, elas possuem alta especificidade e seletividade que também reduzem a formação de subprodutos indesejáveis. Portanto, o uso de enzimas (lipases) minimizam a geração de resíduos e simplificam as etapas de separação/purificação (Sousa *et al.*, 2021; Stergiou *et al.*, 2013).

Lipases são enzimas que catalisam eficientemente a produção de diferentes ésteres na forma de extratos brutos (solúvel ou em pó) ou imobilizadas em diferentes suportes (Bolina *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2021). Em geral, estes estudos também foram preferencialmente conduzidos em sistemas de solventes usando solventes orgânicos clássicos perigosos (Sousa *et al.*, 2021; Stergiou *et al.*, 2013). No entanto, o uso de sistemas de reação isentos de solventes tem atraído grande atenção por proporcionar processos ecologicamente corretos (Sousa *et al.*, 2021). Neste contexto, o principal objetivo deste estudo foi desenvolver um processo sustentável para a produção de ésteres de solketila a partir de óleo de fritura (óleo de soja usado em fritura) por um processo enzimático em duas etapas (hidroesterificação) para explorar as potencialidades de lipases em cada etapa do processo. Este processo foi adotado com o intuito de contornar alguns inconvenientes da transesterificação direta de óleos (vegetais e/ou residuais) e alguns álcoois que requer elevados tempos de reação e altas temperaturas para melhorar a acessibilidade destes materiais de partida ao microambiente das lipases imobilizadas (Bolina *et al.*, 2021). A primeira etapa deste processo consistiu na hidrólise completa do

óleo em ácidos graxos livres (AGL) catalisada pôr uma lipase comercial não-específica oriunda de *Candida rugosa* – LCR (Carvalho *et al.*, 2021). Posteriormente, os AGLs obtidos foram esterificados com solketal em um sistema isento de solventes catalisados pela lipase Eversa® Transform 2.0, uma preparação de lipase de baixo custo com alta atividade catalítica e estabilidade em reações de esterificação. Esta lipase é obtida de *Thermomyces lanuginosus* geneticamente expressa em *Aspergillus oryzae* (Bolina *et al.*, 2021). Nessa reação, a lipase foi imobilizada via adsorção física em partículas do epicarpo de *Acrocomia aculeata* (macaúba), um resíduo agroindustrial obtido da extração de óleo e ainda não empregado como suporte na imobilização de enzimas.

Metodologia

Preparação de lipase Eversa® Transform 2.0 (35 mg/mL de proteína) foi adquirida da Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Frutos da macaúba foram coletados no Bioma Cerrado na Universidade Federal de São João del-Rei – Campus Sete Lagoas (Sete Lagoas, MG). Azeite de oliva foi adquirido em um mercado local (Alfenas, MG, Brasil) e óleo de fritura obtido na preparação de batatas fritas em um restaurante de *fast-food* em Alfenas, MG. Solketal foi também adquirido da Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes químicos foram de grau analítico adquiridos da Synth® (São Paulo, SP, Brasil).

A produção de AGLs por hidrólise completa do óleo residual foi conduzida empregando 3,2 g/L do extrato bruto da lipase comercial (LCR), 50 g de mistura reacional na razão mássica óleo:água de 40% (m/m), agitação mecânica de 1500 rpm, 40°C e tempo de reação de 3 h (Carvalho *et al.*, 2021). Os AGLs obtidos foram separados em funil de separação e a parte superior foi lavada 4 vezes com água destilada a 50°C para a remoção de glicerol residual e empregados na síntese de ésteres de solketila.

Figura 1 – Fruto da macaúba (ênfase na casca – epicarpo) e as partículas empregadas como suporte na imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0 por adsorção física.



Fonte – Do autor.

Partículas do epicarpo de macaúba foram obtidas por Trituração da casca em moinho de facas e classificação do tamanho de partículas em sistemas de peneira. O suporte com distribuição de tamanho de partícula entre 75 e 120 µm foram empregados na condução deste estudo. 30 g do suporte foram refluxados duas vezes em 400 mL de solução de ácido clorídrico (35% m/m) na proporção de 9:1 por 2 h a 120°C para a remoção de extractivos. Em seguida, ele foi imerso em 100 mL de solução de etanol a 70% m/m sob agitação mecânica (200 rpm) em shaker orbital a 25°C para a completa remoção destes extractivos. O suporte pré-tratado foi lavado com água destilada e seco em ambiente a 25°C antes do uso. Na Figura 1, é mostrado o fruto de macaúba e a casca usada na preparação do suporte e as partículas obtidas após o tratamento termoquímico e com etanol usadas como suporte.

A imobilização da lipase foi realizada em pH 5,0 (tampão fosfato de sódio 5 mmol/L) na relação suporte:solução enzimática de 1:19 empregando um carregamento inicial de proteína de 40 mg/g de suporte (Alves *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2019). A imobilização foi acompanhada pela determinação da concentração de proteína imobilizada empregando o método proposto por Bradford (1976). A atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva emulsificado com goma arábica em pH 8,0 (tampão fosfato de sódio 100 mM) 37°C e 200 rpm (Alves *et al.*, 2017). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a concentração de biocatalisador requerida na liberação de 1 µmol de AGLs por min de reação nas condições de ensaio descritas. A atividade específica (AE – U/mg_{proteína}) foi determinada pela relação entre a atividade hidrolítica e a concentração de proteína (Alves *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2019). O rendimento de imobilização (RI) foi determinado pela relação entre a atividade hidrolítica inicial e final no sobrenadante de imobilização e pela concentração de proteína desaparecida no processo de adsorção (Machado *et al.*, 2019). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

A lipase imobilizada foi empregada na produção de ésteres de solketila em modo batelada por esterificação direta dos AGLs do óleo de fritura e solketal em meio isento de solvente. As reações foram conduzidas em frascos abertos (evaporação da água gerada na reação) contendo 6 g de meio reacional, preparado na razão molar AGLs:solketal de 1:1,6, 240 rpm, e 17% em massa de lipase imobilizada que corresponde a uma concentração de proteína de 4,28 mg de proteína por grama de mistura reacional. Estas reações foram conduzidas em dois valores distintos de temperatura (46°C e 60°C) previamente selecionados em testes preliminares realizados em laboratório com a finalidade de verificar a sua influência na atividade (conversão) e estabilidade (testes de reuso) da enzima. A lipase na forma livre (extrato solúvel) foi também usada como catalisador empregando a mesma concentração de proteína (0,78 mL do extrato bruto). Amostras do meio de reação (50 µL) foram retiradas em tempos pré-determinados e diluídas em etanol hidratado a 95% (m/m) para a quantificação de AGLs residuais por titulação com solução de NaOH 40 mmol/L, empregando fenolftaleína como indicador, e, consequentemente, a porcentagem de conversão (Y - %), como mostrado na Equação 1 (Alves *et al.*, 2017):

$$Y (\%) = \left(\frac{AGL_0 - AGL_t}{AGL_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que: AGL_0 e AGL_t são as concentrações inicial e residual de AGLs no meio de reação (mol/L), respectivamente.

Testes de reuso do biocatalisador após sucessivas bateladas de reação conduzidas nas mesmas condições reacionais foram também realizados. Ao final de cada batelada, a lipase imobilizada foi recuperada via filtração em funil de Buchner e lavada com hexano a 0°C para a remoção de substratos não convertidos e/ou produtos retidos no seu microambiente. Para a remoção de água gerada na reação, a lipase imobilizada foi filtrada à vácuo por 20 min e armazenada em recipiente aberto a 5°C por 24 h para ser reutilizada em nova batelada. Em seguida, ela foi adicionada em um novo substrato, na qual foi estimada a conversão conforme descrito na Equação (1).

Resultados

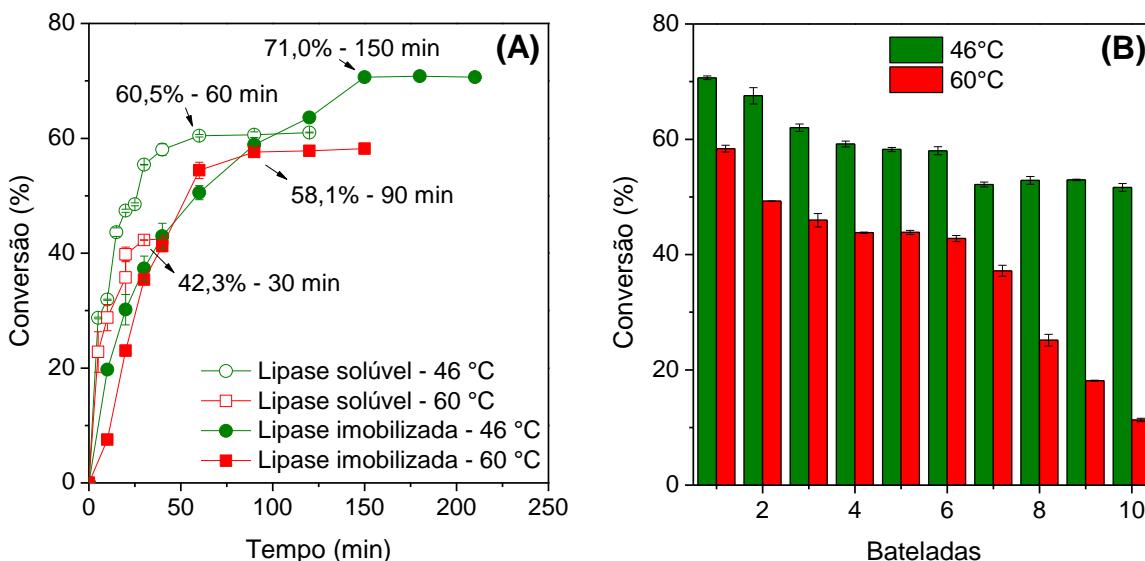
O suporte preparado neste estudo (epicarpo da macaúba) foi utilizado na adsorção física da lipase Eversa® Transform 2.0 e suas propriedades foram comparadas com sua forma livre (extrato líquido). Inicialmente, a estabilidade da lipase solúvel foi avaliada nas condições de imobilização (5 mmol/L tampão acetato de sódio pH 5,0 a 25 °C e 15 h). Sob tais condições, a lipase reteve totalmente sua atividade hidrolítica original, na qual mostra a sua alta estabilidade nas condições de imobilização adotadas neste estudo. Estes resultados mostram que toda a atividade desaparecida no sobrenadante de imobilização é atribuída ao processo de imobilização por adsorção. A máxima concentração de proteína imobilizada foi de $25,2 \pm 1,3$ mg por grama de suporte, o que corresponde a 62,5% da proteína inicialmente oferecida (40 mg/g de suporte). A lipase imobilizada resultante exibiu uma atividade hidrolítica de $356,6 \pm 23,5$ U/g de biocatalisador e uma atividade específica de 14,1 U/mg_{proteína}.

De acordo com a Figura 2(A), perfis lineares de produção dos ésteres foram observados durante os primeiros 60 min de reação. Estes resultados mostram satisfatória difusividade das moléculas dos materiais de partida (AGLs e solketal) para o microambiente interno do biocatalisador. A reação

conduzida a 46°C exibiu maior porcentagem de conversão dos AGLs (71%) após 150 min de reação. Em condições semelhantes, uma porcentagem de conversão de AGLs de apenas 58,1% após 90 min de reação foi alcançada a 60°C. A produção de ésteres usando lipase livre (extrato solúvel) também foi conduzida e maiores velocidades iniciais de reação podem ser observadas. Por outro lado, os valores de porcentagem de conversão de AGLs foram menores do que aqueles obtidos usando a lipase na forma imobilizada - 60,6% após 60 min de reação a 46°C e 42,3% após 30 min de reação a 60°C.

A estabilidade operacional (testes de reuso) da lipase imobilizada após dez sucessivas bateladas de reação foi avaliada a 46°C e 60°C. De acordo com a Figura 2(B), a lipase imobilizada apresentou uma ligeira redução do seu desempenho catalítico após sete sucessivas bateladas de esterificação a 46°C e este valor permaneceu inalterado até a décima batelada (valores de conversão de AGLs em torno de 51% após 150 min de reação). Este valor corresponde a 72% de sua atividade original (conversão de AGLs de 71% na primeira batelada – Figura 2(A)). Por outro lado, foi observada uma diminuição acentuada do seu desempenho catalítico após a primeira batelada a 60°C. A partir desse ponto, pode ser observada uma ligeira diminuição de sua atividade catalítica até a sexta batelada (conversão de AGLs entre 49% e 42%), seguida por uma diminuição acentuada nas últimas quatro. Na décima batelada, foi observada uma conversão de AGLs de apenas 11% (o que corresponde a apenas 19% de sua atividade inicial – 58,1% após 90 min de reação a 60°C – Figura 2(A)).

Figura 2 – Influência do tempo de reação (A) e testes de reuso da lipase imobilizada (B) após sucessivas bateladas de produção dos ésteres de solketila por esterificação de AGLs provenientes do óleo de fritura com solketal em sistema isento de solventes orgânicos catalisada pela lipase Eversa® Transform 2.0 nas formas livre (solúvel) e imobilizada em partículas de epicarpo da macaúba.



Fonte – Do autor.

Discussão

De acordo com os resultados obtidos referentes à imobilização da lipase no suporte preparado, uma similar concentração de proteína imobilizada (62,5%) e rendimento de imobilização, parâmetro determinado com base nas unidades de atividade hidrolítica desaparecidas do sobrenadante de imobilização ($RI = 64,8 \pm 2,5\%$), foi observada no equilíbrio. Estes resultados mostram que a lipase testada (Eversa® Transform 2.0) possui uma quantidade muito baixa de proteínas contaminantes em sua formulação (Martinez-Sánchez *et al.*, 2020). A atividade específica da lipase na sua forma imobilizada foi de apenas 2,5% do valor original da atividade específica da lipase na forma livre – extrato líquido (560 U/mg_{proteína}). Isso pode ser causado por problemas de difusão da emulsão de azeite de oliva (substrato empregado na determinação da atividade hidrolítica da enzima) nos poros de suporte, onde as moléculas da enzima estão preferencialmente localizadas (Carvalho *et al.*, 2021). Neste estudo, a lipase imobilizada obtida foi então utilizada na produção de ésteres de solketila conduzida em sistemas livres de solventes.

Os ensaios 7do efeito do tempo na reação de esterificação mostram claramente que a lipase na forma imobilizada foi altamente mais ativa que a sua forma solúvel nas duas temperaturas avaliadas (46°C e 60°C). Estes resultados podem ser atribuídos a melhor partição dos substratos ao microambiente da enzima após o processo de imobilização. A utilização de lipase livre (solução aquosa de enzima) poderia restringir o acesso de moléculas de AGLs (substrato altamente hidrofóbico) aos seus sítios ativos. Portanto, a utilização da lipase imobilizada no suporte de baixo custo preparado possibilitou aumentar consideravelmente a sua atividade catalítica, como esperado (Alves *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2021; Martínez-Sánchez *et al.*, 2020). Similar resultados foram também observados em um estudo anterior conduzido em nosso grupo de pesquisa para a produção de ésteres com propriedades lubrificantes catalisada por Eversa® Transform 2.0 imobilizada em suporte hidrofóbico comercial – partículas de poli(estireno-divinilbenzeno) (Carvalho *et al.*, 2021). Esses resultados mostram claramente que uma técnica de imobilização apropriada pode melhorar o desempenho de lipases, de acordo com estudos anteriores descritos na literatura (Alves *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2021; Martínez-Sánchez *et al.*, 2020). Além disso, a lipase na forma livre e imobilizada foi mais ativa em condição moderada (46°C), na qual confirma a maior perda de sua atividade catalítica por inativação térmica a 60°C.

De forma análoga, os testes de reuso também confirmam a maior perda de atividade catalítica após sucessivas reações de esterificação conduzidas a 60°C por inativação térmica. De fato, a conversão obtida a 46°C (51%) foi aproximadamente 5 vezes maior que a 60 °C (11%) na décima batelada de reação. Além disso, foi observada diminuição do desempenho catalítico da enzima após sucessivas reações nos dois sistemas de reação também devido à inativação térmica, como reportado acima, bem como a dessorção da enzima do suporte e/ou possível acúmulo de moléculas de materiais de partida (AGLs e solketal) não convertidos e/ou produtos (ésteres de solketila e moléculas de água) no seu microambiente que podem alterar a sua atividade catalítica – inibição (Carvalho *et al.*, 2021; Martinez-Sánchez *et al.*, 2020).

Conclusão

Neste estudo, um processo sustentável foi desenvolvido para a produção de uma valiosa classe de compostos químicos (ésteres de solketila) a partir de óleo de soja usado (óleo de fritura) por um processo de duas etapas – hidroesterificação. Para tal propósito, um novo e ativo biocatalisador foi preparado via imobilização por adsorção física de uma lipase comercial de baixo custo (Eversa® Transform 2.0) em um resíduo agroindustrial (partículas de epicarpo de macaúba). Este estudo mostrou claramente que a lipase imobilizada foi altamente mais ativa e estável em reações de esterificação conduzidas sob condições moderadas (46°C). Este é um aspecto relevante do processo proposto, uma vez que requer uma baixa demanda de energia para a produção dos ésteres. O desenvolvimento de um processo eficiente e sustentável usando um óleo residual como matéria-prima e biomassa lignocelulósica como suporte na imobilização da lipase pode ser considerado um campo promissor para o estabelecimento de processos industriais tecnologicamente limpos.

Referências

- ALVES, M.D.; ARACRI, F.M.; CREN, E.C.; MENDES, A.A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chem. Eng. J.*, v. 311, p. 1–12, 2017.
- BADGUJAR, V.C., BADGUJAR, K.C., YEOLE, P.M., BHANAGE, B.M. Investigation of effect of ultrasound on immobilized *C. rugosa* lipase: Synthesis of biomass based furfuryl derivative and green metrics evaluation study. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 144, p. 109738, 2021.
- BOLINA I.C.A.; GOMES, R.A.B.; MENDES, A.A. Biolubricant production from several oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: Current scenario and future perspectives. *BioEnergy Res.*, v. 14, p. 1039–1057, 2021.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248–254, 1976.

CARVALHO, W.C.A., LUIZ, J.H.H., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., HIRATA, D.B., MENDES, A.A. Eco-friendly production of trimethylolpropane triesters from refined and used soybean cooking oils using an immobilized low-cost lipase (Eversa® Transform 2.0) as heterogeneous catalyst. **Biomass Bioenergy**, v. 155, p. 106302, 2021.

MACHADO, N.B.; MIGUEZ, J.P.; BOLINA, I.C.A.; SALVIANO, A.B.; GOMES, R.A.B.; TAVANO, O.L.; LUIZ, J.H.H.; TARDIOLI, P.W.; CRENN, E.C.; MENDES, A.A. Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 128, p. 9-21, 2019.

MARIAM, N.M.D.N.S., HOONG, S.S., ARNIZA, M.Z., ADNAN, S., ISMAIL, T.N.M.T., YEONG, S.K., YUSOP, M.R. Optimisation of reaction parameters for the synthesis of solketal levulinic acid as potential biodiesel additive. **J. Oil Palm Res.**, v. 34, p. 524–534, 2022.

MARTÍNEZ-SANCHEZ, J.A., ARANA-PEÑA, S., CARBALLARES, D., YATES, M., OTERO, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilized biocatalysts of Eversa® Transform 2.0 and lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Comparison of some properties and performance in biodiesel production. **Catalysts**, v. 10, p. 738, 2020.

NEAMTU, C., STEPAN, E., PLESU, V., BOZGA, G., TULUC, A. Synthesis and characterization of new solketal alkylesters usable as diesel biobased fuel additives. **Rev. Chim.**, v. 70, p. 1167–1172, 2019.

PEROSA, A., MORASCHINI, A., SELVA, M., NOÈ, M. Synthesis of the fatty esters of solketal and glycerol-formal: Biobased specialty chemicals. **Molecules**, v. 21, p. 170, 2016.

STERGIOU, P.Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L.G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E.M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnol. Adv.**, v. 31, p. 1846–1859, 2013.

SULTANOVA, R.M.; KHUSNUTDINOVA, N.S.; BORISOVA, Y.G.; RASKILDINA, G.Z.; MESHCHERYAKOVA, S.A.; SAMORODOV, A.V.; ZLOTSKY, S.S. Selective synthesis of some carboxylic acids esters. **Russ. J. Gen. Chem.**, v. 93, p. 1–7, 2023.

YANG, J., MA, W.J., LI, N., ZHOU, J.H., SUN, H.Z. Synthesis of tung oil monoglyceride. **Adv. Mater. Res.**, v. 941–944, p. 1021–1025, 2014.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores também agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo APQ-01691-21) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo 306253/2023-2) pelo suporte financeiro.