



LIPASE IMOBILIZADA EM VERMICULITA PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

CAROLINE BORGMANN; GABRIELA LUIZA BATISTA DO NASCIMENTO; SARA VITÓRIA KOBIELSKI POMAGERSKI; ROGÉRIO DALLAGO; NATALIA PAROUL

RESUMO

A crescente demanda por energia tem contribuído para o aquecimento global, impulsionando a busca por combustíveis menos poluentes, como o biodiesel. As enzimas representam custos significativos para a produção de biocombustíveis, sendo a sua otimização essencial para a viabilidade econômica desse processo. A imobilização enzimática é uma estratégia utilizada que torna esses catalisadores mais atraentes, pois possibilita seu uso em múltiplos ciclos de reações. Neste estudo, uma lipase foi imobilizada em vermiculita para avaliar sua estabilidade operacional e a possibilidade de reutilização. A imobilização da enzima foi realizada pelo método de umidade incipiente, e a atividade enzimática foi avaliada para a síntese do oleato de etila. Os resultados mostraram que a enzima livre apresentou uma atividade de 55,0 U/g, enquanto o catalizador imobilizado alcançou valores de 28,4, 54,0 e 65,9 U/g para faixas de malha <20, 20-32 e 32-42 mesh, respectivamente. O pré-tratamento do suporte aumentou a atividade da enzima em 61,8%. O imobilizado manteve 100% da atividade no segundo ciclo, mas houve redução para 36% no terceiro. A vermiculita demonstrou ser um suporte promissor, embora sejam necessários estudos adicionais para otimizar a sua utilização.

Palavras-chave: *Candida antártica*; Reutilização enzimática; Suporte mineral.

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por energia e superexploração de combustíveis fósseis trouxeram como consequência o aquecimento global, devido à emissão de dióxido de carbono (CO₂). Neste cenário, os biocombustíveis surgiram como uma alternativa para reduzir os impactos, uma vez que são sintetizados através de processos biológicos para fixar o CO₂ que seria direcionado para a atmosfera (WANCURA *et al.*, 2023). Dentre os diversos combustíveis renováveis, o biodiesel se destaca por minimizar a dependência do petróleo bruto, atender à crescente demanda por energia e é considerado a melhor alternativa ao diesel, pois é atóxico, livre de enxofre, renovável e biodegradável (TAN *et al.*, 2024).

A produção de biodiesel ocorre por meio da transesterificação entre triglicerídeos de animais/plantas e aceptores de acila utilizando um catalisador químico ou biocatalizador. As principais matérias-primas para a produção de biodiesel são materiais graxos renováveis, como óleo de soja, esse que também se caracteriza como a principal cultura agrícola brasileira (VIEIRA *et al.*, 2021). No entanto, para ampliar sua aplicação industrial e viabilidade comercial, o custo de produção precisam ser reduzindo, sendo os biocatalisadores uma das matérias-primas mais onerosas desse processo.

Empregar catálise enzimática para síntese de biodiesel é uma opção viável, principalmente quando comparado a catalisadores químicos, por conta de oferece várias vantagens, incluindo baixo consumo de energia, alta eficiência de produção e ausência de

subprodutos tóxicos. Além disso, uma vantagem fundamental das enzimas é a alta especificidade do substrato e seletividade, onde poucos ou nenhum produto secundário é formado, aumentando os rendimentos da reação (WANCURA *et al.*, 2023).

As lipases, carboxil esterases, de origem animal, vegetal ou de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) são capazes de hidrolisar acilgliceróis de cadeia longa. Sua relevância está associada à versatilidade em catalisar diversas reações de importância industrial incluindo transesterificação, esterificação, interesterificação, hidrólise, alcoólise, acidólise e aminólise (WANCURA *et al.*, 2023). A aplicação da maioria das lipases naturais é significativamente limitada por sua instabilidade, pois tendem a perder atividade quando expostas a condições que se afastam das suas condições ótimas de pH e temperatura, bem como na presença de álcool ou solventes orgânicos (TAN *et al.*, 2024).

A imobilização enzimática é uma técnica amplamente empregada e pesquisada para otimizar os parâmetros operacionais e tornar os biocatalizadores economicamente mais atraentes. As enzimas comerciais geralmente são líquidas e limitadas a um único uso, devido à dificuldade de separação do meio reacional. A imobilização em suportes adequados não apenas facilita a reutilização, mas também pode aumentar a atividade, resistência e estabilidade do catalizador (PUTON, 2022).

Um estudo de Nyari (2017) mostrou a imobilização *in situ* da lipase de *Candida antarctica* B (CALB) em espuma de poliuretano (PU) pelo método de confinamento resultando em uma atividade do imobilizado superior a enzima livre, estabilidade de estocagem em uma ampla faixa de temperatura e 28 ciclos de operação. Contudo, nem todos os suportes mostraram-se eficazes para imobilização. Puton (2022), analisou a imobilização do extrato enzimático lipolítico comercial Eversa Transform 2.0 por adsorção em fibra de poliéster emulsionada com resina de poliuretano, onde este não apresentou estabilidade operacional, já que o imobilizado manteve a atividade enzimática acima de 50% em apenas um ciclo de reuso. Em contraste, no mesmo estudo o extrato enzimático foi imobilizado em Nylon-6,10, apresentando uma estabilidade operacional de 9 reciclos.

A revisão de literatura ressalta a importância de buscar novos suportes para imobilização de enzimas. Neste contexto, a vermiculita destaca-se como um material promissor, possuindo características desejáveis para esse fim, como: baixo custo, alta disponibilidade, e sendo inorgânica, inerte, porosa e podendo ser padronizado em tamanho de partículas com área superficial adequada.

Nesta pesquisa, a enzima CALB foi imobilizada em vermiculita pelo método de umidade incipiente, e foram estudadas a influência do tamanho de partícula e o impacto de um pré-tratamento da vermiculita na atividade de esterificação enzimática (AEE), posteriormente avaliou-se o seu reuso.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo da interferência do diâmetro de partícula (dp) a vermiculita comercial foi submetida a secagem em estufa a 105°C por 24h, seguida de moagem manual com auxílio almofariz e pistilo de cerâmica, e peneiração para padronizar o dp nas faixas pré-estabelecidas (malha mesh <20, 20-32 e 32-42). A lipase de *Candida antarctica* B (CALB, Novozymes) em forma de extrato enzimático foi imobilizado na vermiculita por umidade incipiente e mantida em temperatura ambiente por uma hora.

Na investigação do efeito do pré-tratamento a vermiculita comercial foi tratada com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% por 15 minutos sob agitação magnética, acompanhada de três lavagens com água destilada. Em seguida, o material foi exposto a uma solução saturada de EDTA por uma hora, também sob agitação magnética. Na sequência a solução de EDTA foi filtrada, a vermiculita foi seca em estufa a 105°C por 24 horas e triturada

até alcançar uma granulometria de malha 32-42. Para imobilização, a CALB foi adicionada à vermiculita pelo método de umidade incipiente e mantida em temperatura ambiente por uma hora.

A atividade enzimática de esterificação (AEE, U/g) do imobilizado e da enzima livre foi avaliada na síntese do oleato de etila, utilizando 0,2 g de catalisador imobilizado ou 1 mL de enzima livre em 5 g de meio reacional (razão molar ácido oleico:álcool etílico de 1:1).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Atividade de Esterificação Enzimática (AEE) encontrada para extrato enzimático foi de 55,0 U/g. Os imobilizados sintetizados com a vermiculita natural apresentaram uma tendência crescente da atividade com a redução do *dp*, apresentando 28,4, 54,0 e 65,9 U/g para as faixas de malha < 20, 20-32, 32-42 mesh, respectivamente (Tabela 1). Esta tendência foi vinculada ao aumento da área superficial, a qual varia inversamente com o *dp*, favorecendo a adsorção da enzima na superfície da vermiculita.

Tabela 1 – Resultado da atividade de esterificação enzimática (AEE) do extrato enzimático (EE) e enzima imobilizada em de vermiculita (EV) com diferentes tamanhos de partícula

Abertura da malha (mesh)	AEE (U/g)
EE	55,0
EV<20	28,4
EV20-32	54,0
EV32-42	65,9

A vermiculita pré-tratada com H₂O₂ e EDTA com granulometria de malha 32-42 apresentou uma atividade média de 106,6 U/g. Em relação a enzima livre esse resultado representa um rendimento de 253,27% (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade específica e total do extrato enzimático (EE) e do extrato enzimático imobilizado em vermiculita (EV) e o rendimento de imobilização

Biocatalizador	Massa (g)	Atividade Específica (U/g)	Atividade Total (U)*	Rendimento de Imobilização** (%)
EE	15,74	55,0	865,9	---
EV32-42	20,57	106,6	2.193,3	253,0

*Atividade Total (U) = Atividade Específica (U.g-1) x mass (g)

**Rendimento e Imobilização (%) = Uzeolite / U free extract x 100

A AEE encontrada para o imobilizado empregando o suporte tratado representou aumento de 61,8% em relação ao observado para o imobilizado sintetizado com a vermiculita natural (sem tratamento) para esta mesma faixa de granulometria. Estes resultados sugerem um efeito positivo do tratamento com H₂O₂ e EDTA no processo de imobilização. Duman *et al.* (2020), relataram a imobilização bem-sucedida da celulase em vermiculita por adsorção. Os autores atribuem a elevação da atividade à redução da barreira estérica e à maior flexibilidade enzimática. Essas modificações ocorrem durante a ligação da enzima ao suporte, facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo.

A Figura 1 apresenta as imagens referente a vermiculita pré-tratada e o imobilizado enzimático. Observam-se diferenças na coloração e no aspecto granulométrico, com o imobilizado apresentando uma coloração mais escura e uma maior agregação de material, alterações estas vinculadas a incorporação do extrato enzimático a vermiculita.

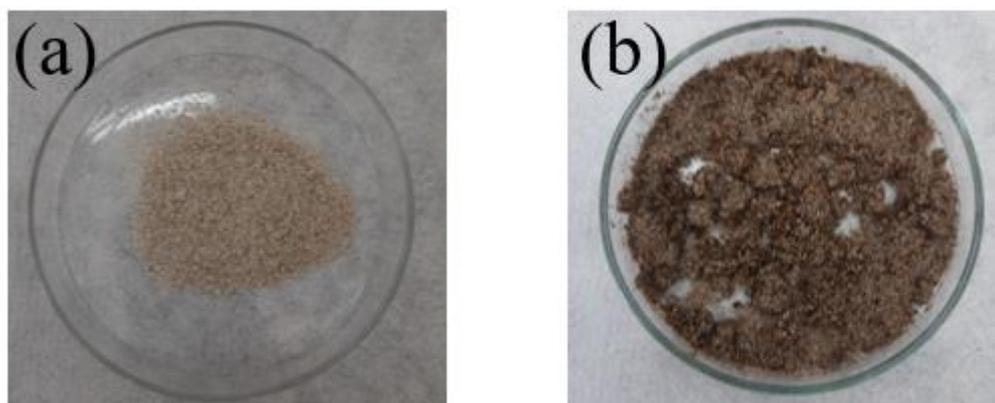


Figura 1 – Vermiculita pré-tratada (a), enzima CALB imobilizada em vermiculita (b).

Os ensaios de reutilização do catalisador imobilizado demonstram que ele manteve 100% da atividade inicial por dois ciclos, seguido de queda para 36% no terceiro ciclo. Este comportamento pode ser relacionado a lixiviação da enzima do suporte, uma vez que o processo de incorporação é adsorptivo, mediante interações fracas entre enzima e suporte, as quais podem ser facilmente rompidas durante seu uso devido as condições do meio reacional, como o pH e força iônica.

A utilização de agentes reticulantes podem aumentar a estabilidade da enzima no suporte, permitindo sua reutilização em mais ciclos. Como apresentado no estudo de Duran *et al.* (2020), os quais estabilizaram a enzima no suporte com glutaraldeído, e obtiveram 15 ciclos de operação com atividade enzimática acima de 50%.

A lixiviação da enzima também pode ser minimizada através de materiais que envolvem a enzima e o suporte. Na pesquisa realizada por Puton (2022) o complexo enzimático adsorvido em carvão ativado foi envolvido por Nylon-6,10, nas proporções de 1:1, 2:1, 3:1 e 4:1 (Nylon:carvão). A autora constatou que este formato de imobilização melhora a atividade enzimática do complexo, mas conforme é aumentado a proporção do monômero, ocorre uma perda de aproximadamente 5% na atividade enzimática. No entanto, ao mesmo tempo que ocorre a redução da atividade o número de reciclos é aumentado. Quando a proporção foi variada de 2:1 para 3:1 o reuso com valores residuais próximo a 100% elevou-se de 3 para 12, com possibilidade de 20 reciclos com atividade acima de 50%. A perda de atividade enzimática do imobilizado ocorre pois o Nylon-6,10, ao mesmo tempo que protege a enzima, dificulta a interação entre enzima-substrato. Contudo, essa redução pode ser justificável diante ao ganho em números de ciclos de operação.

4 CONCLUSÃO

Os resultados da análise AEE revelam que o diâmetro de partícula da vermiculita exerce uma influência significativa na atividade da enzima CALB. Essa relação indica que a otimização do diâmetro de partícula pode ser uma estratégia viável. Além disso, recomenda-se expandir a faixa de estudo para identificar o tamanho de partícula que proporciona a melhor funcionalidade. Embora a vermiculita apresentar-se como um suporte promissor para a imobilização de lipase, futuros estudos podem explorar a utilização de reticuladores ou materiais que envolvem o conjunto para fixar a enzima, visando aumentar o número de ciclos operacionais.

REFERÊNCIAS

DUMAN, Y. A.; TUFAN, G.; KAYA, A. U. Immobilisation of cellulase on vermiculite and the effects on enzymatic kinetics and thermodynamics. **Applied Clay Science**, v. 197, n. 105792, p. 105792, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2020.105792>

NYARI, N. L. D. **Aplicação da Lipase de Candida antarctica B imobilizada in situ em poliuretano em reações de síntese de ésteres em sistema livre de solvente**. 2017. 237p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada, Erechim, 2017.

PUTON, B. M. S. **Avaliação de suportes poliméricos para a imobilização de extratos enzimáticos**. 2022. 123p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada, Erechim, 2022.

TAN, Z.; CHEN, G.; MA, X.; GE, F.; ZHAO, Y.; LI, A.; HU, L.; REN, S.; ZHU, C.; YOU, Q.; ZHOU, J.; SHI, H. Carbon-based magnetic nano-particle utilizing nano-biochar as core and its immobilizing lipase for biodiesel preparation. **Industrial Crops & Product**, v.222, n. 119693, p. 11969, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119693>

VIEIRA, B.; NADALETI, W. C.; SARTO, E. The effect of the addition of castor oil to residual soybean oil to obtain biodiesel in Brazil: Energy matrix diversification. **Renewable Energy**, v. 165, p. 657-667, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.056>

WANCURA, J. H. C.; BRONDANI, M.; SANTOS, M. S. N. D.; ORO, C. E. D. WANCURA, G. C.; TRES, M. V.; OLIVEIRA, J. V. Demystifying the enzymatic biodiesel: How lipases are contributing to its technological advances. **Renewable Energy**, v. 216, n. 119085, p. 119085, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.119085>