

LIPASE DE *Pichia pastoris* IMOBILIZADA VIA ENCAPSULAMENTO EM MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE APLICADA NA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA RESIDUAL

Alceu Vinicius Roncoletta Belone¹

Amanda Carmelo da Rocha²

Vicelma Luiz Cardoso³

Bruna Jeanne Soares Pacheco⁴

Reaproveitamento, Reutilização e Tratamento de Resíduos (sólidos e líquidos)

Resumo

A hidrólise enzimática catalisada por lipases é uma alternativa atraente no meio industrial uma vez que atua em condições baixas de temperatura e pressão, sendo suficientes de obter produtos de grande valor. A imobilização de enzimas tem sido conhecida na biocatálise como um processo eficaz vistas as melhorias, como a estabilidade, especificidade e seletividade, comparada à catálise química. Além disso, essa técnica facilita a recuperação do biocatalizador, possibilitando a sua reutilização, minimizando os custos no processo. O óleo de soja residual, aproveitado como substrato nesse estudo, é comumente usado em frituras e conseqüentemente após, transformado em resíduo e efluente. Seu descarte inadequado é causa de danos ambientais, danificando as tubulações domésticas e das redes de tratamento de esgoto, além de ser lançado nas águas poluindo os recursos hídricos. Esse estudo teve o objetivo de estudar o melhor carregamento enzimático em relação à atividade enzimática da lipase de *Pichia pastoris* imobilizada em membrana de acetato de celulose por encapsulamento para aplicação em hidrólise do óleo de soja residual. O biocatalizador foi imobilizado na membrana produzida e a atividade enzimática foi dosada pela análise com emulsão de azeite de oliva e empregado na hidrólise em reator batelada à 55 °C por 4h. A melhor concentração da solução enzimática para a imobilização foi de 15 mg/mL, obtendo um hidrolisado com conversão de $23,6 \pm 0,3\%$.

Palavras-chave: Enzima; Imobilização; Hidrólise; Resíduo; Meio Ambiente.

¹Graduando em Engenharia de Química – Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Faculdade de Engenharia Química – FEQUI, alceu.belone@ufu.br

²Doutoranda em Engenharia Química – PPGEQ-UFU, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

³Profª. Drª. Universidade Federal de Uberlândia – Campus Santa Mônica-UFU, Faculdade de Engenharia Química – FEQUI.

⁴Doutoranda em Engenharia Química – PPGEQ-UFU, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.



INTRODUÇÃO

Um dos principais focos atuais no âmbito das pesquisas é o desenvolvimento de técnicas sustentáveis que viabilizem as melhores e mais modernas técnicas industriais acompanhadas de um viés que respeite e cuide do meio ambiente.

As enzimas estão cada vez mais em uso nas indústrias, pelo seu alto poder catalisador e pela sua capacidade em discriminar reações e substratos. Os biocatalisadores estão entre os mais utilizados pela indústria, capaz de promover a química verde, a sua atividade enzimática é amplamente usada nos setores de bebidas, alimentícios e têxteis (DENTI, 2021).

O principal direcionamento do uso de enzimas em escala industrial é a redução no tempo de ativações das mais diversas reações químicas. Devido ao fato de muitas reações não acontecerem de forma espontânea, muitas vezes por requirirem uma demanda de alta de energia de ativação (Figura 1), o papel da enzima é atuar como um catalisador e promover a redução dessa energia, permitindo que a reação ocorra sem altas demandas energéticas (LOPES; ROSSO, 2013).

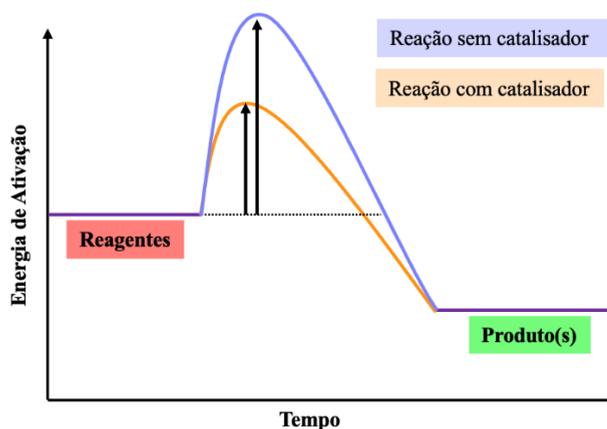


Figura 1. Gráfico de Energia de Ativação.

Fonte: Autores (2023).

Realização



Para aprimorar e ter um maior controle sobre esses biocatalisadores, o uso de técnicas de imobilização enzimática tornou-se a peça-chave nos processos industriais, pois reduz o consumo demasiado desses biocatalisadores e, conseqüentemente, um melhoramento orçamental, tendo em vista o alto custo financeiro das enzimas.

Dentre as principais técnicas de imobilização existentes, pode-se destacar as imobilizações por ligações, que são realizadas através de ligações covalentes, ligações por adsorção física, como também a imobilização por aprisionamento na matriz polimérica (encapsulamento). Imobilizar uma enzima em uma matriz polimérica consiste em aprisioná-la em pequenos espaços (poros) do suporte utilizado (Figura 2). Essa técnica permite a entrada do substrato e a saída do produto, mas não da enzima (FERNANDES, *et al.*, 2010).

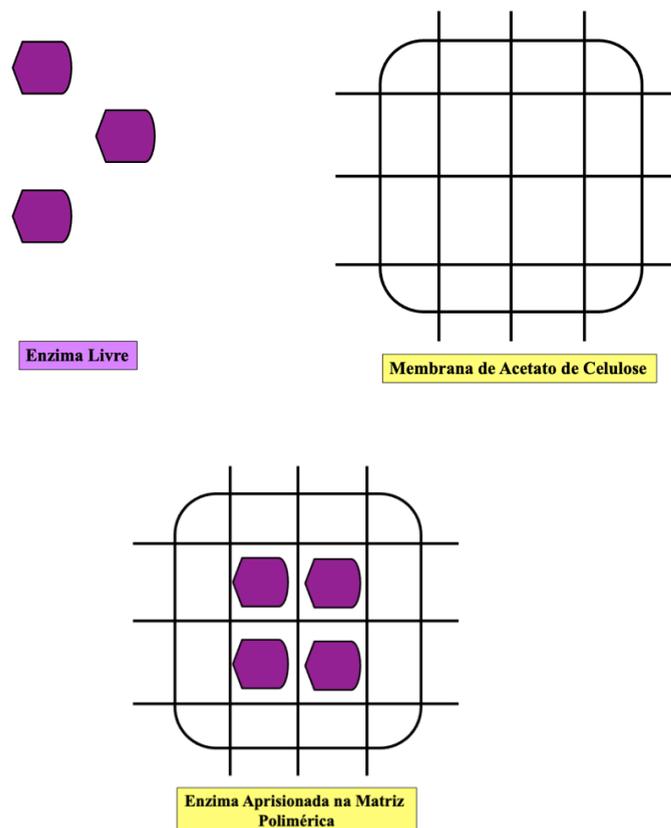


Figura 2. Imobilização por Aprisionamento.

Fonte: Autores (2023).

Realização



Outro viés das pesquisas para desenvolvimento sustentável envolve a educação ambiental. A problemática causada pelo descarte incorreto de resíduos está associada a uma série de problemas socioambientais. O óleo residual, por exemplo, acaba destinado aos solos, recursos hídricos, lixões e aterros sanitários, contaminando ambientes, o curso d'água, proliferando doenças e, além disso, em seu processo de decomposição é liberado gás metano, o que agrava o aquecimento global. Dessa forma, o seu reaproveitamento além de produzir diversos produtos com diferentes aplicações, contribui para o meio ambiente (RODRIGUES, *et al.*, 2021).

Vale também ressaltar a importância e o crescimento da síntese de enzimas por microrganismos, como no caso os fungos, tendo esse tipo de produção um grande destaque pelo seu alto rendimento e pela sua produção independente (RIGO, *et al.*, 2021).

No trabalho presente, a abordagem será no uso da imobilização por aprisionamento da enzima lipase de *Pichia pastoris*, que atua catalisando reações químicas de lipídios, em membranas de acetato de celulose, aplicada na hidrólise reaproveitando o óleo de soja residual de cozinha como substrato. O estudo se deu na análise do melhor teste de carregamento enzimático de maneira a obter a melhor oferta da atividade enzimática por cm² da membrana e posteriormente empregá-la na hidrólise do óleo de soja residual.

METODOLOGIA

Produção das membranas de acetato de celulose

Foram preparadas membranas a partir de soluções com 20% (m/m) de acetato de celulose e 80% (m/m) de N-metil-2-pirrolidona (NMP) em relação à massa total, sob agitação magnética por 24 h aproximadamente a 25°C. A solução foi espalhada sobre uma placa de Petri, com diâmetro de 5,5 cm e espessura de 0,5 cm. Em seguida, foi espalhada a solução enzimática de forma a cobrir toda a superfície e levada ao refrigerador, média de 9 °C, durante 24 horas. A membrana é então lavada com solução tampão para eliminar alguma enzima na superfície não aprisionada. Após, a atividade enzimática na membrana foi dosada.

Realização



Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de emulsão de azeite, conforme metodologia adaptada de Soares *et al.* (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 g de azeite de oliva, 10 g de água destilada, 16 mL de tampão fosfato (0,1 M e pH 7,0) e 2 g de goma arábica. Foram adicionados 4,5 mL da emulsão em Erlenmeyer e 1 cm² da membrana com a enzima imobilizada em banho com agitação a 37 °C por 5 minutos. A reação foi cessada adicionando 10 mL da solução de água:acetona:álcool na proporção de 1:1:1 (v:v:v). Adicionou-se fenolftaleína como indicador e 10 mL de hidróxido de potássio 0,05 M. Os ácidos graxos liberados foram titulados com ácido clorídrico 0,05 M, previamente padronizado. Os testes de atividade enzimática foram realizados em duplicatas.

O cálculo de atividade hidrolítica foi realizado de acordo com as Equações 1, 2 e 3:

$$A (U/cm^2) = \frac{(Vb-Va) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot cm} \quad (1)$$

Sendo: Vb é o volume gasto de ácido clorídrico na titulação do branco, em mL; Va é o volume gasto de ácido clorídrico na titulação da amostra, em mL; M é a molaridade do titulante, em mol/L; t é o tempo da reação (5 minutos); cm é o tamanho da amostra de membrana com a enzima imobilizada, em cm².

Hidrólise do óleo de soja

A hidrólise do óleo de soja residual foi realizada sob as condições de razão mássica 2:1 (óleo:água) sendo 30 mL de meio e 3 cm² do biocatalizador imobilizado picotado, por 4h em reator batelada encamisado à 55 °C e agitação de 150 rpm. Ao final da reação, o meio foi centrifugado à 5000 rpm por 10 minutos e o índice de acidez analisado. O teste foi realizado em duplicatas.

Quantificação dos ácidos graxos livres

Realização



O percentual de ácidos graxos livres (AGL) do óleo de soja foi determinado pelo método de titulação ácido/base Cd3d-63, recomendado pela AOCS (1998). Os ácidos presentes reagem com a solução de hidróxido de sódio e o resultado obtido é expresso em mg NaOH/g de amostra, determinando o índice de acidez do meio, pela presença dos ácidos graxos livres. Para isso, aproximadamente 1 grama de óleo e 3 gotas de solução de fenolftaleína foram diluídas em 15 mL de uma solução isovolumétrica de etanol e éter e titulada com uma solução de NaOH 0,05 M sob agitação vigorosa até mudança de coloração (mudança súbita de uma coloração branca para rosa). Os testes do índice de acidez foram realizados em duplicatas. O índice de acidez foi quantificado a partir da Equação 2 adaptada de Zenevitz, *et al.*, 2016.

$$AGL (\%) = \frac{V_{NaOH} \times M_{NaOH} \times MMAGL}{m \times 10} \quad (2)$$

Em que: V_{NaOH} : volume de solução de NaOH utilizado na titulação (mL); M_{NaOH} : molaridade da solução de NaOH (mol/L); $MMAGL$: massa molar média ponderada dos ácidos graxos do óleo de soja (g/mol); m : massa da amostra de óleo (g).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção da membrana de Acetato de Celulose

A membrana foi preparada a partir do acetato de celulose (Figura 3) e com a mistura da solução de preparo após posta em agitação por um período de 24h, obteve-se um gel de tonalidade levemente âmbar (Figura 4), sendo essa a base para a confecção da membrana.

Realização



Figura 3. Acetato de Celulose



Figura 4. Solução

Fonte: Autores (2023).

Obtida a solução de acetato de celulose, a mesma é espalhada em uma placa de Petri de modo uniforme (Figura 5). Embora a solução tenha a consistência de gel bem viscoso, não apresentou dificuldades para ser espalhada, sendo, portanto, de fácil manuseio.



Figura 5. Solução na Placa de Petri.

Fonte: Autores (2023).

Seguida da uniformização na placa, é despejado 1 mL da solução enzimática ainda com a solução em aspecto de gel para ser realizado o aprisionamento na matriz. Ao entrar em contato com a solução, o gel adquire uma aparência esbranquiçada e mais rígida, deixado para solidificar durante um período de 24 h em refrigeração e, a partir de então, temos a membrana (Figura 6) com a concentração enzimática de interesse para o estudo.

Realização



Figura 6. Membrana carregada enzimaticamente.

Fonte: Autores (2023).

A análise da atividade enzimática da membrana é preparada através da técnica de emulsão de azeite em um banho térmico para posterior titulação.

Para que se analisasse o melhor carregamento em termos da atividade enzimática na membrana, variou-se a concentração da solução enzimática inicial. A Tabela 1 apresenta os resultados médios obtidos.

Tabela 1. Atividade enzimática da enzima imobilizada na membrana em diferentes concentrações da solução enzimática inicial

Concentração (mg/mL)	Atividade enzimática (U/cm ²)
10	0,5 ± 0,7
15	6,0 ± 0,3
20	5,5 ± 0,7

Fonte: Autores (2023).

Os resultados demonstram que a concentração de 15 mg/mL aumentou substancialmente a atividade enzimática na membrana, comparada ao teste anterior de 10 mg/mL. Ainda, foi observado que esse aumento não ocorreu quando houve um acréscimo na concentração para 20 mg/mL. Buscar a concentração enzimática ideal é de suma importância, uma vez que a redução do uso em excesso da enzima livre e a possibilidade

Realização



de reuso da enzima imobilizada oferece uma diminuição orçamental, visto que esses biocatalisadores possuem um alto custo financeiro, como também uma redução do impacto ambiental. Assim, a concentração da solução enzimática preparada foi de 15 mg/mL, que corresponde a 0,6 mg de enzima por cm² da membrana, e então utilizada na imobilização da enzima para os testes seguintes.

Após definir a concentração ideal para a imobilização por encapsulamento da enzima, esta foi empregada na reação de hidrólise do óleo de soja residual de frituras. Ao final da reação obteve-se um hidrolisado com acidez média de $23,6 \pm 0,3$ % de ácidos graxos livres. Correia (2022) relata um rendimento na hidrólise do óleo de soja residual próximo ao obtido nesse estudo, de 22,61%, utilizando um combinado de lipases de *Burkholderia cepacia* e Pâncreas de porco em forma livre em 6 horas de reação. É interessante ressaltar que utilizando do biocatalizador imobilizado se tem a possibilidade de recuperação para posterior reuso, tornando o processo mais vantajoso.

CONCLUSÕES

Portanto, para o oferecimento de maior atividade enzimática a solução de carregamento com concentração de 15 mg/mL apresentou melhores resultados de atividade enzimática por cm² da membrana. A hidrólise enzimática do óleo de soja residual empregando a enzima imobilizada obteve o índice de acidez de $23,6 \pm 0,3$ %.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Núcleo de Processos Biotecnológicos (NUCBIO-UFU).

REFERÊNCIAS

Realização





AOCS. – American Oil Chemists Society. **Official methods and recommended practices of the AOCS.** Champaign:AOCS, 1998.

CORREIA, T. B. de A. **Avaliação de diferentes fontes de aquecimento na taxa de hidrólise de óleo residual empregando lipases imobilizadas.** 46 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Alfenas. Alfenas, 2022.

DENTI, A. F. Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações. **Revista Perspectiva**, v. 45(171), p. 97-110, 2021.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. **Revista Processos Químicos**, v. 4(7), p. 53-58, 2010.

LOPES, S., ROSSO, S. **Bio. Volume 1.** 3 ed. São Paulo: Saraiva, 2013.

RIGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G. A.; CAMERA, F. D.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão/Microbiological Production of Enzymes: a Review. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 9232–9254, 2021.

RODRIGUES, P. C. S.; VERCÍLIO, O. E.; SOUZA, DOS ANJOS, B. M. P.; L. E. F.; DE SÁ, P. E. Técnicas de reciclagem de óleo residual de fritura: ressignificando a produção de sabão e vela. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.6, p. 64187-64197, 2021.

SOARES C. M. F.; DE CASTRO H. F.; DE MORAES F. F.; ZANIN G. M. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77–79, p. 745-757, 1999.

ZENEVICZ, M. C. P.; JACQUES, A.; FURIGO, A. F.; OLIVEIRA, J. V.; DE OLIVEIRA, D. Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 235–241, 2016.

Realização