



Imobilização da Lipase Eversa Transform 2.0 pela Técnica de Jet cutter: Estudo da Estabilidade e Aplicação para Produção de Biodiesel

Palavras-Chave: Energia Renovável, Biocombustíveis, Jet Cutter

Autores/as:

Giovanna Totti Bullo / FEQ / UNICAMP

Francisco Lucas Chaves Almeida / LEMeB / DETA / FEA / UNICAMP

Prof. Dr. Marcus Bruno Soares Forte / LEMeB / DETA / FEA / UNICAMP

INTRODUÇÃO

Lipases são hidrolases α/β que possuem uma tríade de aminoácidos altamente conservados no seu sítio ativo, consistindo em uma histidina, um resíduo catalítico (glutamato ou aspartato) e um nucleofílico (serina, ácido aspártico ou cisteína) (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Visando à maior aplicabilidade de lipases em meio industrial, utiliza-se a técnica de imobilização, sendo possível separar o biocatalisador do meio reacional. Desse modo, facilita-se o reuso dessa enzima, contribuindo principalmente para redução de custos (ALTINKAYNAK et al., 2016; CHEN et al., 2017).

Ademais, a técnica de jet cutter representa uma inovação na imobilização de lipases, sendo ainda pouco abordada na literatura. Através de sua precisa ferramenta de corte, é possível obter pequenas partículas, sendo também possível trabalhar com soluções de alta viscosidade (PRÜSSE et al., 2000). Deste modo, este trabalho objetiva apresentar uma revisão sobre a imobilização de lipases para produção de biodiesel, abordando também a técnica de jet cutter.

METODOLOGIA

Tendo a vista a pandemia da covid-19, não foi possível a execução dos testes laboratoriais propostos inicialmente, assim, uma revisão bibliográfica sobre o tema foi elaborada para aprimorar ainda mais os conhecimentos do grupo na área. O levantamento bibliográfico para o desenvolvimento deste trabalho foi realizado utilizando as bases de dados do Web of Science[®] e o Google Acadêmico. Para a coleta de dados as palavras-chave “enzyme*”, “lipase*”, “lipase immobilization*” e “jet cutting” or “jet cutter” foram utilizadas. Os trabalhos encontrados foram selecionados de acordo com objetivo da revisão e posteriormente apresentados e discutidos de forma crítica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Enzimas

As enzimas são proteínas catalíticas que influenciam todas as reações bioquímicas nos organismos em decorrência de sua significativa capacidade de diminuição da energia de ativação das reações, substituindo o uso de catalisadores químicos prejudiciais ao meio ambiente. Devido à sua alta enantiosseletividade, o

principal uso das enzimas é na síntese de compostos enantiomericamente puros (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002). Ademais, ressalta-se também a vasta aplicação industrial desses compostos, que possuem como vantagem alto rendimento, baixo custo energético e baixa formação de produtos indesejáveis (CONTESINI et al., 2010; GOG et al., 2012).

Os principais tipos de enzimas são polimerases, carboidrases, nucleases, lipases e proteases (MARKETSANDMARKETS, 2020). Por meio dos processos enzimáticos industriais, é possível obter produtos como óleos, gorduras, detergentes, sucos, biocombustíveis, papel, pão, couro, farmacêuticos e soluções para agricultura (NOVOZYMES, 2017).

Lipases

Frequentemente utilizadas na indústria de alimentos para a transesterificação de gorduras e óleos, lipases (triacilglicerol acil hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas catalisadoras de reações em ambientes não-aquosos (MITTELBACH, 1990; SCHMID; VERGER, 1998). Elas catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos, e mono- e diacilgliceróis na interface água-lipídio (STERGIOU et al., 2013).

Ressalta-se que as lipases possuem seu sítio ativo coberto por uma *lid*, estrutura lipoproteica que previne o contato direto entre o substrato e o sítio ativo, sendo necessária a movimentação dessa *lid* para haver o contato do sítio ativo da lipase com o substrato, esse então é conhecido como mecanismo de ativação interfacial, quando a *lid* se move devido ao contato com a substância ou meio hidrofóbicos. Desse modo, o sítio ativo torna-se exposto ao meio e, como ambas estruturas estão fortemente adsorvidas, a atividade das lipases no substrato é facilitada, juntamente com o mecanismo catalítico dessas enzimas (VAN TILBEURGH et al., 1993).

Já em relação à aplicação de lipases, há maior uso na indústria farmacêutica, especialmente na manufatura de drogas enantiomericamente puras. No entanto, assim como as demais enzimas, observa-se um grande crescimento na aplicabilidade industrial de modo geral, o que contribui para a ocorrência de diversos processos de maneira mais sustentável e economicamente viável (MARKETSANDMARKETS, 2015), sendo a indústria de biocombustíveis um grande ramo de aplicação das lipases que vêm crescendo nos últimos anos.

Imobilização de lipases

Apesar da vasta aplicabilidade das lipases, sabe-se que muitos fatores do meio como pH, temperatura, rotação e outros podem causar a sua desnaturação e/ou afetar a sua atividade. Assim, a imobilização das lipases pode proporcionar uma proteção maior às mesmas e possibilitar a reutilização desse biocatalisador. Além disso, o processo de imobilização pode também influenciar em parâmetros como atividade, seletividade, especificidade, prevenção de inibição e pureza das lipases (DOS SANTOS et al., 2015).

Neste contexto, muitos estudos para imobilização de lipases e enzimas de uma forma geral vêm sendo desenvolvidos e encontram-se na literatura, assim, destaca-se atualmente a existência de quatro métodos de imobilização principais, sendo eles: aprisionamento ou encapsulação, adsorção, cross-linking e ligação covalente. No tocante ao aprisionamento, considerado um método físico, ele é definido como um método capaz de aprisionar a enzima em um espaço específico utilizando um suporte, tendo como principal vantagem a não

interação covalente entre enzima e suporte, diminuindo assim as possibilidades de mudanças conformacionais da enzima (ALMEIDA et al., 2021; MOHAMAD et al., 2015)

Dentre as técnicas de aprisionamento de enzimas, pode-se destacar a geleificação iônica, a qual consiste em realizar a passagem de uma gota do material encapsulante que normalmente é um polissacarídeo, com destaque para o alginato, junto com o material de interesse a ser encapsulado (lipase e/ou outra enzima) através de um bico, formando assim gotículas que caem em uma solução reticulante (cloreto de cálcio, por exemplo). Entretanto, em alguns casos é possível a aplicação de técnicas para diminuir o tamanho final das partículas e com isso, atingir uma maior eficiência na conversão de produtos, principalmente pela redução do caminho difusional do substrato (LEE; RAVINDRA; CHAN, 2013; RILEY; MUZZIO; REYES, 1997).

Jet Cutter

A técnica de Jet cutter consiste no bombeamento de uma solução através de um bico atomizador a uma vazão capaz de formar um jato contínuo que é cortado por segmentos cilíndricos contidos em uma ferramenta de corte, levando assim a produção de pequenas partículas. Ressalta-se que apesar de poucos estudos terem sido publicados sobre essa técnica, sabe-se que os principais parâmetros que afetam a produção dessas partículas são diâmetro do bico, fluxo de alimentação, número de fios de corte e velocidade de rotação da ferramenta de corte (PRÜSSE et al., 1998, 2002). A Figura 1 representa a produção de partículas utilizando duas técnicas de geleificação iônica distintas, sendo elas o gotejamento e o jet cutter.

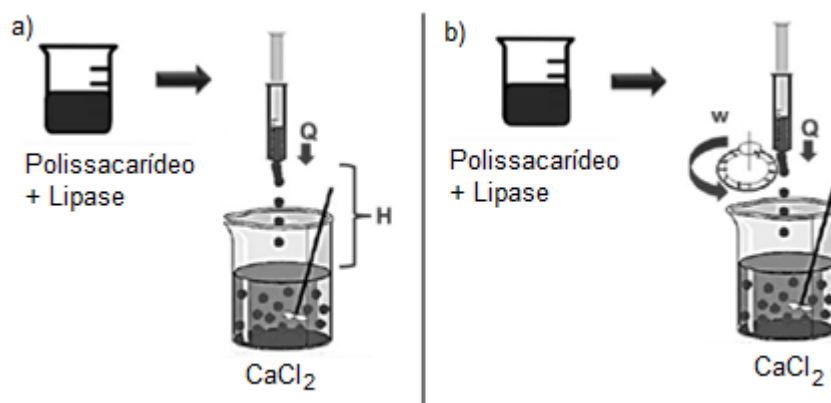


Figura 1- Esquematisação dos processos de gotejamento (a) e jet cutter (b) utilizando alginato

Fonte: (PAULO; RAMOS; PRATA, 2017)

Além das vantagens já citadas, a literatura destaca ainda que outras a taxa de produção de partículas e utilização de soluções com alta viscosidade podem ser associadas como vantagens dessa técnica. Entretanto, mesmo com essas vantagens apresentadas, poucos são os estudos utilizando a técnica de jet cutter na literatura, existindo ainda grandes lacunas a serem estudadas para se atingir uma produção uniforme, podendo-se destacar parâmetros como velocidade de rotação, fluxo de alimentação, diâmetro, número e espessura dos fios (PAULO; RAMOS; PRATA, 2017; PRÜSSE et al., 2000). Além disso, não se encontram na literatura estudos associando essa técnica a imobilização de lipases, o que pode ser amplamente explorado.

Produção de Biodiesel

O biodiesel é um tipo de biocombustível obtido a partir das reações de esterificação e transesterificação de óleos vegetais (SANDOUQA; AL-HAMAMRE, 2019). É formado por um conjunto de ésteres alquílicos

de ácidos graxos. Tendo em vista novamente a necessidade de substituição de catalisadores químicos, que são extremamente prejudiciais ao ambiente, o uso de biocatalisadores em sua produção é crucial devido à possibilidade de reuso de enzimas (LUNA et al., 2017).

Ademais, é escolhida a produção desse tipo de biocombustível pois o mesmo apresenta características como ser ambientalmente amigável, não-tóxico, com alta eficiência de combustão e baixa emissão de monóxido e dióxido de carbono em comparação ao diesel (LIMA-CORRÊA et al., 2020; SILITONGA et al., 2020).

Por fim, sabe-se também que, utilizando enzimas na produção de biodiesel, é possível obter altos rendimentos a baixas temperaturas de reação e com fácil recuperação de glicerol. Desse modo, a partir do subproduto glicerol, ocorre também a síntese de produtos com alto valor agregado, o que reduz significativamente os custos na produção desse biocombustível (AARTHY et al., 2014).

CONCLUSÕES

Após a realização deste estudo, infere-se a grande importância de lipases tanto no âmbito industrial como no meio acadêmico, em que há um importante crescimento do número de trabalhos acerca dessa temática. Observa-se também a otimização de processos na indústria em decorrência da imobilização de lipases, que proporciona maior estabilidade enzimática. Além disso, por meio da reutilização dessa enzima, é possível recuperar o produto em questão, configurando uma considerável vantagem para o mercado em termos de sustentabilidade e economia financeira.

Por fim, a produção de biodiesel utilizando lipases imobilizadas representa uma grande vantagem em termos econômicos para a indústria, uma vez que o processo é otimizado e possui maior eficiência devido à possibilidade de reuso do catalisador, além de seguir uma tendência ambientalmente amigável. O uso da técnica de jet cutter representa uma promissora maneira de imobilização de lipases, podendo proporcionar arranjos conformacionais mais convenientes com uma maior exposição dos sítios ativos das enzimas, decorrente das características específicas de corte do jato.

BIBLIOGRAFIA

1. AARTHY, M. et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1591–1601, ago. 2014.
2. ALMEIDA, F. L. C. et al. Biodiesel production by lipase-catalyzed reactions: bibliometric analysis and study of trends. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, p. bbb.2183, 23 jan. 2021.
3. ALTINKAYNAK, C. et al. A new generation approach in enzyme immobilization: Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 93–94, p. 105–112, nov. 2016.
4. CHEN, X. et al. Stereoselective biotransformation of racemic mandelic acid using immobilized laccase and (S)-mandelate dehydrogenase. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 2, dez. 2017.
5. CONTESINI, F. J. et al. **Aspergillus sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, dez. 2010.
6. DOS SANTOS, J. C. S. et al. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. **RSC Advances**, v. 5, n. 27, p. 20639–20649, 2015.
7. GOG, A. et al. **Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives** *Renewable Energy*, mar. 2012.
8. JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315–351, 1999.
9. KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. **Industrial enzyme applications** *Current Opinion in*

Biotechnology Elsevier Ltd, , ago. 2002.

10. LEE, B. B.; RAVINDRA, P.; CHAN, E. S. Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. **Chemical Engineering and Technology**, v. 36, n. 10, p. 1627–1642, 2013.

11. LIMA-CORREIA, R. A. B. et al. The enhanced activity of base metal modified MgAl mixed oxides from sol-gel hydrotalcite for ethylic transesterification. **Renewable Energy**, v. 146, p. 1984–1990, fev. 2020.

12. LUNA, C. et al. Application of enzymatic extracts from a CALB standard strain as biocatalyst within the context of conventional biodiesel production optimization. **Molecules**, v. 22, n. 11, 2017.

13. MARKETSandMARKETS. **Lipase Market by Source (Microbial Lipases, Animal Lipases), Application (Animal Feed, Dairy, Bakery, Confectionery, Others), & by Geography (North America, Europe, Asia-Pacific, Latin America, RoW) - Global Forecast to 2020**. [s.l: s.n.].

14. MARKETSandMARKETS. **Industrial Enzymes Market by Type (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases, Other Types), Source, Application (Food & Beverages, Feed, Bioethanol, Detergents, Pulp & Paper, Textiles & Leather, Wastewater Treatment, Other Applications)**,. [s.l: s.n.].

15. MITTELBACH, M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, n. 3, p. 168–170, mar. 1990.

16. MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

17. NOVOZYMES. **The Novozymes Report 2017**. [s.l: s.n.].

18. PAULO, B. B.; RAMOS, F. DE M.; PRATA, A. S. An investigation of operational parameters of jet cutting method on the size of Ca-alginate beads. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 6, p. e12591, dez. 2017.

19. PRÜSSE, U. et al. The jet cutting method as a new immobilization technique. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 2, p. 105–108, 1998.

20. PRÜSSE, U. et al. Production of spherical beads by JetCutting. **Chemical Engineering and Technology**, v. 23, n. 12, p. 1105–1110, 2000.

21. PRÜSSE, U. et al. Aus dem Institut für Technologie und Biosystemtechnik Ulf Prüße Peter Wittlich Klaus-Dieter Vorlop Ulrich Jahnz Jürgen Breford Bead production with JetCutting and rotating disk / nozzle technologies Manuskript , zu finden in www.fal.de Braunschweig Bundes. p. 1–10, 2002.

22. RILEY, M. R.; MUZZIO, F. J.; REYES, S. C. Effect of Oxygen Limitations on Monoclonal Antibody Production by Immobilized Hybridoma Cells. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 3, p. 301–310, 5 jun. 1997.

23. SANDOUQA, A.; AL-HAMAMRE, Z. Energy analysis of biodiesel production from jojoba seed oil. **Renewable Energy**, v. 130, p. 831–842, jan. 2019.

24. SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608–1633, jul. 1998.

25. SILITONGA, A. S. et al. Biodiesel synthesis from Ceiba pentandra oil by microwave irradiation-assisted transesterification: ELM modeling and optimization. **Renewable Energy**, v. 146, p. 1278–1291, 2020.

26. STERGIOU, P. Y. et al. **Advances in lipase-catalyzed esterification reactions** **Biotechnology Advances**, dez. 2013.

27. VAN TILBEURGH, H. et al. Interfacial activation of the lipase–procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 814–820, abr. 1993.