

## Lipases em reações de esterificação

## Lipases in esterification reactions

### RESUMO

Camila T. Cardoso dos Santos  
[camila.taynara@hotmail.com](mailto:camila.taynara@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná, Apucarana, Paraná,  
Brasil

Alessandra Machado Baron  
[alessandrab@utfpr.edu.br](mailto:alessandrab@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná, Apucarana, Paraná,  
Brasil

Milena Martins Andrade  
[milenaandrade@utfpr.edu.br](mailto:milenaandrade@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná, Apucarana, Paraná,  
Brasil

Patrícia Salomão Garcia  
[p.salomaogarcia@gmail.com](mailto:p.salomaogarcia@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná, Apucarana, Paraná,  
Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



A finalidade deste trabalho foi otimizar a síntese do oleato de etila catalisada por micélio contendo lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01. A fim de maximizar a variável resposta (rendimento da reação %) aplicou-se a ferramenta estatística da desejabilidade (FED) em resultados anteriores, levando em consideração os parâmetros significativos para a variável resposta: temperatura (T), quantidade de micélio (g) e razão molar (RM). As condições previstas pela FED foram temperatura (T) de 45 °C; quantidade de micélio (QLLM) acima de 1 g e razão molar ácido: álcool (RM) entre 1:1 e 1:2. Então, alguns experimentos foram realizados buscando validar os estudos previstos. A cinética de reação foi acompanhada a cada 3 h por um período de 24 h. Os resultados mostraram que o maior rendimento (90%) foi obtido a 40 °C, 1,6 g de micélio, RM 1:2 (12 h).

**PALAVRAS-CHAVE:** Biocatálise. Enzimas. Micélio.

### ABSTRACT

The purpose of this work was to optimize the synthesis of ethyl oleate catalyzed by mycelium containing lipases from *Botryosphaeria ribis* EC-01. In order to maximize the response variable (reaction yield%), the statistical desirability tool (EDF) was applied to previous results, taking into account the significant parameters for the response variable: temperature (T), quantity of mycelium (g) and molar ratio (RM). The conditions predicted by the FED were temperature (T) of 45 °C; amount of mycelium (QLLM) above 1 g and acid: alcohol (RM) molar ratio between 1: 1 and 1: 2. Then, some experiments were done to validate the predicted studies. The reaction kinetics was monitored every 3 h for a period of 24 h. The results showed that the highest yield (90%) was obtained at 40 °C, 1.6 g of mycelium, RM 1: 2 (12 h).

**KEYWORDS:** Biocatalysis. Enzymes. Mycelium.

## INTRODUÇÃO

Diversas reações fazem uso das lipases (EC 3.1.1.3), tais como, a hidrólise de ésteres de ácidos graxos e reações de síntese realizadas *in vitro* como esterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise), interesterificação e aminólise. As lipases são versáteis e com ampla aplicação no setor biotecnológico, principalmente na área química, incluindo formulação de detergentes, produção de emulsificantes e surfactantes, resolução de misturas racêmicas, síntese de ésteres, polímeros e herbicidas. As enzimas também são empregadas no setor ambiental, farmacêutico, alimentício e energético (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012).

A obtenção de lipases pode ocorrer através de tecidos de animais (pâncreas de bovinos, ovinos, suínos) e vegetais (látex de mamão, soja, aveia e sementes de mamonas) ou pela produção envolvendo o processo de fermentação submersa (FS) ou sólida (FES) de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras). Na FS, as lipases podem ser extracelulares (normalmente as empregadas na indústria), ou seja, que é secretada no meio de cultivo, e intracelular ou presente em células inteiras, neste caso, a enzima está no interior da célula ou na parede celular (CANELA-GARAYOA et al., 2014).

A biomassa (micélio) é um subproduto da fermentação, podendo ser empregada como fertilizantes, complemento de ração animal (SILVA, 2010) e em biotransformação, no caso de possuir enzimas ligadas ao micélio (BIROLLI et al., 2015). Biotransformação corresponde as reações químicas catalisadas por microrganismos ou preparações que derivam da biomassa, podendo ser realizada em meio aquoso ou orgânico. As fontes provenientes dos microrganismos são relevantes devido à estabilidade e facilidade de aquisição quando comparadas com as demais (CASTRO et al., 2004), além da propensão à produção em massa as lipases microbianas, atuam com especificidade quanto ao substrato, em ampla faixa de pH e são estáveis em altas temperaturas (PERA et al., 2014). *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi preliminarmente selecionado como um bom produtor de lipases quando cultivado em diferentes óleos vegetais e glicerol através de fermentação submersa (FS) dentre outros isolados fúngicos do gênero *Botryosphaeria*, por ser endofítico e conhecido por secretar diferentes enzimas. (MESSIAS et al., 2009).

Tendo em vista a possibilidade de aproveitamento do micélio contendo lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas, o objetivo deste trabalho foi estudar a esterificação oleato de etila catalisada por estas enzimas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Depois do cultivo do microrganismo e a produção das lipases, as células (micélio) foram separadas por filtração e secas em liofilizador.

A atividade de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) catalisada pelas lipases ligadas ao micélio foi determinada baseado no método de Winkler e Stuckmann (1979) ( $2,71 \pm 0,27 \text{ U mg}^{-1}$ ).

Igarashi (2018) utilizou as lipases de *B. ribis* ligadas no micélio em reações de esterificação do oleato de etila. Neste estudo, o melhor rendimento em éster (90%) foi obtido para as condições 40 °C, quantidade de micélio (QLLM) de 1 g, RM

1:1 e 24 h. Baseado nestes resultados, o presente trabalho utilizou a ferramenta estatística da desejabilidade (FED), a fim de maximizar a variável resposta (rendimento da reação %). Além disso, a cinética foi acompanhada a cada 3 h até 24 h. As condições preditas pela FED foram temperatura (T) de 45 °C; quantidade de micélio (QLLM) acima de 1 g e razão molar ácido:álcool (RM) entre 1:1 e 1:2. Por isso, alguns experimentos foram realizados com a finalidade de validar as condições preditas pela FED (Tabela 1):

Tabela 1. Condições reacionais para otimização da síntese do oleato de etila catalisada por lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio.

Experimento	Temperatura (°C)	QLLM <sup>(1)</sup>	RM <sup>(2)</sup>
1	45	1	1:2
2	40	1	1:2
3	40	1,6	1:2 (adição em 1 etapa)
4	40	1,6	1:2 (adição em 3 etapas)

Fonte: Autoria própria.

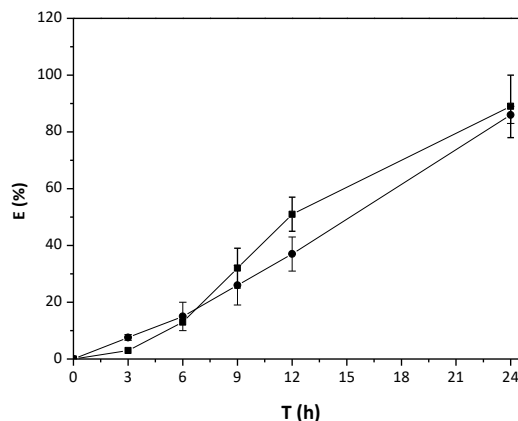
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de validar a ferramenta estatística de desejabilidade (FED), que indicou maximização do rendimento da esterificação para as condições: (T) de 45 °C; quantidade de micélio (QLLM) acima de 1 g e razão molar ácido:álcool (RM) entre 1:1 e 1:2, os resultados obtidos para o primeiro experimento (45 °C, 1 g de QLLM e RM 1:2) podem ser observados na Figura 1. O rendimento da reação foi próximo a 90% (24 h), resultado semelhante ao obtido por Igarashi (2018) (90% de rendimento a 40 °C; 1 g de micélio e RM de 1:1). Porém, a referida autora utilizou menor temperatura e RM, ou seja, para catalisadores enzimáticos e economia atômica nas reações em geral, temperaturas e RM menores são requeridas. Em seguida, a temperatura foi diminuída para 40 °C, mas as demais condições foram mantidas (Figura 1). Neste caso, o rendimento em éster foi também próximo a 90%, ou seja, é possível diminuir a temperatura de 45 para 40 °C sem prejuízos no rendimento da reação.

O teste de desejabilidade sugeriu ainda que, quantidades de micélio superiores a 1 g poderiam aumentar o rendimento da reação. Por isso, a quantidade de micélio foi aumentada de 1 g para 1,6 g (Experimento 3) (Figura 2).

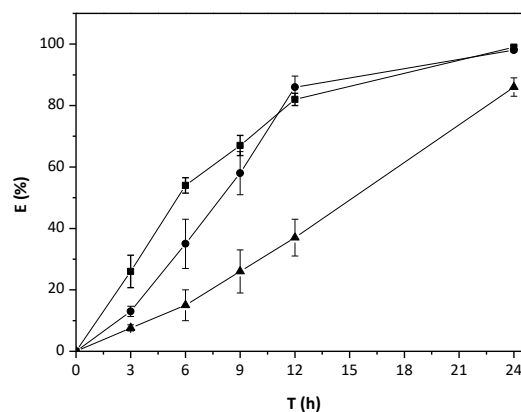
Outro fator considerável estudado neste trabalho está relacionado ao uso de etanol como reagente, sendo hidrofílico, pode favorecer a desnaturação da enzima devido à remoção da água de hidratação necessária para a manutenção da estrutura cataliticamente ativa (VERDASCO-MARTÍN et al., 2016). A inativação da enzima pode acontecer também por inibição competitiva, no qual moléculas do álcool se ligam de forma reversível ao sítio ativo da enzima, diminuindo o acesso do substrato hidrofóbico (PEREZ et al., 2014). Para minimizar este inconveniente, o experimento 4 foi importante para avaliar a influência da adição do etanol em etapas.

Figura 1 – Cinética de esterificação entre ácido oleico e etanol empregando lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio (●) 45 e (■) 40 °C. Condições: Razão molar ácido: álcool (1:2); 120 rpm; 1 g de micélio; 10 mL de *n*-hexano. Experimentos em triplicata com representação de desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

Figura 2 – Cinética de esterificação entre ácido oleico e etanol empregando lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio (▲) 1 g de micélio; (●) 1,6 g de micélio e etanol adicionado em 3 etapas e (■) 1,6 g de micélio e etanol adicionado em 1 etapa. Condições: 40 °C; Razão molar ácido: álcool (1:2); 120 rpm; 10 mL de *n*-hexano. Experimentos em triplicata com representação de desvio padrão.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados indicaram (Figura 2) que foi possível reduzir o tempo da reação à metade (12 h), mantendo o mesmo rendimento (90%) para as condições (3) e (4). Além disso, em 6 h de reação, a produção de éster foi aproximadamente 30% superior para a reação onde o etanol foi adicionado em etapas. Após este tempo, ambas reações (3) e (4) atingiram rendimento muito próximos a 100% em 24 h. Estes resultados indicam a importância do referido estudo e sugere que o rendimento de 100% possa ser atingido possivelmente em 15 h para a reação onde o etanol foi adicionado em etapas, considerando que a reação está na velocidade inicial (região linear).

Em relação à utilização de lipases ligadas ao micélio em reações de esterificação, alguns trabalhos encontrados na literatura estão expostos no Quadro 1.

Zanotto et al. (2009) usou micélio contendo lipases provenientes de fungos isolados de algumas plantas da região amazônica, encontrando melhor resultado

na esterificação do oleato de pentila (98%, 72 h) para lipases ligadas ao micélio do fungo codificado como UEA\_115.

Solarte et al. (2014) empregou lipases ligadas ao micélio de *Aspergillus flavus* para síntese do laurato de etila com rendimento de 96% (24 h).

Oliveira et al. (2017) sintetizou decanoato de butila obtendo 100% (24 h) de rendimento utilizando lipases de *Aspergillus ibericus*, produzindo ésteres aromáticos aplicados na indústria alimentícia.

De Castro et al. (2017) utilizou lipases ligadas ao micélio oriundo de *Aspergillus westerdijkiae* pra síntese do oleato de etila, apresentando rendimento de 35% (24 h), representando uma alternativa para produção do biodiesel.

Kirdi et al. (2017) utilizou lipases ligadas ao micélio de *Aspergillus oryzae* na reação de esterificação do acetato de cis-3-hexen-1-ilo em solvente orgânico, com 98% (12 h) de rendimento.

Quadro 1 - Trabalhos que reportam a utilização de lipases ligadas em micélio.

Lipase	Condições	Principais resultados	Ref
UEA_115	Síntese do oleato de pentila: 6,66 mmol ácido oléico e n- pentanol, 30 mL n-hexano, 28 °C, 50 mg de micélio, 72 h	91% de rendimento em éster	(ZANOTTO et al., 2009)
A. <i>Flavus</i>	Síntese do laurato de etila: Ácido láurico 0,125 mmol mL <sup>-1</sup> , 0,250 mmol mL <sup>-1</sup> de etanol em n - hexano, 40 °C, 20 mg de micélio, 24 h	96% de rendimento em éster	(SOLARTE et al., 2014)
A. <i>Ibericus</i>	Síntese do decanoato de butila: 5 mL de ácido decanóico e butanol, 37 °C, 10% (p / v) de micélio, 24 h	100% de rendimento em éster	(OLIVEIRA et al., 2017)
A. <i>Westerdijkiae</i>	Síntese do oleato de etila: Ácido oléico 100 mM, 200 mM de etanol, 40 °C, 20 mg de micélio, 24 h	35% de rendimento em éster	(DE CASTRO et al., 2017)
A. <i>Oryzae</i>	Síntese do acetato de cis-3-hexen-1-ilo: Ácido acético mM, 50 mM de cis-3-hexen-1-ol, 70 °C, 30 g L <sup>-1</sup> de micélio, 24 h	98% de rendimento em éster	(KIRDI et al., 2017)
B. <i>Ribis</i>	Síntese do oleato de etila: Ácido oléico 0,76 mmol, 1,5 mmol de etanol, 10 mL n- hexano, 40 °C, 1,6 g de micélio, 12 h	90% de rendimento em éster	Este trabalho

Fonte: Autoria própria (2020).

Destaca-se que as diferenças nos percentuais do rendimento em éster não devem ser avaliadas isoladamente e sim analisadas pelo conjunto das condições, que se diferem a cada bibliografia. Assim, a viabilidade é determinada pelos respectivos parâmetros: rendimento, tempo, temperatura, quantidade de reagentes e quantidade de enzima. Apesar destas diferenças, pode-se considerar que os resultados obtidos neste trabalho são promissores e inéditos no que diz respeito à aplicação do micélio de *B. ribis* contendo lipases.

Outros experimentos, como por exemplo, utilizando a RM 1:1 com 1,6 g de micélio será realizado a fim de verificar se é possível obter rendimentos próximos a 90% em 12 h.

## CONCLUSÃO

Para a reação de ácido oleico com etanol, as lipases *B. ribis* EC-01 ligadas ao micélio, demonstraram resultados próximos a 90% de rendimento, nas condições: 40 °C; Razão molar ácido:álcool (1:2) e quantidade de micélio 1,6 g.

## AGRADECIMENTOS

Universidade tecnológica federal do Paraná (UTFPR).

Fundação Araucária pela concessão da bolsa.

## REFERÊNCIAS

BIROLI, W. G. et al. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview . **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 481–510, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.001> Acesso em: 30 ago. 2020.

CANELA-GARAYOA, R. et al. Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 78-83, 2014.

CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **CIATEC – UPF**, v. 4, p. 1-14, 2012.

DE CASTRO, F. F. et al. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus westerdijkae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 321-328, 2017.

IGARASHI, G. S. **Biotransformação empregando lipases ligadas ao micélio**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2018.

KIRDI, R. et al. Mycelium-bound lipase from *Aspergillus oryzae* as efficient biocatalyst for cis-3-hexen-1-yl acetate synthesis in organic solvent. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 13-19, 2017.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MESSIAS, J. M. **Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes fontes de carbono**. 2008. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp123462.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2020.

OLIVEIRA, F. et al. Optimization of lipase production by *Aspergillus ibericus* from oil cakes and its application in esterification reactions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 268-277, 2017.

PERA, L. M. et al. Activity and stability of lipase preparations from *Penicillium corylophilum*: potential use in biocatalysis. **Chemical Engineering Technology**, v. 37, n. 11, p. 1987-1992, 2014.

PEREZ, V. H. et al. Biocatálise heterogênea em fase sólido/gás: princípios e aplicações. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 323-330, 2014. Disponível em: <http://static.sites.sbg.org.br/quimicanova.sbg.org.br/pdf/v37n2a21.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2020.

SILVA, T. A. C. **Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lipases produzidas pelo fungo *Cercospora kikuchii***. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2010. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-13122010-162349/publico/13122010.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2020.

SOLARTE, C. et al. Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 78-83, 2014.

VERDASCO-MARTÍNA, C. M. et al. Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. **Biochemical Engineering Journal**. v. 111, p. 75-86, 2016.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC218088/pdf/jbacter00283-0017.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2020.

ZANOTTO, S. et al. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from amazonian fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1046-1059, 2009.