

Título do Projeto de Iniciação Científica: “Estudo funcional de uma nova lipase recombinante visando a produção de biohidrocarbonetos e biocombustíveis”

Orientadora Responsável: Leticia Zanphorlin

1. Enunciado do problema: Considerando o aumento da demanda por energia e combustíveis, atrelado às necessidades de redução da emissão de poluentes, novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas para a aplicação e utilização de energias renováveis. O setor de transporte de caminhões pesados e aéreo também tem sido pressionado a reduzir suas emissões de CO₂ na atmosfera. Atualmente, novas metas foram traçadas para empresas ligadas a International Air Transport Association: atingir um crescimento neutro em carbono até 2020 e reduzir em 50% as emissões líquidas de dióxido de carbono até 2050 (IATA, 2013). O setor de transporte aéreo, que utiliza o querosene de aviação de origem fóssil, é responsável por cerca de 2% das emissões de CO₂ no mundo. Apesar de representar um baixo índice de emissão, este setor contribui com as emissões mais prejudiciais, devido à incidência direta em grandes altitudes sobre a concentração de gases estufa, o que leva a uma intensificação do fenômeno do aquecimento global (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas). Neste cenário, o bioetanol, produzido por fermentação do açúcar, e o biodiesel, sintetizado por transesterificação de óleos vegetais, gorduras animais ou óleos residuais, são os principais biocombustíveis de primeira geração utilizados como alternativa aos combustíveis fósseis (Yan et al., 2015). O biodiesel apesar de já ser utilizado em misturas com o petrodiesel possui algumas propriedades indesejadas como, por exemplo, oxidação de peças, dentre outros problemas que limitam seu uso como B100. Desta forma, biocombustíveis mais avançados, que apresentam propriedades superiores, vêm sendo desenvolvidos (Yan et al., 2015). Os chamados biocombustíveis drop-in, constituídos de misturas de biohidrocarbonetos, são considerados ideais para substituição dos combustíveis fósseis utilizados no setor de transportes, uma vez que possuem composições químicas e características físicas semelhantes aos combustíveis convencionais de petróleo (Xu et al., 2017). Dentre os biocombustíveis drop-in destacam-se o diesel verde e o bioquerosene. O diesel verde possui hidrocarbonetos similares aos encontrados no diesel convencional de petróleo, entretanto, não possui oxigênio em sua composição. Além disso, pode ser utilizado em qualquer teor em

motores, não absorve água, o que faz com que não ocorra a degradação microbiológica do combustível e nem a formação de borra e bolsões de água, que causam corrosão e danos aos motores. Entretanto, sabe-se que a produção dos biohidrocarbonetos ainda é um desafio para o setor de biocombustíveis, uma vez que os processos de síntese envolvem tecnologias mais complexas e parâmetros de qualidade rígidos. O hidrotratamento químico de acilglicerídeos, ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos consiste em uma das rotas mais utilizadas para produção dos biohidrocarbonetos. Entretanto, estes processos requerem catalisadores metálicos de alto custo, altas pressões e temperaturas, o que os desfavorece economicamente, além de serem ambientalmente não amigáveis (Yan et al., 2015). O nosso grupo de pesquisa juntamente com outros pesquisadores do CTBE estão propondo uma nova rota para produção de biohidrocarbonetos via reação enzimática que podem ser precursores para biocombustíveis drop-in e outras aplicações da química verde. De acordo com essa rota, seria possível sintetizar biodiesel, diesel verde e bioquerosene de maneira integrada, conforme apresentado na Figura 1, a seguir:



Figura 1- Rota proposta para síntese enzimática de biodiesel, diesel verde e bioquerosene.

Por meio dessa nova rota, o óleo vegetal, composto majoritariamente por triglicerídeos, é transesterificado através de lipases na presença de álcool, formando biodiesel e glicerina como subproduto. Utilizando a mesma lipase, na presença de água, o óleo vegetal é também hidrolisado. Os ácidos graxos produzidos na hidrólise passam por uma etapa de descarboxilação enzimática, formando os biohidrocarbonetos. Finalmente, os biohidrocarbonetos formados são submetidos a um processo de hidrogenação, produzindo o diesel verde e o bioquerosene. Uma das grandes vantagens deste processo consiste no fato de que condições operacionais mais brandas são admitidas. Além disso, a utilização de enzimas "home-made" faria deste processo uma

rota inovadora e economicamente viável. O processo de hidrólise lipolítica seguido de descarboxilação enzimática mostra-se muito eficiente e promissor (Yan et al., 2015; Xu et al., 2017), uma vez que produz biocombustíveis através de triglicerídeos e ácidos graxos livres, que são muito abundantes e disponíveis no Brasil. Para a produção de biodiesel, sabe-se que a transesterificação com catalisador homogêneo alcalino é a rota utilizada industrialmente. Entretanto, esta rota tem baixa tolerância por ácidos graxos livres, uma vez que estes últimos reagem com o componente alcalino, formando sabão (saponificação). Desta forma, a utilização de óleos crus e residuais como matérias-primas, que são mais baratas, fica impossibilitada. Uma das principais vantagens do uso de lipases na produção de biodiesel é o fato de essas enzimas também catalisarem a reação de esterificação de ácidos graxos livres na presença de solventes orgânicos, solucionando, dessa forma, os problemas da rota convencional (Zdarta et al., 2017; Amini et al., 2017).

2. Objetivo da proposta: O objetivo geral desse projeto de iniciação científica é utilizar uma nova lipase recombinante para realizar hidrólise de óleos vegetais (soja, palma, milho, canola, residual e macaúba) e residual. O nosso grupo de pesquisa já possui a expressão e purificação de uma nova lipase recombinante do fungo *Rasamsonia emersonii* padronizadas. Portanto, o aluno deverá investigar as melhores condições de atividade em substrato sintético; uma vez definido esses parâmetros serão feitos os testes de transesterificação e hidrólise. Dessa forma, os objetivos específicos são: i) Expressar e purificar lipase recombinante; ii) Realizar testes de pH e temperatura utilizando substrato sintético iii) Realizar testes de hidrólise utilizando óleos vegetais e residual

3. Cronograma:

Atividade	Trimestre 1	Trimestre 2	Trimestre 3	Trimestre 4
Item i	X	X	X	
Item ii		X	X	
Item iii			X	X

4. Metodologia: Para expressão e purificação, serão utilizadas metodologias já padronizadas pelo nosso grupo de pesquisa. Resumidamente, a lipase recombinante será expressa em cepa de E.coli pRARE II à 20°C, overnight. Após esse procedimento, as células serão centrifugadas, reessuspendidas em tampão de lise e então “quebradas” por sonicação. A solução lisada será centrifugada e o sobrenadante será purificado por cromatografia de afinidade à níquel. A pureza da amostra será confirmada por gel SDS-PAGE. A atividade da lipase purificada será aferida utilizando substrato comercial pNP (p-nitrophenol) (Ferrarezi et al., 2014). As condições serão inicialmente padronizadas como 10 µL de enzima, 40 µL de tampão fosfato pH 6,5 e 50 µL de meio reacional contendo substrato, triton X-100 e goma arábica (3%, m/v), a 37 °C. A reação será interrompida pela adição de 100 µL de solução saturada de tetraborato de sódio (Na₂B₄O₇). O p-nitrofenolato liberado enzimaticamente será quantificado utilizando espectrofotômetro à 410 nm. A unidade (U) será definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um µmol do substrato em um minuto (µmols/min), nas condições de ensaio. As reações de hidrólise serão realizadas na temperatura ótima da enzima segundo Marotti et al., 2017. Parâmetros como tempo de reação, razão molar água:óleo e concentração de enzima serão avaliadas. Os ácidos graxos liberados após a hidrólise serão quantificados por metodologia de titulação volumétrica (Marotti et al., 2017).

5. Referências: AMINI, Z. et al. *Energy Conversion and Management*, v.141, p.339–353, 2017. FERRAREZI, A.L et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.107, p.106–113, 2014. IATA. *Technology Roadmap - International Air Transport Association*. Ed. 4, 2013. MAROTTI, B.S. et al. *Quim. Nova*, v.40, No. 4, p. 427-435, 2017. XU, H. et al. *Biotechnol. Biofuels*, v. 10, p. 208, 2017. Yan J. et al. *Biotechnol. Biofuels* v.8, p.34, 2015. ZDARTA, J. et al. *Catalysts*, v.7, p.14, 2017.