

## **PRODUÇÃO DE OLEATO DE ETILA: ESTUDO DA EFICIÊNCIA CATALÍTICA DE ENZIMAS COMBINADAS**

**Pedro Henrique de Lima Gomes<sup>1</sup>, José Cleiton Sousa dos Santos<sup>2</sup>, Aluísio Marques da Fonseca<sup>3</sup>, Maria Rafele Costa Feitosa<sup>4</sup>, Maria Cristiane Martins de Souza<sup>5</sup>**

**Resumo:** A produção de oleato de etila desperta interesse uma vez que seu campo de utilização pela indústria é vasto, sendo usado na indústria alimentícia, cosmética e na de combustíveis, com a produção de biodiesel. A atuação de lipases como biocatalisadores em sínteses enzimáticas vem crescendo ao longo dos anos devido à sua ótima especificidade ao substrato, estereosseletividade, e dentre outras vantagens por gerar menor impacto ao meio ambiente comparando-se aos processos normalmente utilizados pela indústria. O presente estudo fez uso de enzimas combinadas propondo melhores valores de conversão na síntese de oleato de etila. A síntese de oleato de etila ocorreu por esterificação na presença da combinação entre as enzimas comerciais (Novozym® 435, Lipozym® TL-IM e Lipozym® RM-IM). As reações ocorreram no interior de tubos eppendorfs de 2 ml e para ajustar a temperatura e agitação desejada, usou-se um banho Maria do tipo dubnoff. Dentre as reações realizadas, a que usou a combinação de 75% de Lipozym® RM-IM e 25% de Novozym®435 alcançou o melhor resultado, chegando a uma conversão de 86,54%, enquanto a combinação que registrou a pior conversão, entorno de 70,11%, foi constituída de 75% de Lipozym® TL-IM e 25% de Lipozym® RM-IM. Os ciclos de reação consecutivos mostraram uma manutenção da produção de oleato de etila de 96% para a combinação de 75% de RM-IM e 25% de Novozym®435.

**Palavras-chave:** Combinação de enzimas. Esterificação. Oleato de etila. Ciclos.

## **INTRODUÇÃO**

O oleato de etila é um éster etílico que encontra ampla aplicação nas indústrias de cosméticos e aditivos alimentares, e na de combustíveis servindo como aditivo para diesel e como biodiesel (SOUZA,2013). As lipases são específicas, seletivas e mais utilizadas na biocatálise devido à sua capacidade de se adequar a uma ampla gama de substratos, elevada estabilidade para variados parâmetros e meios reacionais, e pode catalisar variadas reações,

<sup>1</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: pedrodubass@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: jcs@unilab.edu.br

<sup>3</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, e-mail: aluisiomf@unilab.edu.br

<sup>4</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: rafaelecf@yahoo.com

<sup>5</sup> Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: mariacristiane@unilab.edu.br

como a do biodiesel (SANTOS, 2015). Para aplicações industriais é requerida a estabilidade enzimática no meio de reação, permitindo reações de vários lotes. Portanto, os biocatalisadores devem ser submetidos a vários ciclos de esterificação nas condições ideais para verificar a viabilidade de um processo repetido (ALVES, *et al.*, 2014). Este trabalho possui como objetivo verificar a melhor combinação de lipases entre a Novozym® 435, Lipozym® TL-IM e Lipozym® RM-IM, e sua manutenção da atividade catalítica na síntese do oleato de etila nas melhores condições obtidas em um estudo anterior realizado por Souza (2013).

## METODOLOGIA

### *Materiais*

As enzimas comerciais Lipozym® TL-IM, Novozym®435 e Lipozym® RM-IM foram doadas pela Novozymes A/S (Espanha), ácido oleico foi obtido da Synth (São Paulo, Brasil). Os demais reagentes foram de grau analítico.

### *Combinação de enzimas*

Foram geradas as seguintes combinações entre os diferentes biocatalisadores: Lipozym® TL-IM e Lipozym® RM-IM; Lipozym® TL-IM e Novozym®435; e Lipozym® RM-IM e Novozym®435.

### *Síntese de oleato de etila*

A síntese de oleato de etila foi realizada por meio da esterificação de 600µl de ácido oleico e 111µl de etanol, para uma razão molar 1:1, na presença das diferentes combinações de enzimas apresentadas. O quantitativo dos reagentes mencionados aqui teve como base a reação do oleato de etila realizada por Souza (2013). As reações ocorreram em frascos de 2ml a 37°C e 150 RPM gerados por um banho termostático para um período de até 24 horas.

### *Determinação do índice de acidez e da conversão em ésteres*

Por meio do gotejamento de uma solução de NaOH 0,2 molar titulou-se a massa da amostra a ser analisada (MA), etanol neutralizado e 3 gotas de fenolftaleína contidos em um erlenmeyer até o aparecimento da cor rosa clara permanente. Para determinação do índice de acidez (1) e do valor da conversão em ésteres (2) usaram-se as equações (SANTOS, 2011).

$$IA(mgNaOH/g) = \text{III}_{NaOH} \times MM_{NaOH} \times f \times \left( \frac{V_{NaOH}}{MA} \right) \quad (1)$$

$$Conversão(\%) = \frac{IA - IA_b}{IA_b} \quad (2)$$

Com base no valor de MA e do volume de NaOH gasto na titulação foi determinado o índice de acidez (IA). Já a conversão em ésteres foi obtida pela divisão do resultado da subtração entre o IA do branco e o IA da amostra pelo IA do branco.

### *Estabilidade operacional para a melhor combinação de enzimas*

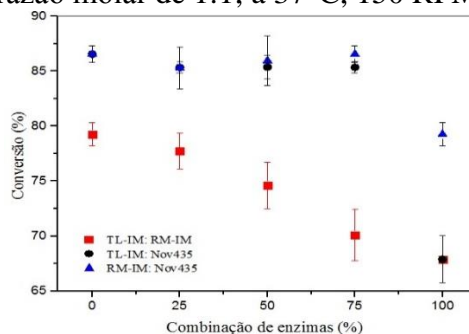
A estabilidade operacional por reação de esterificação foi realizada através da síntese consecutiva de oleato de etila, conforme descrito acima no item referente a síntese de oleato de etila. Antes de cada ciclo, as enzimas foram lavadas com hexano para a remoção de produtos e substrato não reagido (SOUZA,2013).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das reações realizadas a melhor conversão alcançou 86,54% utilizando uma combinação de 75% de Lipozym® RM-IM e 25% de Novozym®435, enquanto a pior conversão chegou a 70,11% com 75% de Lipozym® TL-IM e 25% de Lipozym® RM-IM. Por ser um sistema heterogêneo e livre de solvente a taxa de transferência de massa é limitada devido às baixas taxas de difusão do reagente para o sítio ativo da enzima (RICHETTI, 2009).

Analisando a figura 1, observa-se que há um aumento da conversão à medida que a combinação percentual da Lipozym® TL-IM é reduzida junto a Lipozym® RM-IM. Entretanto, para as combinações percentuais junto a Novozym® 435, não foi observado aumento nem redução na conversão obtida. Se compararmos sua conversão individual de 67,87% com os das combinações, observamos que a Lipozym® TL-IM combinada com as outras enzimas tem sua conversão melhorada.

Figura 1- Conversões da síntese de oleato de etila para as combinações de enzimas Lipozym® TL-IM e Lipozym® RM-IM (■), Lipozym® TL-IM e Novozym® 435(●), e Lipozym® RM-IM e Novozym® 435 (▲); razão molar de 1:1; a 37°C, 150 RPM e 24 horas de reação.

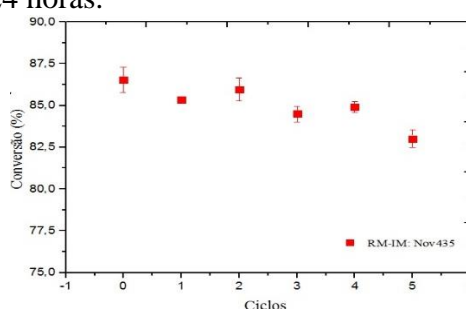


Fonte: Autor

Ao avaliarmos a combinação entre a Lipozym® RM-IM e Novozym® 435, observamos um pequeno aumento da conversão à medida que a combinação percentual da

Lipozym® RM-IM é aumentada junto a Novozym® 435. Aguiéiras, Souza e Langone (2013) usando a Lipozym® RM-IM obtiveram conversões superiores a 90% na síntese de oleato de etila em um reator batelada fechado a 40°C após 2h de reação. Já Souza (2013) utilizando a Novozym® 435 observou uma conversão de 90% em 24h a 37°C sob agitação orbital. O uso individual das lipases Novozym® 435 e Lipozym® RM-IM tiveram uma melhor conversão comparando-se com suas combinações. O comportamento da Novozym® 435 pode ser justificado pela sua capacidade, como lipase não-específica, de poder catalisar o substrato independente da região do grupo funcional, ao contrário das lipases 1,3 específicas (Lipozym® TL-IM e RM-IM) que são regioseletivas (VÉRAS, 2012).

Figura 2 - Estabilidade operacional da síntese de oleato de etila para a combinação de enzimas constituída de 75% de Lipozym® RM-IM e 25% de Novozym® 435 (■); razão molar de 1:1; a 37°C, 150 RPM e ciclo de 24 horas.



Fonte: Autor

A Figura 2 ilustra a manutenção da atividade catalítica após 5 ciclos para a combinação de enzimas (75% de Lipozym® RM-IM e 25% de Novozym®435), melhor conversão para a reação de oleato de etila. Essa combinação manteve 96% de atividade catalítica ao final dos ciclos de reação consecutivos. Essa redução, de 4% após 5 ciclos, da atividade catalítica, pode estar relacionada à perda de massa catalítica após o procedimento de reuso das enzimas. Estudos conduzidos por Alves et al. (2014), mostraram que a combinação de enzimas (80% de Lipozym® RM-IM e 20% de Novozym®435) manteve 90% de atividade catalítica ao final de 15 ciclos, mostrando coerência dos dados obtidos nesse trabalho e ressaltando o potencial alternativa à catálise química que é prejudicial ao meio ambiente.

## CONCLUSÕES

A combinação de enzimas foi favorável para o aumento da conversão nas situações em que existe o aumento da presença da Lipozym® RM-IM ou Novozym® 435 junto a Lipozym® TL-IM, e Lipozym® RM-IM junto a Novozym® 435, por exemplo, o uso de 25%

de Novozym® 435 junto a 75% de Lipozym® TL-IM elevou a conversão de 67,87% para 85,35%. Entretanto, o sentido inverso desfavorece a conversão. A combinação de 75% de RM-IM e 25% de Novozym®435 alcançou 86,54%, sendo o melhor resultado. Os ciclos de reação operacional mostraram que a manutenção da conversão por Lipozym® RM-IM junto a Novozym® 435 pode ser vantajoso para a produção de ésteres. Contudo, foi verificado que enzimas combinadas podem aumentar o rendimento da síntese de oleato de etila.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UNILAB pela bolsa de iniciação científica, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível.

### REFERÊNCIAS

AGUIEIRAS, E. C. G.; SOUZA, S. L.; LANGONE, M. A. P. **Estudo do comportamento da lipase comercial Lipozyme RM IM em reações de esterificação para obtenção de biodiesel.** *Quím. Nova.* 2013, vol.36, n.5, pp.646-650. ISSN 0100-4042.

PINHEIRO, Maísa Pessoa. Et al. 2015. Produção enzimática de oleato de etila catalisada pela lipase de *Candida* sp.imobilizada em suporte macroporoso (immobead-350). **10º Congresso internacional de bioenergia**, 2015.

SOUZA, Maria Cristiane Martins de. **Imobilização de lipase de *Candida Antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres.** 2013. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

RICHETTI, Aline. **Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente.** 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SANTOS, José Cleiton Sousa dos. **Otimização de biocatalizadores: desenvolvimento de estratégias para modulação de propriedades de enzimas por técnicas físicas e químicas.** 2015. 333 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SANTOS, José Cleiton Sousa dos. **Estudo de parâmetros nas reações de síntese enzimática de biodiesel por intermédio de fluidos supercríticos.** 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

VÉRAS, Ilvania Costa. **Expressão heteróloga de lipases modificadas para melhoramento do processo de produção enzimática de biodiesel.** 2012. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.