

UM SISTEMA DE REAÇÃO DE HIDROESTERIFICAÇÃO PARA PRODUIR ÉSTERES DE XILOSE USANDO ÓLEO DE SOJA DEGOMADO COMO SUBSTRATO

Felipe Cardoso Miranda (IC)¹, Prof. Dr. José Renato Guimarães (PQ)¹

¹Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) – Instituto de Recursos Naturais

Palavras-chave: óleo de soja degomado, hidrólise e esterificação catalisadas por lipase, projeto experimental, ésteres de ácidos graxos de xilose, propriedades emulsificantes.

Introdução

Os ésteres de açúcar derivados de ácidos graxos são surfactantes com um conjunto de propriedades muito interessantes: são não iônicos, biodegradáveis, inodoros, não irritantes, não tóxicos, com alto efeito emulsificante/detergente etc. Portanto, os ésteres de ácidos graxos de açúcar (SFAEs) são amplamente aplicados nos setores farmacêutico, cosmético, de detergentes, alimentício e biomédico. Os SFAEs podem ser produzidos a partir de monossacarídeos ou oligossacarídeos com diferentes ácidos graxos ou seus derivados. Os açúcares mais utilizados são a sacarose, a glicose, a frutose, a xilose, a lactose ou o sorbitol (Gonçalves et al., 2021a). O uso de xilose (aceptor de acila) na síntese de SFAEs tem sido pouco evidenciado na literatura, e essa lacuna abre o horizonte para o desenvolvimento de mais pesquisas nessa área. A síntese de SFAEs pode ser realizada por meio de catalisadores químicos ou enzimáticos (Gonçalves et al., 2021b). A síntese enzimática é uma alternativa interessante que oferece vantagens como condições de reação brandas, alta seletividade que evita a formação de subprodutos, fácil separação de produtos e operação simples. De fato, a síntese de vários surfactantes de ésteres de açúcar catalisados por lipases em solventes orgânicos foi descrita na literatura. Os SFAEs podem ser obtidos por esterificação direta de ácidos graxos livres ou transesterificação entre ésteres monoalquílicos e o açúcar desejado (Gonçalves et al., 2021b; Yoo et al., 2007). A hidroesterificação, um processo sequencial de hidrólise de óleo/gordura seguido pela purificação de ácidos graxos e sua posterior esterificação, não foi descrita na literatura nesses tipos de processos. A principal vantagem dessa estratégia é a remoção do glicerol após a etapa de hidrólise e purificação dos AGLs. Isso permite que esse poliálcool não atue como um álcool competitivo para os aceptores de acila usados na reação de esterificação (Monteiro et al., 2023). Neste estudo, o objetivo é obter ésteres de xilose por meio de uma estratégia de hidroesterificação em um processo enzimático de duas etapas, começando pela hidrólise enzimática do óleo de soja degomado (DSO) para obter uma fração rica em

AGLs. Diferentes lipases imobilizadas no Purolite Lifetech EC8806F foram avaliadas nessa etapa. Foram estudadas as variáveis mais relevantes (razão de massa DSO/água, temperatura e carga enzimática) que influenciam o processo de hidrólise usando lipases imobilizadas. Em seguida, a esterificação de ácidos graxos livres (AGLs) com xilose na presença de solvente foi catalisada por ET, TLL, CALB ou PPL imobilizados no Purolite Lifetech EC8806F. Por fim, a capacidade emulsificante dos ésteres de xilose produzidos foi avaliada pela medição da estabilidade de uma emulsão de água em querosene.

Metodologia

2.1 Imobilização de enzimas ensaio de atividade padrão e quantificação de proteínas.

A imobilização da enzima seguiu o protocolo descrito por Tacias-Pascacio et al. (2016).

Os suportes hidrofóbicos, especialmente os da Purolite, são altamente hidrofóbicos, dificultando a penetração de água em seus poros. Para garantir uma imobilização eficaz, os suportes devem primeiro ser tratados para remover o ar e preencher os poros com água. A molhagem foi realizada suspendendo 10g do suporte em 50mL de metanol por 1 hora sob agitação suave, e após isso foi adicionado 50mL de água destilada à solução de metanol para obter uma solução de água a 50%. A agitação suave foi continuada por mais 15 minutos. Os suportes foram filtrados sob vácuo e lavados 5 vezes com 5 volumes de água em um funil de vidro. Os suportes foram armazenados à 4°C em um frasco com água destilada suficiente para evitar a desidratação.

A imobilização foi feita suspendendo 10 g do suporte (preparado como descrito acima) em uma solução enzimática (0,1-0,5 mg de proteína/mL) em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7, a 25°C. Foi ajustado a concentração e o volume da enzima para obter o carregamento desejado de enzima no biocatalisador final. Foi mantida a mistura em agitação contínua a 200 rpm.

Os ensaios de atividade padrão e a quantificação de proteínas seguiram o procedimento descrito por Beisson

et al. (2000) e Bradford (1976), respectivamente.

O método Bradford foi iniciado preparando o reagente de Bradford. Foi dissolvido 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%. Foi adicionado 100 mL de ácido fosfórico 85% (w/v) a esta solução. Posteriormente a solução resultante foi diluída para um volume final de 1 litro com água destilada.

As concentrações finais no reagente foram: 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (w/v) etanol e 8,5% (w/v) ácido fosfórico. Após o preparo da solução, foi feita uma curva padrão de albumina. O ensaio de quantificação de proteína é feito pipetando um volume de até 0,1 mL da solução de proteína (padrão ou amostra desconhecida) em tubos de ensaio de 12 x 100 mm. Após o volume é ajustado volume no tubo de ensaio para 0,1 mL com o tampão apropriado. São adicionados 5 mL do reagente de Bradford ao tubo de ensaio e mistura o conteúdo por inversão ou vórtex. Após 2 minutos e antes de 1 hora, meça a absorbância a 595 nm em cubetas de 3 mL contra um branco de reagente preparado a partir de 0,1 mL do tampão apropriado e 5 mL do reagente de proteína. A curva padrão é construída plotando o peso da proteína contra a absorbância correspondente. A curva padrão é utilizada para determinar a quantidade de proteína em amostras desconhecidas.

2.2 Hidrólise enzimática de DSO para produzir AGLs

As diferentes lipases imobilizadas foram avaliadas na hidrólise de DSO, usando uma carga de enzima de 1 wt.% (considerando a massa de óleo), uma proporção de massa de água/óleo de 1, uma temperatura de 35 °C e uma agitação de 250 rpm por 1 h. Os efeitos da temperatura (31,6 - 48,4 °C), da relação de massa de água/óleo (0,48 - 5,52) e da carga de enzima (1,48 - 6,52 wt.%) na reação de hidrólise foram estudados usando um projeto composto rotacional central (23 com três pontos centrais e seis pontos axiais). As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer selados (capacidade de 250 mL) usando 2 g de DSO sob agitação a 250 rpm por 0,5 h. Após esse período, alíquotas foram coletadas para titulação com KOH 125 mM e determinação da conversão. Após a validação dos dados experimentais, foi avaliado um perfil cinético da hidrólise de DSO ao longo do tempo. Foram coletadas alíquotas durante toda a reação para analisar o consumo de base e determinar a conversão.

2.3 Esterificação enzimática para produzir ésteres octil graxos

A fração rica em AGL produzida na etapa de hidrólise foi lavada com água destilada (2 vezes) e separada da fase

pesada (composta principalmente de água e glicerol) por centrifugação a 3.600 rpm por 10 minutos a 25 °C. O AGL purificado foi seco em uma estufa a 70 °C por 24 horas. Foi realizada uma reação de esterificação usando xilose como aceitador de acila (razão molar de AGLs/xilose de 5) em heptano como solvente (concentração de AGLs e xilose de 35 e 7 mmol L⁻¹, respectivamente). As peneiras moleculares foram usadas para remover a água produzida durante a reação (capacidade de adsorção de 0,23 mg de água/mg de peneira molecular). TLL, EV, PPL ou CALB imobilizados em Purolite foram usados como biocatalisadores (5%, m/v). A enzima imobilizada que apresentou o melhor potencial para a esterificação da xilose com AGLs foi selecionada para determinar o perfil de conversão ao longo do tempo. As reações de esterificação foram realizadas em um agitador a uma temperatura de 40 °C e agitação de 175 rpm. O consumo de KOH necessário para neutralizar os AGLs foi usado para determinar a conversão de AGLs em ésteres de ácidos graxos de xilose. Ou seja, os rendimentos referem-se ao consumo de AGLs.

Resultados e discussão

TLL, EV, PPL e CALB foram imobilizadas em Purolite para sua aplicação na hidroesterificação de DSO para a síntese de ésteres graxos de xilose. A imobilização foi muito rápida, atingindo altos valores de adsorção de enzimas em um curto período de tempo. A TLL, a CALB e a EV apresentaram baixa recuperação da atividade da tributirina, apesar de apresentarem alto rendimento de imobilização, enquanto a PPL apresentou o comportamento oposto.

As lipases imobilizadas apresentaram melhor desempenho na conversão de DSO em AGLs em comparação com as enzimas livres, como mostra a Tabela 1. A EV-Purolite forneceu conversões 1,4 vezes maiores do que as obtidas com a Eversa livre, enquanto a TLL-Purolite apresentou conversão 2 vezes maior do que sua formulação líquida. Comparando o desempenho das lipases imobilizadas, a EV-Purolite apresentou desempenho estatisticamente melhor do que as outras lipases, alcançando uma conversão 36 vezes maior do que a observada para a PPL Purolite. Foi selecionada a EV imobilizada para outros experimentos devido ao preço mais baixo dessa enzima.

As variáveis otimizadas para a hidrólise de DSO foram a proporção de massa de água/óleo de 5,5, carga de enzima de 6,5 wt.% e temperatura de 48,5 °C. Para melhorar os rendimentos, foi prolongada a reação por mais tempo. O EV-Purolite apresentou bom desempenho na conversão de DSO em AGL, atingindo 93% de conversão após 6

horas de reação. Após 16 horas, o rendimento de AGL chegou a 98%. A composição dos AGLs do óleo usado, calculada neste estudo, mostrou que ele era composto por $5,99 \pm 0,13\%$ em peso de ácido esteárico, $9,50 \pm 0,24\%$ em peso de ácido palmítico, $23,01 \pm 0,36\%$ em peso de ácido oleico, $46,13 \pm 0,27\%$ em peso de ácido linoleico e $8,10 \pm 0,04\%$ em peso de ácido linolênico. O pH final do meio de reação ficou entre 4,0 e 4,8, e essa diminuição do pH pode justificar a desaceleração da reação.

Tabela 1 - Triagem de biocatalisadores para a hidrólise de DSO. Condições do ensaio: carga de enzima de 1% em peso (considerando o óleo), razão de massa água/óleo de 1, temperatura de 35 °C, agitação de 250 rpm por 1 h.

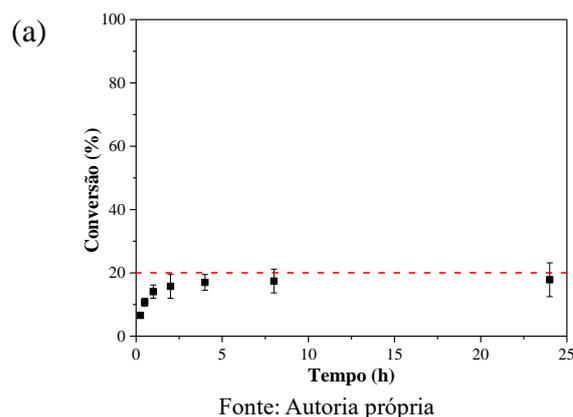
Biocatalisador	Conversão (%)*	
	Livre	Imobilizada
PPL	0,72 ^c	1,22 ^d
CALB	0,90 ^c	5,51 ^c
TLL	20,11 ^b	41,62 ^b
EV	31,00 ^a	43,42 ^a

* Conversão determinada pelo consumo de ácidos graxos livres presentes no meio de reação. Os índices a, b, c e d foram utilizados para identificar as diferenças médias no teste de Tukey (significância de 5%); a é o maior índice de significância.

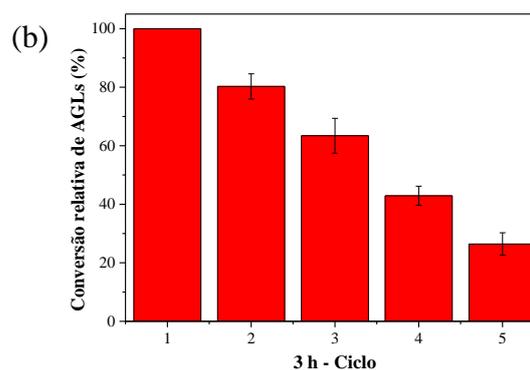
A estabilidade operacional do EV-Purolite na hidrólise de DSO foi avaliada. Observou-se que era possível reutilizar o biocatalisador imobilizado por pelo menos 5 lotes sequenciais, sem alterar seu desempenho na reação de hidrólise. Além disso, o procedimento usado durante os testes de reutilização do EV-Purolite mostrou a possibilidade de concentrar o glicerol na fase pesada, já que tanto o biocatalisador quanto a fase pesada foram reutilizados durante a reciclagem. O acúmulo de glicerol no meio de reação não afetou o desempenho da enzima imobilizada, provavelmente porque o alto grau de hidrofobicidade do suporte impediu a concentração de glicerol no biocatalisador. Essa concentração do glicerol por meio de ciclos de reação sucessivos pode tornar mais viável a purificação e a reutilização do glicerol produzido.

EV, TLL, CALB e PPL imobilizados em Purolite foram avaliados na esterificação da fase rica em AGLs purificados com xilose. CALB-Purolite e TLL-Purolite não mostraram nenhuma diferença estatística na síntese de ésteres de ácidos graxos de xilose. O EV pareceu ser o biocatalisador menos eficiente para essa reação. A reação catalisada por CALB-Purolite e TLL-Purolite alcançou conversões de cerca de 9,9% (conversão de ácido) após 1 hora de reação, o que representa cerca de 50% da xilose modificada como monoéster. A CALB imobilizada em Lewatit VP OC 1600 (Lipozyme 435) foi utilizada

anteriormente para a síntese de ésteres de ácidos graxos de xilose, obtendo altos rendimentos de oleato, palmitato e laurato de xilose (Gonçalves et al., 2021a). O uso de TLL imobilizada em Purolite para a síntese de ésteres de ácidos graxos de xilose não foi evidenciado na literatura. A Figura 1a mostra o curso da reação de esterificação do AGL purificado com xilose catalisada pela TLL-Purolite.



Fonte: Autoria própria



Fonte: Autoria Própria

Figura 1. (a) Perfil de conversão de AGL na síntese de ésteres de xilose catalisada por TLL-Purolite. A linha pontilhada representa a conversão máxima esperada da fração rica em AGL obtida da hidrólise de DSO. (b) Estabilidade operacional da TLL-Purolite na reação de esterificação para a síntese de ésteres de xilose. Condições do ensaio: carga enzimática de 10 wt.% (considerando o AGLs), razão molar AGLs/xilose de 5, temperatura de 40 °C e agitação de 175 rpm.

Como mostra a Figura 1a, cerca de 17% dos AGLs foram consumidos na síntese de ésteres de ácidos graxos de xilose (considerando a razão molar AGL/xilose de 5). Gonçalves et al. (2021a) obtiveram modificações semelhantes na xilose quando o Lipozyme 435 foi usado para a síntese de palmitato e laurato de xilose. A Figura 1b mostra a estabilidade operacional da TLL-Purolite na esterificação para a síntese de ésteres de xilose. Foi observado que o desempenho do biocatalisador piorou a cada lote de reação. Esse resultado pode estar relacionado

à dessorção da TLL do suporte devido à formação de moléculas com propriedades surfactantes/detergentes. Para verificar essa possibilidade, a enzima remanescente no suporte foi seguida de SDS-PAGE (Figura 2). A eletroforese mostrou a diminuição da intensidade da banda de proteína, confirmando que uma grande porcentagem de TLL foi liberada para o meio durante a reação.

A mistura final do meio reacional contendo ésteres de ácidos graxos de xilose demonstrou boas propriedades emulsificantes, apresentando um índice de emulsificação (IE) de 15%. Esse resultado está na mesma ordem de grandeza observada para o monolaurato de sacarose (EI = 12%), além disso, corrobora o que foi evidenciado por Gonçalves et al. (2021a). Esses resultados indicaram que os ésteres de ácidos graxos de xilose têm potencial para uso como agente emulsificante em várias aplicações industriais.

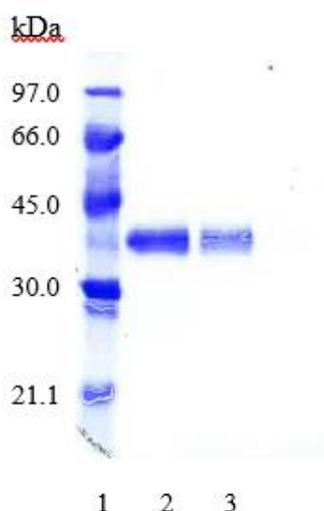


Figura 2 - Análise SDS-PAGE de diferentes biocatalisadores TLL. Faixa 1: Marcadores de peso molecular baixo; Faixa 2: TLL-Purolite antes da reciclagem (0,1 g/mL de tampão de ruptura); Faixa 3: TLL-Purolite após a reciclagem (0,1 g/mL de tampão de ruptura).

Conclusões

Este artigo mostra a viabilidade da abordagem usada para a síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos de xilose realizada em duas etapas. A hidrólise de DSO catalisada por EV imobilizada em Purolite permitiu obter um alto rendimento (93% depois de 6 horas) de AGLs. Além disso, foi demonstrada a possibilidade de reutilizar a enzima imobilizada e a fase pesada para a concentração de glicerol sem afetar o desempenho do biocatalisador. Na etapa de esterificação, a TLL imobilizada em Purolite

C18 resultou com sucesso na síntese de ésteres de ácidos graxos de xilose. Entretanto, a lipase imobilizada apresentou perdas de uma grande porcentagem (aproximadamente 20% por lote) de sua atividade durante cinco lotes de 3 horas de esterificação, devido à dessorção da enzima do suporte. Pesquisas em andamento sugerem o uso de agentes de ligação cruzada ou suportes heterofuncionais para minimizar esse problema. A mistura final do meio de reação contendo ésteres de ácido graxo de xilose tem propriedades emulsificantes semelhantes às do surfactante comercial uma vez que o índice de emulsificação foi de 15%.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Itajubá, ao Prof. Dr. José Renato Guimarães pela oportunidade e ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica concedida.

Referências

- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C., Verger, R., 2000. Methods for lipase detection and assay: A critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102, 133–153. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1438-9312\(200002\)102:23.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1438-9312(200002)102:23.0.CO;2-X)
- Bradford, M.M., 1976. Um método rápido e sensível para a quantificação de quantidades de microgramas de proteína utilizando o princípio de ligação proteína-corante. *Anal. Biochem.* 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Gonçalves, M.C.P., Amaral, J.C., Fernandez-Lafuente, R., Sousa Junior, R. de, Tardioli, P.W., 2021a. Síntese mediada pela lipozima 435 de oleato de xilose em metiltilcetona. *Molecules* 26, 3317. <https://doi.org/10.3390/molecules26113317>
- Gonçalves, M.C.P., Romanelli, J.P., Guimarães, J.R., Vieira, A.C., de Azevedo, B.P., Tardioli, P.W., 2021b. Revisão da pesquisa sobre a síntese de ésteres de açúcar catalisados por CALB incorporando princípios de mapeamento sistemático. *Crit. Rev. Biotechnol.* 41, 865-878. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1888071>
- Monteiro, R.R.C., Berenguer-Murcia, Á., Rocha-Martin, J., Vieira, R.S., Fernandez-Lafuente, R., 2023. Biocatalytic production of biolubricants: Strategies, problems and future trends. *Biotechnol. Adv.* 68, 108215. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108215>
- Tacias-Pascacio, V.G., Peirce, S., Torrestiana-Sanchez, B., Yates, M., Rosales-Quintero, A., Virgen-Ortiz, J.J., Fernandez Lafuente, R., 2016. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: Tuning their stability, activity and specificity. *RSC Adv.* 6, 100281–100294. <https://doi.org/10.1039/c6ra21730c>
- Yoo, I.S., Park, S.J., Yoon, H.H., 2007. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters. *J. Ind. Eng. Chem.* 13, 1–6.