

SÍNTESE DO OLEATO DE OCTILA EMPREGANDO LIPASES DE DIFERENTES FONTES IMOBILIZADAS EM PARTÍCULAS MAGNETIZADAS DE POLI(ESTIRENO-CO-DIMETACRILATO DE TRIETILENOGLICOL)

GABRIELLE POLICARPO DE ASSIS¹, VINICIUS SAMPAIO SILVA¹, AMANDA BAHIA DE SOUZA RANGEL¹, LARISSA FREITAS¹

¹Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato:gabriellepa@usp.br

RESUMO – *O atual trabalho teve como objetivo a síntese enzimática do éster emoliente oleato de octila a partir da lipase de Penicillium camemberti (Lipase G) e lipase pancreática (LPP) ambas imobilizadas em suporte polimérico magnetizado com magnetita a base de estireno e dimetacrilato de trietilenoglicol (STY-TEGDMA-M). Os biocatalisadores foram obtidos pela síntese do suporte polimérico via polimerização em suspensão com adição da magnetita e posterior imobilização das lipases por adsorção física. Os biocatalisadores obtiveram atividades sintéticas, a partir da síntese do oleato de etila, de aproximadamente, 482 U.g⁻¹ para a lipase G e 390 U.g⁻¹ para a lipase pancreática. As sínteses do éster oleato de octila foram conduzidas em reações de esterificação em meio isento de solvente, em razão molar de 1:1 (ácido:álcool) sob agitação de 150 rpm a 55 °C. O melhor resultado obtido foi de 65% de conversão e produtividade de 27,53 mmol.L⁻¹.h⁻¹ em éster empregando-se a lipase pancreática imobilizada em STY-TEGDMA-M. Utilizando-se a lipase G imobilizada no mesmo copolímero foi encontrado 35% de conversão e produtividade de 17,02 mmol.L⁻¹.h⁻¹. Esses resultados estão relacionados às especificidades dessas lipases pelo tipo de substrato, visto que a lipase pancreática prefere alcoóis e ácidos graxos com cadeias carbônicas mais longas.*

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a demanda por novas tecnologias, processos industriais ecológicos e sustentáveis tornam necessário o desenvolvimento de inovações empregando processos enzimáticos para a produção de fármacos, alimentos, cosméticos, entre outros. Estima-se que até o de ano 2028 o mercado global de enzimas terá um crescimento de 6,5% quando comparado ao mercado de 2021, que era avaliado em cerca de US\$ 11 bilhões (Pereira *et al.*, 2022; Sampaio *et al.*, 2022; Sheldon; Brady, 2022).

Processos enzimáticos que empregam lipases como biocatalisadores, enzima pertencente a classe das hidrolases, tem se tornado fontes tecnológicas promissoras, visto que

possuem uma variedade de possibilidades de aplicações, tais como, em reações de esterificação, transesterificação, interesterificação e hidrólise de óleos e gorduras. Esses biocatalisadores demonstram elevada eficiência, alta seletividade e especificidade, gerando produtos com elevada qualidade e rendimento, quando comparado à catalisadores convencionais (Pereira *et al.*, 2022; Utama *et al.*, 2019).

A imobilização de lipases tem se mostrado bastante vantajosa, pois permite a recuperação e reutilização da enzima ao final do bioprocessamento. A utilização de copolímeros magnetizados a base de estireno como suporte de imobilização de lipases, vem se tornando uma abordagem promissora, visto que, são matrizes com elevada hidrofobicidade, adequadas para este tipo de enzima e para a aplicação em reações de esterificação, pois absorvem menos água do meio reacional e favorece a síntese. Além disso, a recuperação do biocatalisador ao final da reação é mais fácil, visto que, pode ser recuperado por força magnética, evitando assim, a necessidade de filtração, separação em coluna e centrifugação (Da Silva *et al.*, 2020; Rosa *et al.*, 2020).

Diferentes ésteres podem ser obtidos por meio da catálise de lipases imobilizadas. Dentre esses, estão os ésteres emolientes que possuem características multifuncionais oleoquímicas, pois suas aplicabilidades estão diretamente ligadas à quantidade de carbonos presentes em sua molécula. Estes ésteres possuem em sua estrutura cadeias carbônicas médias (C12 a C18), o que é necessário para sua utilização como emolientes em formulações de produtos de beleza e cuidados com a pele (Da Silva *et al.*, 2020; Santos, 2015).

Nesse contexto, o presente trabalho visou a síntese enzimática do éster emoliente (oleato de octila) que apresenta aplicações importantes como solubilizantes na indústria cosmética (em composições para cremes e loções) e como agentes lubrificantes em outras áreas, como em fármacos, cosméticos e detergentes. As sínteses foram conduzidas via esterificação em meio isento de solvente empregando como biocatalisadores as lipases de *Penicillium camemberti* (lipase G) e lipase de pancreática (LPP) imobilizadas no suporte magnetizado à base de estireno, poli(estireno-co-dimetacrilato de trietilenoglicol) - (STY-TEGDMA-M), comparando-se o desempenho desses biocatalisadores na conversão da reação e na produtividade obtida em éster.

2 METODOLOGIA

A imobilização das lipases G e pancreática foi realizada por adsorção física em copolímero à base de estireno obtido por polimerização em suspensão com adição de Fe^{2+} e Fe^{3+} ao meio reacional, de acordo com Bento *et al.* (2016). A atividade catalítica das lipases imobilizadas no poli(estireno-co-dimetacrilato de trietilenoglicol) - (STY-TEGDMA-M), foram quantificadas a partir da hidrólise do azeite de oliva como proposto por Soares *et al.* (1999), e por meio da síntese do oleato de etila como descrito por Pinto *et al.* (2014).

As sínteses do oleato de octila foram realizadas em batelada, com agitação de 150 rpm, empregando razão equimolar (1:1) de ácido e álcool, concentração de 10% (m/v) de biocatalisador durante 48h sob 55 °C. A quantificação do consumo do ácido oleico foi realizada empregando a equação 1, em que alíquotas foram tituladas com KOH 0,04 mol.L⁻¹ e fenolftaleína como indicador. A produtividade em éster obtida nas sínteses foi calculada de acordo com a equação 2.

$$\text{ÁcidoCarboxílico}(g.L^{-1}) = \frac{V*M*MM}{v} \quad (1)$$

$$\text{Produtividade}(mmol \text{ éster formado}.h^{-1}) = \frac{(NF_A)^0 x (X_{ac})t}{t} \quad (2)$$

Em que: V é o volume de KOH em mL, M a concentração de KOH em mol.L⁻¹, MM é a massa molar do ácido carboxílico em g.mol⁻¹, v é o volume da alíquota em mL, (NF_A)⁰ é a quantidade inicial de ácido graxo (mmol), (X_{ac})_t é a conversão de ácido graxo em um determinado tempo e t em tempo (h).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade enzimática dos biocatalisadores

A quantificação da atividade catalítica das lipases imobilizadas em STY-TEGDMA-M foi realizada tanto em reações de hidrólise como de esterificação. Ambos os derivados imobilizados apresentaram atividade sintética na obtenção do oleato de etila, sendo que a lipase G demonstrou atividade superior à LPP, o que já era esperado, visto que ela é relatada na literatura como uma lipase com elevada eficiência para catalisar reações de sínteses. Em relação à atividade hidrolítica foi possível mensurar apenas o desempenho da LPP, já que a lipase G não hidrolisa triglicerídeos (LIU *et al.*, 2018). A Tabela 1 apresenta os valores das atividades enzimáticas obtidas para os biocatalisadores desenvolvidos.

Tabela 1: Atividade catalítica dos biocatalisadores desenvolvidos

Biocatalisador	Atividade Sintética	Atividade Hidrolítica
	(U g ⁻¹)	(U g ⁻¹)
G-STY-TEGDMA-M	491,30± 41,43	-
LPP-STY-TEGDMA-M	389,94 ± 61,27	1262,53 ± 19,74

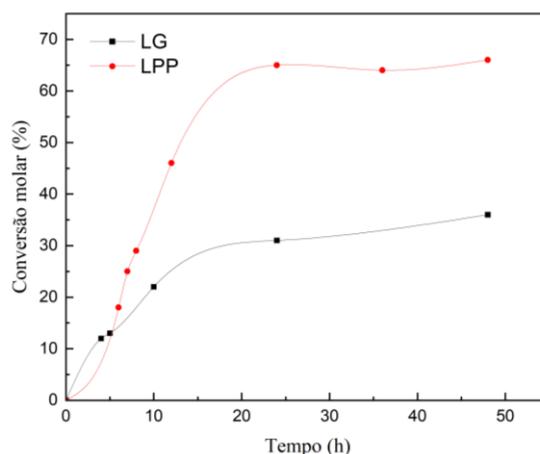
Em trabalho realizado por Vilas Bôas *et al.* (2021), em que empregou a lipase G imobilizada em estireno-divinilbenzeno, obtiveram uma atividade sintética de 255 U g⁻¹, o que demonstra o bom desempenho obtido pelo biocatalisador sintetizado G-STY-TEGDMA-M que apresentou uma atividade de 491,30± 41,43 U g⁻¹.

Em outro trabalho desenvolvido por Mendes *et al.* (2012), no qual quantificaram a atividade catalítica da LPP imobilizada em celite via hidrólise, obtiveram 764 U g⁻¹ de atividade hidrolítica, demonstrando também a adequação do biocatalisador LPP-STY-TEGDMA-M, visto que, conforme a Tabela 1, apresentou 1262,53 ± 19,74 U g⁻¹ de atividade.

3.2 Síntese do oleato de octila empregando os biocatalisadores desenvolvidos

Com o intuito de se avaliar o desempenho dos diferentes biocatalisadores obtidos no presente estudo na obtenção do oleato de octila, foram realizadas esterificações empregando-se ácido oleico e octanol, em razão estequiométrica, em meio isento de solvente. O Gráfico 1 mostra o perfil das conversões obtidas nas sínteses durante 48 horas de reação conduzida em modo descontínuo.

Gráfico 1: Perfil de conversão do ácido oléico nas sínteses de oleato de octila empregando diferentes biocatalisadores



Pode-se observar que o biocatalisador LPP-STY-TEGDMA-M apresentou um melhor desempenho para a síntese do oleato de octila nas condições testadas, atingindo conversão máxima de 65% do ácido graxo. Já o biocatalisador G-STY-TEGDMA-M obteve apenas 35% de conversão nas mesmas condições experimentais.

Em trabalho realizado por Paula *et al.* (2007), em que estudaram o desempenho da lipase pancreática em diferentes meios reacionais visando a síntese de ésteres, concluíram que o tipo de álcool empregado no meio reacional influencia na formação do éster, de modo que, quanto maior a cadeia carbônica do álcool, maior o rendimento reacional. Isso se deve, possivelmente, ao fato de que, cadeias carbônicas menores apresentam maior polaridade, podendo interagir de forma prejudicial com a camada de água presente na molécula protéica, essencial para a manutenção da atividade catalítica da enzima, reduzindo seu poder de catálise. Logo, a LPP é mais favorável para reações envolvendo alcoóis de cadeias, relativamente, maiores, como o octanol.

Já em trabalho realizado por Mendes e de Castro (2012), que estudaram a especificidade da lipase pancreática em diferentes substratos, foi concluído uma forte influência do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo na síntese do éster, indicando uma preferência dessa lipase para ácidos graxos de C8 a C16. Também foi avaliada a influência do comprimento da cadeia carbônica do álcool na esterificação do ácido octanóico, sendo verificado que os alcoóis n-butanol e n-octanol apresentam melhores rendimentos, quando comparados com metanol, etanol e n-propanol. Assim, os dados obtidos no presente estudo, em que a LPP demonstrou um bom desempenho para o ácido oléico, corroboram com os relatados por esses autores.

A Tabela 2 apresenta as produtividades em éster obtidas no tempo de 48 horas, comprovando a superioridade catalítica da LPP para a síntese do oleato de octila nas condições do presente estudo.

Tabela 2: Produtividades obtidas na síntese do oleato de octila empregando diferentes biocatalisadores

Biocatalisador	Produtividade em 48h (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Produtividade máxima (mmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)
G-STY-TEGDMA-M	17,02	110,6
LPP-STY-TEGDMA-M	27,53	77,17

Comparando-se as produtividades obtidas no decorrer da síntese, nota-se que quando utilizou-se a lipase G como biocatalisador, obteve-se produtividade de 110,6 mmol.L⁻¹.h⁻¹ nas duas primeiras horas de reação, ocorrendo uma queda acentuada após esse período de tempo. Já quando empregou-se a LPP, a produtividade foi mantida na faixa de 61,31-77,17 mmol.L⁻¹.h⁻¹ nas 12 primeiras horas, chegando a 27,53 mmol.L⁻¹.h⁻¹ ao final de 48h, demonstrando uma maior estabilidade durante a síntese do éster. Esses resultados remetem a uma adequação do sistema imobilizado desenvolvido, empregando a lipase pancreática e o suporte de STY-TEGDMA-M no substrato selecionado para a obtenção do éster emoliente.

Destaca-se ainda que, o custo da lipase pancreática é mais acessível, quando comparado as demais lipases de origem microbiana disponíveis comercialmente, o que torna sua aplicação mais atrativa para utilização em processos industriais (MENDES *et al.*, 2012).

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados pode-se constatar que a lipase pancreática imobilizada em STY-TEGDMA-M apresentou um melhor desempenho na síntese do oleato de octila nas condições avaliadas, quando comparada a lipase G, atingindo 65 e 35% de conversão reacional, respectivamente. Como descrito também por outros autores, essa observação pode estar relacionada ao fato de a lipase pancreática apresentar preferência por alcoóis e ácidos graxos com cadeias carbônicas mais longas.

Vale destacar que, mesmo constatando-se a melhor atuação da lipase pancreática comparada à lipase G, a conversão máxima foi inferior a 70% em 48h de reação. Dessa forma, outros métodos de imobilização podem ser testados visando à obtenção de um sistema imobilizado mais eficiente, podendo melhorar o poder de catálise da lipase e consequentemente, aumentar a conversão da reação. Outra estratégia que também será testada será a condução desse bioprocessos em modo contínuo, visando elevar a produtividade em éster e vislumbrar sua implementação em escala industrial.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo nº 2016/10636-8 e a Universidade de São Paulo (Bolsas PUB USP), pelo suporte financeiro.

6 NOMENCLATURA

STY-TEGDMA-M – copolímero a base de estireno, dimetacrilato de trietilenoglicol e magnetita;

G-STY-TEGDMA-M – Lipase G imobilizada em suporte a base de estireno, dimetacrilato de trietilenoglicol e magnetita;

LPP-STY-TEGDMA-M -Lipase Pancreática imobilizada em suporte a base de estireno, dimetacrilato de trietilenoglicol e magnetita.

7 REFERÊNCIAS

DA SILVA MVC, SOUZA AB, DE CASTRO HF, AGUIAR LG, DE OLIVEIRA PC, FREITAS L, Synthesis of 2-ethylhexyl oleate catalyzed by *Candida antarctica* lipase immobilized on a magnetic polymer support in continuous flow. *Biop. and Biosys. Eng.*, v. 43, p. 615-623, 2020.

MENDES AA, OLIVEIRA PC, DE CASTRO HF, Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *J. Mol.Catal. B Enzym.*, v. 78, p. 119-134, 2012.

PAULA AV, URIOSTE D,SANTOS JC, DE CASTRO HF, Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. *J. Chem.Technol.Biotechnol.*, v. 82, p. 281-288, 2007.

SAMPAIO CS, ANGELOTTIJAF, FERNANDEZ-LAFUENTE R, HIRATA DB,Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: Problems and prospects – A review. *Int. J. of Biol. Macromol*, 2022.

SANTOS J. S. Esterificação de ácido oleico e álcoois (C2-C8): estudos de partição de compostos e influência de catalisadores. 2015.

SHELDON RA, BRADY D, Green Chemistry, Biocatalysis, and the Chemical Industry of the Future. *Chem. Sus.*, 2022.

SOARES CMF, DE CASTRO HF, ZANIN GM, DE MORAES FF, Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Appl. Biochem. Biotechnol*, v. 79, p. 745–757, 1999.

PEREIRA AS, DE SOUZA AH, FRAGA JL,VILLENEUVEP, TORRESAG, AMARAL PFF, Lipases as Effective Green Biocatalysts for Phytosterol Esters Production: A Review. *Catalysts*,v. 12, p. 88,2022.

UTAMA QD, SITANGGANG AB, ADAWIYAHDR, HARIYADIP, Lipase-catalyzed interesterification for the synthesis of medium-long-medium (MLM) structured lipids: A review. *Food Technol. and Biotechnol.*, v. 57, p. 305-318, 2019.