



PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE ÉSTERES DE SOLKETILA POR HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA USADO

JOÃO VITOR BERNARDES DIMAS; JOSÉ MIGUEL JÚNIOR; MILSON SANTOS
BARBOSA; CLEIDE MARA FARIA SOARES; ADRIANO AGUIAR MENDES

RESUMO

O presente estudo propõe uma nova abordagem na produção enzimática de ésteres de solketila, uma classe de compostos de grande interesse na indústria oleoquímica, por hidroesterificação enzimática do óleo de soja usado. Este processo consistiu na hidrólise completa do óleo de soja usado catalisado por lipase de *Candida rugosa* (LCR) para a produção de ácidos graxos livres (AGL), seguido da esterificação enzimática dos AGL obtidos com solketal em meios isentos de solventes. O biocatalisador empregado nesta etapa foi a lipase Eversa[®] Transform 2.0 (ET2.0) imobilizada em partículas pré-tratadas do epicarpo (casca) de *Acrocomia aculeata* (macaúba). A etapa de produção dos AGL por hidrólise enzimática foi conduzida em um sistema isento de emulsificantes e agentes tamponantes empregando razão mássica óleo:água de 40% m.m⁻¹, concentração de LCR de 3,2 g do preparado comercial em pó por Kg de meio, 40°C e agitação mecânica de 1500 rpm. O biocatalisador empregado na etapa de esterificação (ET2.0 imobilizada) foi preparado via adsorção física de ET2.0 a 25°C em pH 5,0 (tampão acetato de sódio – 5 mmol.L⁻¹) empregando um carregamento de proteína de 40 mg.g⁻¹ de suporte. Máxima concentração de proteína imobilizada de 25,2 ± 1,3 mg.g⁻¹ foi obtida em 15 h de imobilização. As reações de esterificação foram conduzidas em frascos abertos contendo 6 g de meio reacional constituído por uma mistura de AGL e solketal, agitação mecânica de 240 rpm e tempo de 20 min de reação. Nesta etapa, a influência de relevantes fatores na etapa de esterificação como razão molar solketal:AGL (1:1 a 1:4), temperatura de reação (40 a 70°C), e concentração de biocatalisador (5 a 20% m.m⁻¹) foi avaliada por delineamento composto central rotacional (DCCR). De acordo com os resultados, máxima conversão do ácido da ordem de 35% foi alcançada após 20 min de reação conduzida a 46°C, 17% m.m⁻¹ de biocatalisador e razão molar AGL:solketal de 1:1,6. Estes resultados mostram que a estratégia proposta é altamente atrativa para a indústria química para o estabelecimento de processos eficientes e sustentáveis a partir de resíduos agroindustriais (casca de macaúba e óleo residual).

Palavras-chave: Ésteres de solketila; Hidroesterificação; Óleo de soja usado; Otimização.

1 INTRODUÇÃO

Ésteres de solketila são uma classe de compostos químicos de grande interesse industrial amplamente usados como aditivos em combustíveis (BARBOSA *et al.*, 2019; MARIAM *et al.*, 2022) e emulsificantes com propriedades antimicrobianas (MENDOZA-ORTIZ *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2014). Estes compostos são convencionalmente produzidos por reações de esterificação e/ou transesterificação catalisadas por catalisadores homogêneos ácidos ou básicos como metóxido de sódio (KENAR e KNOTHE, 2008), metóxido de potássio (NEAMTU *et al.*, 2019), carbonato de sódio (MARIAM *et al.*, 2022), ácido *p*-toluenossulfônico

(PEROSA *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2014) ou uma mistura de trifenilfosfina/iodo/imidazol (SULTANOVA *et al.*, 2023). Além disso, partículas ácidas de sílica amorfa (BARBOSA *et al.*, 2019) e óxidos derivados de materiais naturais ricos em cálcio (SANKARANARAYANAN *et al.*, 2017) também têm sido utilizados como catalisadores heterogêneos ácidos ou básicos desta reação de esterificação, respectivamente. Em geral, esses sistemas reacionais são conduzidos em altas temperaturas – de 90 a 150°C. Além disso, são necessários complexos esquemas de reação que empregam grandes volumes de solventes orgânicos perigosos ou líquidos iônicos para melhorar a miscibilidade das matérias-primas (BARBOSA *et al.*, 2019; KENAR e KNOTHE, 2008; MARIAM *et al.*, 2022; NEAMTU *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2014). Estes estudos também foram conduzidos sob atmosferas inertes para evitar a formação de subprodutos indesejáveis causados por oxidação, polimerização e outras reações, a fim de obter altos rendimentos e purezas.

Com o intuito de solucionar estas limitações, a substituição de catalisadores químicos clássicos por biocatalisadores como lipases é uma alternativa promissora na produção de valiosos compostos para diferentes setores industriais devido à crescente demanda por produtos ambientalmente corretos, requerimento de condições brandas de temperatura e pressão, menor consumo de energia no processo e formação de produtos com elevada pureza que minimiza a geração de resíduos nas etapas de separação/purificação (BOLIVAR *et al.*, 2022).

Neste contexto, o objetivo principal deste estudo foi desenvolver um processo inédito para a produção de ésteres de solketal por hidroesterificação enzimática do óleo de soja usado, um subproduto do processamento doméstico e industrial de alimentos (fritura). Este processo consiste na inicial hidrólise enzimática do óleo residual, seguido da esterificação enzimática dos AGL produzidos com solketal. Nesta etapa, foi avaliada a influência de importantes fatores na esterificação empregando uma ferramenta estatística (DCCR). Este é um estudo pioneiro na produção destes ésteres de grande relevância na indústria oleoquímica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Lipases de *Thermomyces lanuginosus* expressa em *Aspergillus oryzae* (ET2.0) e de *Candida rugosa* foram adquiridas da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Solketal (DL-1,2-Isopropilidenoglicerol) também foi obtido da Sigma-Aldrich Co. Óleo de soja usado na fritura de batatas fritas foi obtido do Restaurante Universitário da Universidade Federal de Alfenas (Alfenas, MG). Frutos da macaúba foram coletados no bioma Cerrado na Universidade Federal de São João del-Rei – *Campus* Sete Lagoas (Sete Lagoas, MG). Todos os outros reagentes e solventes usados foram de grau analítico obtidos da Synth[®] (São Paulo, SP).

2.2. Pré-tratamento do epicarpo de macaúba

O suporte foi preparado pela remoção das cascas do fruto da macaúba, seguido de moagem em moinhos de facas e separação por sistemas de peneiras rotativas para a obtenção de tamanho de partículas entre 75 e 120 µm. O suporte obtido foi submetido duas vezes a um tratamento termoquímico (solução de HCl a 3,5% m.m⁻¹ por 4 h a 120°C em sistema de refluxo) e imerso duas vezes em solução de etanol a 70% m.m⁻¹ por 15 h a 25°C. O suporte pré-tratado obtido foi usado na imobilização de ET2.0 usado na etapa de esterificação.

2.3. Hidrólise enzimática do óleo de soja usado

A produção de AGL por hidrólise completa do óleo de soja refinado foi conduzida em reatores de 350 mL de capacidade contendo 50 g de meio reacional preparado na razão mássica óleo:água de 40% m.m⁻¹ (SABI *et al.*, 2022). O processo de hidrólise foi realizado

empregando 3,2 g do extrato bruto comercial de LCR por Kg de meio reacional, agitação mecânica de 1500 rpm, 40°C e tempo de reação de 180 min. Os AGL obtidos foram separados em funil de separação e a parte superior foi lavada 3 vezes com água destilada a 50°C para a remoção de glicerol residual e os AGL obtidos foram empregados na etapa de esterificação.

2.4. Preparação do biocatalisador por imobilização de ET2.0 por adsorção física

A imobilização de ET2.0 foi realizada em pH 5,0 (tampão fosfato de sódio 5 mM) por 15 h de contato com contínua agitação (240 rpm) a 25°C empregando um carregamento inicial de proteína de 40 mg.g⁻¹ de suporte (ALVES *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2019). A imobilização foi acompanhada pela determinação da concentração de proteína imobilizada empregando o método proposto por Bradford (1976). A máxima concentração de proteína imobilizada foi de 25,2 ± 1,3 mg.g⁻¹.

2.5. Otimização da etapa de esterificação enzimática

As reações de esterificação foram realizadas em frascos abertos de vidro (capacidade de 100 mL) contendo 6 g de meio reacional sob constante agitação mecânica (240 rpm) e tempo de reação (20 min). Neste estudo, um DCCR foi proposto para a avaliação do efeito da temperatura de reação (40 a 70°C), razão molar AGL:solketal (1:1 a 1:4) e concentração de biocatalisador (5 a 20% m.m⁻¹) na reação. Aliquotas do meio de reação (50 µL) foram retiradas em tempos pré-determinados e diluídas em solução de etanol a 70% (m.m⁻¹) para a quantificação de AGL residual por titulação com solução de NaOH 40 mM. A porcentagem de conversão dos AGL em ésteres (Y) foi determinada conforme mostrado na Eq. (1) (SABI *et al.*, 2022):

$$Y(\%) = \left(\frac{AGL_0 - AGL_t}{AGL_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que: AGL_0 e AGL_t são as concentrações inicial e residual de AGL no meio (mol. L⁻¹).

Os resultados experimentais foram analisados ao nível de 95% de confiança, utilizando o software Protimiza Experimental Design (<https://experimental-design.protimiza.com.br>). A significância estatística dos coeficientes de regressão foi determinada pelo teste *t* de Student. O ajuste do modelo foi expresso pelo coeficiente de determinação (R²) e os níveis de significância dos parâmetros do modelo foram verificados por análise de variância (ANOVA). As superfícies de contorno e de resposta foram plotadas para encontrar as condições ótimas de reação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os fatores independentes, níveis em termos reais e codificados, em conjunto com os resultados experimentais. Os dados experimentais apresentados mostram que a porcentagem de conversão dos AGL variou de 2,07% (Ensaio 1) a 37,33% (Ensaio 7). Os valores experimentais e preditos da variável resposta avaliada neste estudo (porcentagem de conversão) foram bastante semelhantes, mostrando que o modelo proposto pode ser usado para descrever a relação entre as variáveis independentes avaliadas e a resposta. Utilizando os dados experimentais apresentados na Tabela 1 e o software Protimiza Experimental Design, foi possível avaliar o efeito da variação dos parâmetros investigados na reação.

Na Tabela 2, verifica-se que a média, os termos lineares de temperatura (x2) e concentração de biocatalisador (x3) e a interação razão molar AGL:solketal e temperatura de reação (x1.x2) apresentaram influência significativa na produção dos ésteres de EG ao nível

de 95% de confiança. Entretanto, o termo linear da razão molar AGL:solketal (x_1), termos quadráticos dos parâmetros avaliados (x_1^2 , x_2^2 , x_3^2) e as interações entre razão molar AGL:solketal e concentração de biocatalisador ($x_1.x_3$) e temperatura de reação e concentração de biocatalisador ($x_2.x_3$) não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) e excluídos do modelo.

Tabela 1 – Matriz DCCR para a avaliação de parâmetros na esterificação dos AGL com solketal catalisada por ET2.0 imobilizada em partículas do epicarpo da macaúba.

Ensaios	Variáveis independentes Valores codificados (Reais)			Variável resposta Conversão (%)	
	Razão molar AGL:solketal	Temperatura (°C)	Biocatalisador (% m.m ⁻¹)	Experimental	Predito
1	-1 (1:1,6)	-1 (46)	-1 (8)	2,07	2,81
2	+1 (1:3,4)	-1 (46)	-1 (8)	3,41	5,56
3	-1 (1:1,6)	+1 (64)	-1 (8)	18,24	13,88
4	+1 (1:3,4)	+1 (64)	-1 (8)	21,58	19,76
5	-1 (1:1,6)	-1 (46)	+1 (17)	35,32	35,63
6	+1 (1:3,4)	-1 (46)	+1 (17)	16,67	19,52
7	-1 (1:1,6)	+1 (64)	+1 (17)	37,33	33,36
8	+1 (1:3,4)	+1 (64)	+1 (17)	22,93	20,67
9	-1.68 (1:1)	0 (55)	0 (12,5)	14,15	17,56
10	+1.68 (1:4)	0 (55)	0 (12,5)	10,23	8,95
11	0 (1:2,5)	-1.68 (40)	0 (12,5)	24,15	19,82
12	0 (1:2,5)	+1.68 (70)	0 (12,5)	23,63	30,10
13	0 (1:2,5)	0 (55)	-1.68 (5)	3,28	4,50
14	0 (1:2,5)	0 (55)	+1.68 (20)	31,96	32,87
15	0 (1:2,5)	0 (55)	0 (12,5)	20,98	19,46
16	0 (1:2,5)	0 (55)	0 (12,5)	22,30	19,46
17	0 (1:2,5)	0 (55)	0 (12,5)	17,84	19,46
18	0 (1:2,5)	0 (55)	0 (12,5)	17,10	19,46

Tabela 2 – Coeficiente de regressão, erro padrão e valores de p para os parâmetros significativos na produção enzimática de ésteres de solketila.

Parâmetro	Coeficiente de regressão	Erro padrão	p
Média	19,46	2,15	0,0000 ^a
x_1	-2,56	1,17	0,0597
x_1^2	-2,19	1,21	0,1083
x_2	3,06	1,17	0,0308 ^a
x_2^2	1,94	1,21	0,1481
x_3	8,43	1,17	0,0001 ^a
x_3^2	-0,27	1,21	0,8270
$x_1.x_2$	0,78	1,53	0,6225
$x_1.x_2$	-4,72	1,53	0,0149 ^a
$x_1.x_3$	-3,26	1,53	0,0652

x_1 , x_2 , e x_3 são razão molar AGL:solketal, temperatura e concentração de biocatalisador. a:

parâmetros significativos a 95% do nível de confiança.

Os coeficientes de regressão dos parâmetros significativos reportados na Tabela 2 foram utilizados para compor a Eq. (2) que expressa o efeito das variáveis significativas na conversão (resposta) em termos codificados:

$$Y(\%) = 19,46 + 3,06x_2 + 8,43x_3 + 4,72x_1 \cdot x_2$$

(2)

Em que: *Y* é a porcentagem da conversão dos AGL, *x*₁, *x*₂ e *x*₃ representam os valores codificados de razão molar AGL:solketal, temperatura de reação e concentração do biocatalisador, respectivamente.

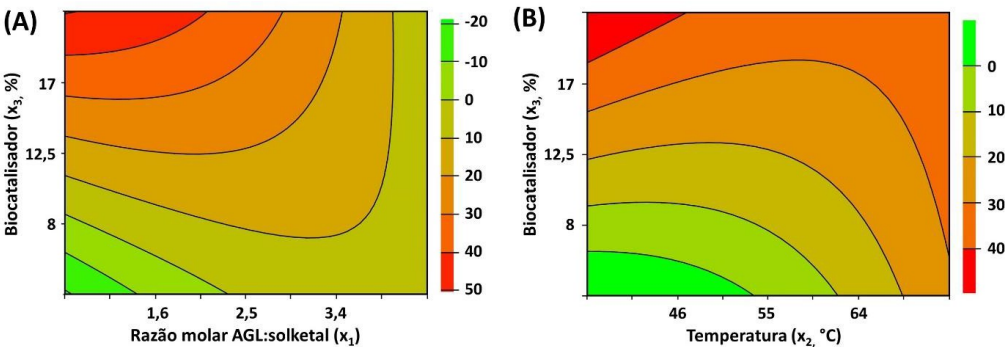
Tabela 3 – Análise de variância (ANOVA).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Media quadrática	Teste - F
Regressão	1594,2544	9	177,14	9,51
Residual	149,0225	8	18,63	
Falta de Ajuste	130,4886	5	26,10	4,22
Erro Puro	18,5339	3	6,18	
Total	1743,2768	17		

R²=0,9145; F_{0,05;9;8}=3,39

A análise de variância – ANOVA (Tabela 3) mostra que o valor de R² do modelo proposto foi utilizado para demonstrar a sua adequação. O valor encontrado foi de 91,45%. A adequação do modelo também foi confirmada pelo teste F de Fisher – o valor Fcalculado (9,51) foi quase 3 vezes maior que o valor Ftabelado ao nível de significância de 5% (3,39), mostrando assim a sua significância. Portanto, estes resultados mostram que o modelo proposto pode ser usado para prever e explorar as superfícies de contorno para determinar as condições ótimas de reação (Figura 1(A) – (B)).

Figura 1 – Superfícies de contorno para a produção enzimática de ésteres de solketal. Efeito da concentração de biocatalisador e razão molar AGL:solketal (A) e concentração de biocatalisador e temperatura de reação (B) na porcentagem de conversão dos AGL.



A Figura 1 (A) mostra o efeito da razão molar AGL:solketal e da concentração do biocatalisador e sua interação na reação. Foi observado um aumento na porcentagem de conversão dos AGL com o aumento da concentração de biocatalisador de 5% m.m⁻¹ (valor codificado = -1,68) para 20 m.m⁻¹ (valor codificado = +1,68). Isto é devido ao aumento de sítios catalíticos existentes no meio de reação (SABI *et al.*, 2022). O maior valor do coeficiente

reportado na Eq. (2) foi obtido para o termo linear da concentração do biocatalisador (+8,43x3), mostrando seu efeito positivo e significativo na produção de ésteres. Além disso, estes resultados mostram que a conversão máxima de AGL pode ser obtida usando razão estequiométrica – 1:1 (valor codificado = -1,68) de materiais de partida e com um ligeiro excesso de solketal no meio de reação – razão molar AGLs:solketal de 1:1,6 (valor codificado = -1). A interação entre estes parâmetros não foi significativa ao nível de confiança de 95%. Um aumento na temperatura melhora positivamente a miscibilidade das matérias-primas e reduz a viscosidade da mistura de reação. Portanto, é esperado um aumento dos efeitos de transferência de massa de materiais de partida para o microambiente do biocatalisador (SABI *et al.*, 2022). Conforme pode ser observado na Figura 1(B), máxima produção do éster pode ser alcançada em condições brandas de reação, entre 40 °C (valor codificado = -1,68) e 46 °C (valor codificado = -1). Também é possível notar que a porcentagem máxima de conversão dos AGL pode ser alcançada acima de 17% m.m⁻¹ de biocatalisador (valor codificado ≥ +1). A interação entre esses dois parâmetros individuais também não foi significativa ao nível de confiança de 95%. Com base nestes resultados, máxima conversão dos materiais de partida em ésteres pode ser alcançada com concentração de biocatalisador acima de 17% m.m⁻¹ (valor codificado ≥ +1) e temperatura entre 40°C e 46°C (valor codificado ≤ -1).

Na validação do planejamento proposto, foi realizado um ensaio para a produção dos ésteres de solketila empregando razão molar AGLs:solketal de 1:1,6 (valor codificado = -1), concentração de biocatalisador acima de 17% m.m⁻¹ (valor codificado ≥ +1) e temperatura de reação de 46°C (valor codificado ≤ -1). Estas condições reacionais são as mesmas empregadas no Ensaio 5 descrito na Tabela 1 que obteve elevada porcentagem de conversão, muito similar ao ensaio 7 que apresentou o máximo valor da variável resposta. Nestas condições, os valores experimental e predito (teórico, determinado pela Eq. (2)), foram da ordem de 35%, na qual confirmam a adequação do modelo proposto para a etapa de esterificação.

4 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou claramente que o biocatalisador heterogêneo preparado a partir de um material lignocelulósico (epicarpo de macaúba) é altamente ativo na reação de esterificação conduzidas em condições experimentais moderadas. Este é um aspecto relevante do processo proposto, uma vez que possui baixa demanda energética para a produção de uma importante classe de compostos oleoquímicos (ésteres de solketila). O desenvolvimento de um processo eficiente e sustentável utilizando um óleo residual como matéria-prima e um resíduo de biomassa lignocelulósica como suporte para a imobilização da lipase pode ser uma alternativa promissora para a indústria química. Novos estudos serão realizados em nosso grupo de pesquisa visando a aplicação de ésteres de solketila como plastificantes para a produção de filmes flexíveis de materiais poliméricos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001. Os autores também agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo APQ-01691-21) pelo suporte financeiro. A.A.M. também agradece o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo 306253/2023-2) pela sua bolsa PQ 2 – CA BI.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, S.L.; LIMA, P.C.; DOS SANTOS, W.T.P.; KLEIN, S.I.; CLOSOSKI, G.C.;

CAIRES, F.J. Oxygenated biofuels: Synthesis of fatty acid solketal esters with a mixture of sulfonated silica and (Bu₄N) (BF₄) catalyst. **Catalysis Communications**, v. 120, p. 76-79, 2019.

BOLIVAR, J.M.; WOODLEY, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 51, p. 6251-6290, 2022.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

KENAR, J.A.; KNOTHE, G. 1,2-isopropylidene glycerol carbonate: Preparation, characterization, and hydrolysis. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 85, p. 365-372, 2008.

MARIAM, N.M.D.N.S.; HOONG, S.S.; ARNIZA, M.Z.; ADNAN, S.; ISMAIL, T.N.M.T.; YEONG, S.K.; YUSOP, M.R. Optimisation of reaction parameters for the synthesis of solketal levulinate as potential biodiesel additive. **Journal of Oil Palm Research**, v. 34, p. 524-534, 2022.

MENDOZA-ORTIZ, P.A.; GAMA, R.S.; GÓMEZ, O.C.; LUIZ, J.H.H.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; CREN, E.C.; MENDES, A.A. Sustainable enzymatic synthesis of a solketal ester - Process optimization and evaluation of its antimicrobial activity. **Catalysts**, v. 10, p. 218, 2020.

NEAMTU, C.; STEPAN, E.; PLESU, V.; BOZGA, G.; TULUC, A. Synthesis and characterization of new solketal alkylesters usable as diesel biobased fuel additives. **Revista de Chimie**, v. 70, p. 1167-1172, 2019.

PEROSA, A.; MORASCHINI, A.; SELVA, M.; NOÈ, M. Synthesis of the fatty esters of solketal and glycerol-formal: Biobased specialty chemicals. **Molecules**, v. 21, p. 170, 2016.

SABI, G.J.; GAMA, R.S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; CANCINO-BERNARDI, J.; MENDES, A.A. Decyl esters production from soybean-based oils catalyzed by lipase immobilized on differently functionalized rice husk silica and their characterization as potential biolubricants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 157, p. 110019, 2022.

SANKARANARAYANAN, S.; JINDAPON, W.; NGAMCHARUSSRIVICHAI, C.. Valorization of biodiesel plant-derived products via preparation of solketal fatty esters over calcium-rich natural materials derived oxides. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 81, p. 57-64, 2017.

SULTANOVA, R.M.; KHUSNUTDINOVA, N.S.; BORISOVA, Y.G.; RASKILDINA, G.Z.; MESHCHERYAKOVA, S.A.; SAMORODOV, A.V.; ZLOTSKY, S.S. Selective synthesis of some carboxylic acids esters. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 93, p. 1-7, 2023.

YANG, J.; MA, W.J.; LI, N.; ZHOU, J.H.; SUN, H.Z. Synthesis of tung oil monoglyceride. **Advanced Materials Research**, v. 941-944, p. 1021-1025, 2014.