

**Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP**

**Faculdade de Engenharia de Alimentos**

**Departamento de Ciência de Alimentos**

---

**ESTUDO DA SÍNTESE DE ÉSTERES  
DE POLIGLICÓIS UTILIZANDO  
LIPASES E ESTERASES COMO  
BIOCATALISADORES**

**Luiz Wanderley Bratfisch Pace**

Mestre em Ciência de Alimentos

**Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore**

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas - SP  
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P114e Pace, Luiz Wanderley Bratfisch  
Estudo da síntese de ésteres de poliglicóis utilizando lipases e  
esterases como biocatalisadores / Luiz Wanderley Bratfisch Pace. --  
Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Gláucia Maria Pastore  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade  
de Engenharia de Alimentos.

1. Ésteres de ácidos graxos. 2. Poliglicol. 3. Biocatalisador. 4.  
Enzimas. 5. Esterificação. I. Pastore, Gláucia Maria. II.  
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de  
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Study of polyglycols esters synthesis using lipases and esterases as biocatalyst.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Fatty acid esters, Polyglycol, Biocatalyst, Enzymes,  
Esterification

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore

Helena Teixeira Godoy

Heloísa Máscia Cecchi

Gabriela Alves Macedo

Jane Menegaldo Snow

Flávio Leite

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

## BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore  
FEA / UNICAMP  
Presidente

---

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy  
FEA / UNICAMP  
Membro

---

Profa. Dra. Heloísa Máscia Cecchi  
FEA / UNICAMP  
Membro

---

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo  
FEA/UNICAMP  
Membro

---

Profa. Dra. Jane Menegaldo Snow  
ITAL  
Membro

---

Prof. Dr. Flávio Leite  
T&E  
Membro



**Dedico este trabalho a meus pais,  
Luiz e Almary,  
pelo amor, carinho, apoio e compreensão.**



“Uma jornada de mil quilômetros,  
começa pelo primeiro passo”.

Lao Tsu



## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Gláucia Maria Pastore, pela orientação, amizade e compreensão.

A Profa. Helena Teixeira Godoy, pelo incentivo, apoio e amizade desde o curso de Mestrado em Ciência de Alimentos.

A Luciana Blasi pela colaboração nos trabalhos experimentais, Lourdes e Andréia Azevedo pela amizade e incentivo.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições e sugestões apresentadas para a redação final desta tese.

A Carmen Gomez Teixeira A. Rodrigues e Durval Garcia Júnior pelo apoio e incentivo, a Cidinha, Edna e Ione nas traduções.

A Buckman Laboratórios Ltda, pelo apoio financeiro e uso dos laboratórios e equipamentos para a realização deste trabalho e a Buckman Laboratórios Intl., em especial ao pessoal do KRC (Knowledge Resource Center) pelo apoio no levantamento bibliográfico.

A todas as pessoas do laboratório do Bioaromas, pelo apoio e amizade.

Aos colegas da Buckman, em especial à Cristiane, Michael, Fernando, Andréia, Eder, Wagner, Paulão e Peretti pelo apoio durante a realização dos experimentos.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente durante a elaboração deste trabalho.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>1</b>
<b>GERAL.....</b>	
<b>GENERAL SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>5</b>
.	
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>11</b>
<b>BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	
<b>CAPÍTULO 1 – Revisão bibliográfica.....</b>	<b>13</b>
1-Introdução.....	13
2-Lipases.....	14
3-Esterificação de ácidos graxos.....	20
4-Produtos derivados de óleos e gorduras.....	22
5-Produção de ésteres utilizando lipase em larga escala.....	25
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
<b>CAPÍTULO 2 – Seleção de enzimas comerciais para a síntese de mono e diésteres de polietilenoglicol com função surfactante.....</b>	<b>29</b>
RESUMO.....	29
SUMMARY.....	30
1-INTRODUÇÃO.....	31

2-MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1-Material.....	35
2.2-Equipamentos.....	36
2.3- Métodos.....	37
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4-CONCLUSÕES.....	43
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
<b>CAPÍTULO 3 – Estudo da concentração de enzimas comerciais para a síntese de mono e diésteres de polietilenoglicol com função surfactante.....</b>	<b>47</b>
RESUMO.....	47
SUMMARY.....	48
1-INTRODUÇÃO.....	49
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1-Material.....	50
2.2-Equipamentos.....	51
2.3- Métodos.....	51
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4-CONCLUSÕES.....	57
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

<b>CAPÍTULO 4 – Estudo da temperatura na síntese de mono e diésteres de polietilenoglicol utilizando lipases comerciais como biocatalisador.....</b>	<b>61</b>
RESUMO.....	61
SUMMARY.....	62
1-INTRODUÇÃO.....	63
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1-Material.....	65
2.2-Equipamentos.....	66
2.3- Métodos.....	66
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4-CONCLUSÕES.....	77
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
<b>CAPÍTULO 5 – Processo para obtenção de mono e diésteres de polietilenoglicol utilizando lipases comerciais como biocatalisador e avaliação da propriedade surfactante dos produtos obtidos.....</b>	<b>81</b>
RESUMO.....	81
SUMMARY.....	82
1-INTRODUÇÃO.....	83
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	84
2.1-Material.....	84

2.2-Equipamentos.....	85
2.3-Condições experimentais .....	86
2.4-Characterização dos produtos.....	87
2.5-Testes aplicativos.....	89
2.6-Processo para obtenção dos ésteres em escala industrial	90
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
3.1-Acompanhamento da esterificação.....	90
3.2-Characterização dos produtos.....	97
3.2.1-Aparência visual.....	97
3.2.2-Espectrometria no infravermelho (FT-IR).....	99
3.2.3-Cromatografia em camada delgada (CCD).....	105
3.2.4-Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	107
3.3-Testes aplicativos.....	110
3.3.1-Dispersão em água e formação de espuma.....	110
3.3.2-Distribuição do tamanho de partículas.....	113
3.4-Processo para obtenção dos ésteres em escala industrial.....	116
4-CONCLUSÕES.....	118
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
<b>CAPÍTULO 6 – Processo para obtenção de ésteres de ácido esteárico com poliglicóis utilizando lipases e esterases como</b>	<b>123</b>

<b>biocatalisadores e avaliação da propriedade antiespumante dos produtos obtidos.....</b>	
RESUMO.....	123
SUMMARY.....	124
1-INTRODUÇÃO.....	125
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	128
2.1-Material.....	128
2.2-Equipamentos.....	131
2.3-Condições experimentais .....	132
2.4-Characterização dos produtos.....	133
2.5-Testes aplicativos.....	134
2.6-Processo para obtenção do éster em escala industrial.....	136
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	136
3.1-Acompanhamento da esterificação.....	137
3.1.1-Seleção das enzimas para a síntese do éster 3.....	138
3.1.2-Avaliação da concentração das enzimas.....	139
3.1.3-Avaliação do uso da peneira molecular.....	140
3.1.4-Avaliação da adição da quantidade da enzima em duas frações.....	142
3.1.5-Avaliação da adição do ácido esteárico em três frações.....	144
3.1.6-Avaliação da enzima imobilizada em Celite.....	146

3.1.7-Validação do sistema reacional utilizando esterase para obtenção de ésteres glicólicos de ácido esteárico.....	148
3.1.8-Determinação do teor de água durante a esterificação utilizando a enzima I.....	149
3.1.9-Seleção das enzimas para a síntese do éster 4.....	150
3.2-Characterização dos produtos.....	152
3.2.1-Aparência visual.....	152
3.2.2-Espectrometria no infravermelho (FT-IR).....	153
3.2.3-Cromatografia em camada delgada (CCD).....	156
3.3-Testes aplicativos.....	158
3.3.1-Dispersão em água e formação de espuma.....	158
3.3.2-Fotomicrografia das dispersões do éster 3 em água.....	161
3.3.3-Avaliação da eficiência do éster 3 como antiespumante para o processo fermentativo.....	161
3.4-Processo para obtenção dos ésteres em escala industrial.....	164
4-CONCLUSÕES.....	168
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>170</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>173</b>
Anexo I – Gráfico da distribuição do tamanho de partículas do éster 1 obtido com a enzima E.....	173

Anexo II – Gráfico da distribuição do tamanho de partículas do éster 2 obtido com a enzima D.....	174
Anexo III – Fatores significativos para a estimativa de custo do processo químico e biocatalisado para obtenção de ésteres.....	175



## RESUMO GERAL

A síntese de ésteres utilizando biocatalisadores está se tornando técnica e economicamente viável, devido aos benefícios apresentados pelo uso destes catalisadores, aos constantes investimentos no desenvolvimento de enzimas com maior rendimento, estabilidade e atividade enzimática e ao surgimento de enzimas imobilizadas que possibilitam o reuso várias vezes.

Considerando o grande potencial das enzimas como biocatalisadores e apesar de já existirem no mercado algumas aplicações definidas, existe necessidade de estudo e aprimoramento dos processos enzimáticos nesta área, principalmente para estabelecer os processos em escala industrial.

Neste trabalho foi estudada a síntese de quatro ésteres de poliglicóis, com propriedade surfactante e antiespumante, utilizando lipases e esterases como biocatalisadores. Foram avaliadas nove enzimas comerciais de diferentes fornecedores e selecionado três; as quais se apresentaram mais adequadas para os ésteres a serem obtidos e nas condições de processo que possibilitem a produção dos mesmos em escala industrial.

A seleção das enzimas e condições reacionais foram baseadas nos resultados obtidos das 227 reações realizadas em laboratório e 2 reações em escala piloto.

Três ésteres foram obtidos com sucesso por biocatálise, sendo dois com propriedades de surfactante e um com propriedades de antiespumante, igual ou superior aos produtos obtidos por processo químico.

Todos os produtos obtidos por biocatálise apresentaram coloração mais clara, indicando menor oxidação, quando comparados com os produtos obtidos pelo processo químico, no qual é utilizado catalisador ácido e altas temperaturas.

Nos estudos realizados foi possível comprovar a seletividade da esterase avaliada como biocatalisador, ao alterar um dos componentes do substrato.

As esterificações foram realizadas em diferentes temperaturas, concentrações de enzimas e tempos de reação, visando obter condições de processo que permitam a produção dos ésteres em escala industrial.

O acompanhamento das reações foi realizado através de análise titulométrica e espectrometria no infravermelho. A identidade dos ésteres obtidos por biocatálise frente aos ésteres obtidos por processo químico, foi realizada através das técnicas de espectrometria no infravermelho, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência.

A faixa de temperatura ideal para a obtenção dos ésteres estudados foi de 70 – 75° C, com tempo de reação entre 8 e 10 horas e porcentagem de esterificação de até 95%.

Os resultados obtidos comprovam que lipases e esterases podem ser utilizadas, na síntese de ésteres de poliglicóis, em substituição aos catalisadores utilizados nos processos químicos, permitindo a redução da temperatura e pressão do processo. Com isso, aumenta a segurança do processo e reduz os impactos ambientais, pela redução do consumo de energia e uso de catalisadores menos agressivos ao meio ambiente. Salientamos que as enzimas são produzidas com insumos renováveis e processos que causam mínimos impactos ao meio ambiente.

## GENERAL SUMMARY

The ester biocatalyst synthesis is becoming technical and economically viable, based on the associated benefits by the use of these catalyst, the constant investments in enzymes development with high yield, stability, enzymatic activity and new immobilized enzymes that allow multiple uses of the same material.

Considering the great potential of enzymes as biocatalysts and although there is already in the market some defined applications, there is still the need to study and improve the enzymatic processes in this area, mainly to establish processes on industrial scale.

In this paper, the synthesis of four polyglycol esters with defoamer and surfactant properties, using lipases and esterases as biocatalyst, were studied. Nine commercial enzymes coming from different suppliers were evaluated and three were selected; which showed to be more adequate for the esters to be obtained and for the conditions of the process to allow their use on industrial scale.

The selection of enzymes and the reacting conditions were based on the results obtained from the 227 reactions runned in the laboratory and 2 reactions in pilot scale.

Three esters were successfully obtained by biocatalysis, two with surfactant properties and one with defoamer properties, with the same or better performance than the products obtained by the chemical process.

All products obtained by biocatalyst process presented light color, indicating less oxidation, when compared with products obtained by chemical process, where an acid catalyst and high temperatures are used.

Esterase biocatalyst selectivity was demonstrated when one component of the substrate was changed.

Esterification was carried out in different temperatures, enzymes concentrations, and reaction times, in order to obtain adequate process conditions that allowed the

production of esters on industrial scale.

Reaction tracking was done using titration analysis and infrared spectrometry. The identity of esters obtained by biocatalysis in relation to esters obtained by chemical process was established through infrared spectrometry techniques, thin layer chromatography, and high performance liquid chromatography.

The ideal temperature range to obtain the esters studied was 70 – 75° C, with a reaction time between 8 to 10 hours and esterification percentage up to 95%.

The results obtained prove that lipases and esterases can be used in the synthesis of polyglycol esters in substitution to catalysts used in chemical processes, allowing temperature and pressure reduction in the process. Thus, the process safety increases and environmental impacts are reduced, by the reduction of energy consumption and the use of less aggressive catalyst to the environment. It is important to point out that the enzymes are produced with renewable materials and processes that cause minimum impact to the environment.

## **INTRODUÇÃO**

O uso de lipases e esterases como biocatalisadores, na síntese de ésteres, em substituição aos catalisadores utilizados nos processos químicos, permite a redução da temperatura e da pressão do processo, havendo aumento na segurança.

Outro fator relevante do uso de biocatalisadores é a redução dos impactos ambientais, principalmente pela redução do consumo de energia, redução da geração de resíduos decorrentes de resíduos de subprodutos ou catalisadores químicos. Salientamos que os biocatalisadores são produzidos por recursos renováveis.

O consumo de energia impacta significativamente no custo dos produtos, principalmente quando há necessidade de aquecimento a altas temperaturas, que é o caso dos processos químicos para obtenção de ésteres de ácidos graxos.

Nos aspectos toxicológicos, os biocatalisadores são infinitamente menos tóxicos do que os catalisadores químicos.

A qualidade dos produtos obtidos por via biocatalítica caminha para o que chamamos de processo “limpo”, facilitando o enquadramento dos mesmos nas exigências de regulamentação dos produtos para fins alimentícios ou que entrem em contato direto com alimentos, por órgãos como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Food and Drug Administration (FDA) e Federal Institute for Risk Assessment (BfR).

Baseado nessas informações é possível dizer que os processos biotecnológicos, mas especificamente os biocatalisadores, são técnico e economicamente viáveis.

A biotecnologia é a aplicação de organismos simples ou multicelulares e das enzimas produzidas por estes na obtenção de determinados produtos. Os sistemas enzimáticos apresentam vantagens sobre os processos químicos convencionais nas transformações de óleos e gorduras, onde geralmente são

necessários grande número de reações (Ratray, 1984). A maioria das reações orgânicas; esterificações, interesterificações, transesterificações e hidrólises, podem ser realizadas utilizando catalisadores químicos ou biocatalisadores. A biocatálise possibilita melhorias nos processos, incluindo redução de custos operacionais, decorrentes da redução de tempo, gasto de energia e mão-de-obra. Estas são algumas das razões, para o crescente interesse da aplicação de biocatalisadores em síntese química, com destaque para o uso das lipases, em função de sua alta atividade catalítica apresentada em diferentes meios orgânicos (Castro et al., 2005).

As enzimas, denominadas industrialmente de biocatalisadores, são proteínas ou seja, cadeias longas de aminoácidos unidas por ligações peptídicas. São catalisadores muito eficientes e em contraste com os catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais e óxidos metálicos, as enzimas apresentam elevada especificidade, ou seja, formam produtos seletivos. Esta característica é de grande importância nos processos industriais, possibilitando a formação de menor quantidade de subprodutos e aumento da qualidade do produto. Outros fatores relevantes são os benefícios econômicos e ambientais, com menor consumo de energia e geração de menor quantidade de resíduos, bem como aumento da segurança de processo, devido a temperatura e pressão serem inferiores as utilizadas no processo químico. (Bon & Pereira Jr., 1999). As enzimas estão intimamente relacionadas com os processos de biotransformação, que são modificações específicas ou interconversões de estruturas químicas (Castro, 1995).

Dentre os produtos que podem ser obtidos por biotransformação podemos citar os surfactantes e antiespumantes. Estes constituem uma importante classe dos compostos químicos muito utilizados em diversas aplicações industriais. Muitos dos surfactantes disponíveis comercialmente são sintetizados a partir de derivados de petróleo. Geralmente estes compostos são obtidos por processo químico, utilizando altas temperaturas e catalisadores químicos. Entretanto, a crescente preocupação ambiental e de segurança de processo, levaram a procura por

processos que contribuam para a formação de menor quantidade de subprodutos ou contaminantes, redução da quantidade de energia e uso de substâncias de fontes renováveis (Nitschke & Pastore, 2002)

Os surfactantes são moléculas anfipáticas formadas por uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica. A porção hidrofóbica (apolar) é geralmente constituída por uma cadeia de hidrocarbonetos, e a parte hidrofílica (polar) pode ser aniônica, catiônica, não-iônica ou anfotérica. Devido a presença dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, os surfactantes se distribuem na interface óleo/água, havendo a formação de um filme molecular, reduzindo a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades dos mesmos (Nitschke & Pastore, 2002).

As propriedades apresentadas pelos surfactantes, permite seu uso em diversas aplicações industriais, das quais podemos destacar: emulsificação, detergência, capacidade espumante, molhante e dispersante. Os surfactantes são utilizados principalmente na indústria de produtos de limpeza, petróleo, cosméticos e produtos de higiene. A produção mundial deste produto é superior a 3 milhões de toneladas por ano, sendo a maior parte utilizada na fabricação de detergentes domésticos (Nitschke & Pastore, 2002).

No estudo de obtenção de ésteres de poliglicóis biocatalisados, realizado neste trabalho, foram utilizados ácidos graxos de “tall oil”, ácido esteárico e poliglicóis de alto peso molecular.

O “tall oil” é um subproduto do processo Kraft de obtenção de celulose principalmente de pinus, sendo constituído de ácidos graxos de cadeia longa, monocarboxílicos, possuindo de 8 a 22 carbonos em sua molécula (Zachary, et al., 1965). É comercialmente um importante subproduto do processo de manufatura de celulose (Grant & Grant, 1987). O interesse por seu uso deve-se principalmente ao aumento da produção de celulose e o fato de ser um subproduto de fonte renovável.

Os ácidos graxos do “tall oil” podem ser utilizados na produção de lubrificantes,

surfactantes e antiespumantes e é constituído principalmente de ácidos oleico e linoleico.

A composição típica dos ácidos graxos de “tall oil” está apresentada na tabela 1 e o índice de iodo, medida da insaturação de óleos e gorduras, na tabela 2 (Zachary et al., 1965).

**Tabela 1:** Percentual de ácidos graxos presentes no “tall oil” com baixo teor de resina.

Ácidos graxos	Numenclatura geral	Tall Oil Cru (%)	Ácidos graxos de “tall oil” com baixa resina (%)
Palmítico	Hexadecanóico	6	1
Palmitoleico	9-hexadecenóico	1	-
Esteárico	Octadecanóico	1	2
Oleico	cis-9-octadecenóico	41	51
Linoleico (não conjugado)	cis-9-cis-12-octadecadienóico	34	40
Linoleico (conjugado)	-	6	5
Não conhecidos	-	11	4

**Tabela 2:** Índice de iodo dos ácidos graxos de “tall oil” – “TOFA”.

Produto	Índice de iodo
Ácidos graxos de “Tall oil”	140 – 150

Os ácidos graxos de “tall oil” ou seus derivados reagem com álcoois ou fenóis produzindo ésteres. A reação é reversível e os ésteres formados podem ser hidrolisados gerando ácidos e álcoois ou fenóis. A esterificação dos ácidos graxos de “tall oil” geralmente requer temperaturas elevadas ou a presença de catalisadores para acelerar a reação. Foi observado que baixas concentrações de catalisador ácido, a taxa de esterificação é proporcional a concentração do íon hidrogênio. Os catalisadores de esterificação comumente utilizados são ácidos minerais (ácido sulfúrico, ácido clorídrico ou ácido fosfórico), ácido p-toluenossulfônico e resinas de troca catiônica.

É desejável que a reação de esterificação tenha o maior rendimento possível, e isto pode ser favorecido pelo uso de grande quantidade de álcool e posterior remoção do excesso para reuso ou a água formada durante a reação deverá ser removida, geralmente por destilação.

Na preparação de certos ésteres, como os ésteres de sacarose, é mais indicado utilizar o método de transesterificação. O ácido graxo é esterificado primeiramente com um álcool, por exemplo metanol. O éster intermediário reage em seguida com a sacarose, geralmente na presença de catalisador básico, formando o éster desejado. Os ésteres de sacarose estão encontrando aumento de uso como detergentes biodegradáveis.

A oxidação é uma reação envolvendo as duplas ligações presentes nos ácidos graxos insaturados e seus ésteres possibilitando a formação de hidroperóxidos. Estes intermediários podem reagir posteriormente gerando uma variedade de produtos incluindo álcoois, cetonas e material polimérico (Zachary et al., 1965).

O ácido esteárico pode ser utilizado na produção de antiespumantes, através da formação de estearatos de poliglicóis. Estes antiespumantes podem ser utilizados no controle da espuma nos processos fermentativos, na manufatura de papéis e em outros processos.

Com a biotecnologia, vários processos enzimáticos têm sido estudados visando

obter produtos mais nobres a partir de óleos e gorduras de valor comercial mais baixo. Atualmente, o uso de lipases (triacilglicerol acilhidrolase, (EC 3.1.1.3) como catalisadores de reações de interesterificação tem despertado grande interesse, pois os resultados obtidos demonstram boa eficiência do processo.

Assim sendo, a cada ano surgem novas moléculas nos laboratórios de pesquisa em todo o mundo. Porém, há um longo caminho entre a síntese de uma molécula em bancada e a produção da mesma em escala industrial. Para que as novas moléculas tenham condições de serem produzidas em larga escala e em menor espaço de tempo, os cuidados devem iniciar nas fases de síntese em bancada, visando o desenvolvimento de produtos e processos que sejam inovadores e técnico-economicamente viáveis.

Baseado na premissa acima, o presente trabalho teve como principais objetivos:

- estudar a obtenção de ésteres de ácidos graxos, utilizando lipases e esterases como biocatalisadores e baixa temperatura.
- obter ésteres com as mesmas características, com grau de pureza superior e melhor qualidade quando comparado aos produtos obtidos pelo processo convencional (catalisador químico e temperatura elevada).
- avaliar a aplicabilidade dos produtos sintetizados por via biocatalítica como surfactante e antiespumante.
- não utilizar solventes orgânicos nas reações biocatalisadas para evitar etapas de recuperação ou uso dos mesmos.
- propor um sistema reacional que permita a manufatura dos produtos em escala industrial, levando em consideração aspectos de custo, segurança de processo, impactos ambientais e toxicológicos

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BON, E.P.S., PEREIRA JR, N.. Biocatalisadores. *In: Tecnologia enzimática*, Enzitec, Rio de Janeiro, 1999.

BON, E.P.S., PEREIRA JR, N.. Bioprocessos industriais. *In: Tecnologia enzimática*, Enzitec, Rio de Janeiro, 1999.

CASTRO, H.F.. Fine chemicals by biotransformation using lipases. *Química Nova*, 18 (6):544 - 554, 1995.

CASTRO, H.F., PAULA, A.V., BARBOZA, J.C.S.. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. *Química Nova*, 28 (5):792-796, 2005.

GRANT, R., GRANT, C.. Tall oil production and processing. *In: Grant and Hockh's Chemical Dictionary*, McGraw-Hill Book Company, 1987.

NITSCHKE, M., PASTORE, G.M.. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *J. Química Nov.*, 25(5):772-776, 2002.

RATTRAY, J.B.M.. Biotechnology and the Fats and Oils Industry. An Overview. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61(11):1701-1712, 1984.

ZACHARY, L.G., BAJAK, H.W., EVELINE, F.J.. Introduction to tall oil. *In: Tall oil and its uses*, Pulp Chemicals association, New York, 1965.

ZACHARY, L.G., BAJAK, H.W., EVELINE, F.J.. The chemistry of tall oil fatty and rosin acids. *In: Tall oil and its uses*, Pulp Chemicals association, New York, 1965.



## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

**Luiz W. B. PACE; Gláucia M. PASTORE**

#### **1- INTRODUÇÃO**

A maioria das reações orgânicas, esterificações, interesterificações, transesterificações e hidrólises, podem ser realizadas utilizando catalisadores químicos ou biocatalisadores. A biocatálise possibilita melhorias nos processos, incluindo redução de custos operacionais, decorrentes da redução de tempo, gasto de energia e mão-de-obra. Estas são algumas das razões, para o crescente interesse da aplicação de biocatalisadores em síntese química, com destaque para o uso das lipases, em função de sua alta atividade catalítica apresentada em diferentes meios orgânicos (Castro et al., 2005).

A biotecnologia é a aplicação de organismos simples ou multicelulares e das enzimas produzidas por estes na obtenção de determinados produtos. Estes sistemas estão sendo utilizados nas reações de hidrólise de triacilgliceróis, formação de ésteres cerosos, acilação de glicerol, interesterificação de triacilgliceróis e na formação de esteróis. Os sistemas enzimáticos apresentam vantagens sobre os processos químicos convencionais nas transformações de óleos e gorduras, onde são necessários geralmente grande número de reações (Ratray, 1984).

Os desenvolvimentos em enzimologia, denominado de engenharia de proteínas e reações enzimáticas em meio não aquosos, tem aumentado o potencial das aplicações das enzimas como catalisador industrial (Castro & Anderson, 1995).

Atualmente devido ao aparecimento de novas enzimas, surgem oportunidades de

sua utilização em várias aplicações, sendo o uso das mesmas em síntese orgânica, uma área de grande expansão; entretanto sua aplicação é ainda restrita a alguns grupos que não necessitam de co-fatores específicos, como as enzimas que causam hidrólise (Castro & Anderson, 1995).

Segundo Castro & Anderson (1995), havia a concepção de que as enzimas não se destinavam a síntese orgânica, devido principalmente a idéia de que somente o meio aquoso permitia a manutenção da conformação estrutural da enzima na sua forma ativa. Hoje sabemos que muitas enzimas ou complexos enzimáticos possuem atividade enzimática em meios hidrofóbicos, com grau de eficiência que permite sua utilização em síntese orgânica, igual ou superior ao encontrado em meio aquoso, utilizado nas reações de hidrólise.

Como as enzimas permanecem na sua conformação original, isto permite seu uso nos processos catalíticos em meio orgânico. O fato da cadeia não se desdobrar em meio não aquoso está relacionado às interações eletrostáticas entre os grupos que compõem as enzimas. Devido à baixa constante dielétrica da maioria dos solventes e o aumento do número de pontes de hidrogênio intramoleculares, as interações eletrostática estão aumentadas. O fato das enzimas possuírem atividade em meio não aquoso, possibilita seu uso na síntese de ésteres, uma vez que esta reação ocorre na ausência de água.

Os ésteres possuem muitas aplicações em alimentos, cosméticos, medicamentos e na formulação de outros produtos químicos. Comparado com a síntese convencional, utilizando catalisadores químicos, as reações biocatalisadas possuem algumas vantagens, como por exemplo uma única etapa no processo e condições reacionais moderada (Adachi & Kobayashi, 2005).

## **2- LIPASES**

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases EC 3.1.1.3) (Carvalho, et al.,2003) e esterases (carboxiesterases EC 3.1.1.1) (Besancon, et al., 1995) são um

importante grupo de enzimas associadas com o metabolismo e com a degradação de lipídeos. Estão amplamente distribuídas na natureza sendo encontradas em tecidos e fluídos de origem animal e vegetal e em microrganismos. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases de origem bacteriana são as mais importantes, pois podem ser produzidas em maior quantidade, com mais facilidade quando comparadas com as de outras origens (Castro & Anderson, 1995).

Certas lipases podem ter sua síntese induzida ou suprimida pela presença de determinados compostos no meio fermentativo. A produção pode ser inibida pela presença de açúcares simples como glicose ou frutose e ainda glicerol no meio de fermentação; entretanto, alguns compostos, como ácidos graxos e lipídeos, incluindo triglicerídeos podem estimular a síntese enzimática. Os meios para fermentação são constituídos principalmente por polissacarídeos complexos como amido ou trigo, triglicerídeos ou ácidos graxos como fonte de carbono e energia. As fontes de carbono podem ser peptonas, extrato de carne ou caseína hidrolisada (Macrae & Hammond, 1985).

Duas lipases bastante diferentes são produzidas pela *Candida antarctica*, denominadas A e B. Ambas lipases são estáveis em ampla faixa de pH, sendo que a A é mais estável em pH ácido, enquanto que a B, apresenta maior estabilidade em pH alcalino. A enzima A, é extremamente termoestável, possuindo uma temperatura ótima de atuação acima de 90°C. Esta lipase, é provavelmente a lipase mais termoestável descrita na literatura, causando um certa surpresa, uma vez que é originada de um microrganismo adaptado ao frio. As duas enzimas podem ser utilizadas por milhares de horas em temperatura elevada sem perda significativa da atividade. A enzima A possui uma preferência pela posição sn-2 nos triglicerídeos, mas esta seletividade não é tão pronunciada que selecione somente a síntese de 1,3-diglicerídeos ou 2-monoglicerídeos (Christensen & Kirk, 2002).

Os triglicerídeos são os substratos naturais das lipases e seu modo de ação está relacionado com as propriedades interfaciais nos sistemas bifásicos (Borgston & Brockman, 1984).

Quanto a especificidade, as lipases podem ser divididas em três grupos principais, segundo Macrae & Hammond, 1985, Sonnet, 1988 e Castro et al., 2004:

- 1) Lipases não específicas: catalisam a hidrólise completa do triglicerídeo em ácidos graxos e glicerol, produzindo mono e diglicerídeos como intermediários.
- 2) Lipases 1,3 específicas: hidrolisam os triglicerídeos nas ligações C1 e C3 do glicerol produzindo ácidos graxos, 2 monoglicerídeos e 1,2 ou 2,3 diglicerídeos, sendo que ambos são quimicamente instáveis, ocorrendo a formação de 1,3 diglicerídeos e 1 ou 3 monoglicerídeos, devido a migração do grupo acil.
- 3) Lipases ácido graxo específicas: são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres constituídos de ácidos graxos de cadeia longa insaturada com duplas ligações em cis, no carbono 9. Ésteres com ácido graxos saturados ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados.

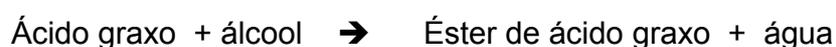
A especificidade das lipases pode ser utilizada na produção de misturas específicas como, por exemplo, na obtenção de substitutos da manteiga de cacau a partir de óleos vegetais de menor valor comercial (Chang et al., 1990).

A especificidade das lipases é um fator muito importante para a aplicação industrial, uma vez que a enzima pode ser específica em relação à molécula alcoólica ou ácida do substrato. Algumas lipases possuem estereoespecificidade, ou seja, a capacidade de diferenciar os enantiômeros de uma mistura racêmica. A especificidade estrutural ou regioseletividade é devido à orientação imposta pelas dimensões e estrutura do centro ativo a ser ligado no substrato. A seletividade e a estereoquímica é decorrente da quiralidade da enzima, ou seja, da simetria estrutural, que limita a ação em substratos que não atendam determinadas relações espaciais. (Castro et al., 2004).

As enzimas lipolíticas, como as demais enzimas, são solúveis em água, porém tem a capacidade de atuar em substratos insolúveis em água, sendo que a reação enzimática ocorre na interface óleo/água. As lipases apresentam melhor atividade na faixa de pH entre 4 a 9 e temperatura que varia da ambiente até 70°C, seu

peso molecular pode variar de 20.000 a 200.000. Diferenciam das esterases pois além de atuarem na interface óleo/água preferem como substratos, ácidos graxos de cadeia longa (Castro et al., 1995). Dependendo da fonte, as lipases apresentam massa molecular variando de 20 a 75kDa, faixa de temperatura ótima de 30 a 40°C, porém sua termoestabilidade pode variar bastante, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (Castro et al., 2004).

A reação inversa da hidrólise, ou seja a esterificação de glicerol e ácidos graxos, também pode ser catalisada pelas enzimas lipolíticas, desde que o meio possua concentração restrita de água (Carvalho et al., 2003):



O uso das lipases no modo reverso, ou seja, seu uso na síntese de ésteres, interesterificações e resolução de misturas racêmicas para produzir compostos opticamente ativos foi descrito por Macrae (1985) e Castro & Anderson (1995). Este conhecimento é de grande importância para muitas aplicações industriais, assim como a possibilidade das reações ocorrerem na ausência de solvente, é uma vantagem de elevado valor (Castro & Anderson, 1995).

Como citado por Castro & Anderson (1995) o controle da quantidade de umidade é o principal fator para o sucesso de vários processos catalisados por lipases em meio orgânico, devido a reversibilidade da atividade da lipase. Uma grande quantidade de água é predominante nas reações de hidrólise, enquanto que baixa concentração de água favorece as reações de síntese. Na síntese de ésteres as três principais fontes de água no sistema podem estar relacionadas com solvente, enzima e a água formada durante a reação.

Merçon et al.,(2000), estudaram a hidrólise enzimática de óleo de babaçu utilizando lipase imobilizada de *Candida cylindracea*, em biorreator de membrana.

Porsoske et al. (1988) compararam a interesterificação química e enzimática de estearina, afirmando que o método enzimático é economicamente viável.

Pastore (1992) estudou o efeito da proporção molar entre glicerol e ácido oleico na esterificação enzimática para a produção de monoleína, utilizando lipase de *Penicillium* sp. A maior porcentagem de esterificação utilizando-se lipase de *Penicillium* sp foi obtida utilizando-se concentração de glicerol 63,3 vezes maior que a concentração de ácido oleico presente no sistema de reação.

Macedo (1995) estudou a produção de ésteres utilizando lipase de *Geotrichum* sp, ácido oleico e glicerol como substrato. A relação molar entre glicerol e ácido oleico que apresentou maior esterificação foi de 60 vezes mais glicerol que o ácido, sendo obtido 63% de esterificação após 15 minutos e na temperatura de 40°C.

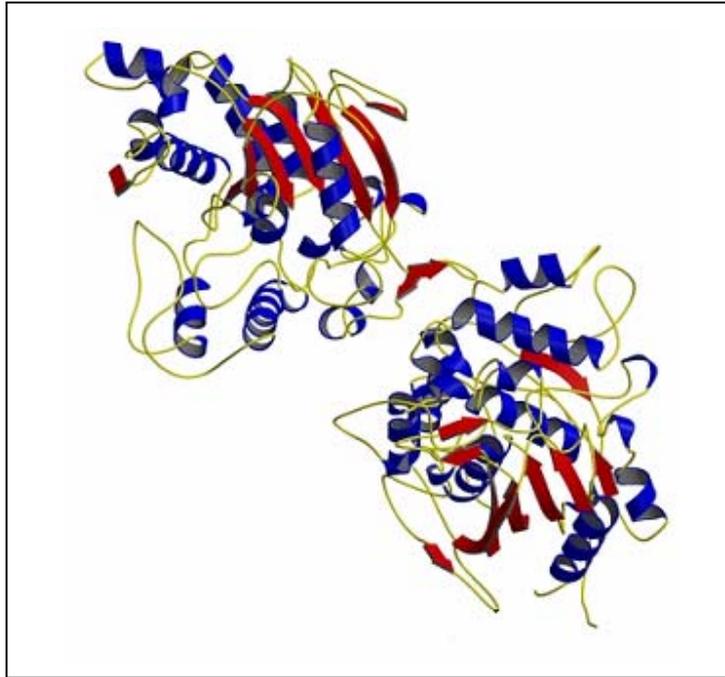
A imobilização refere-se a localização das lipases, permitindo o reuso da enzima (Gandhi et.al, 2000). As lipases imobilizadas podem ser separadas facilmente da mistura do substrato e serem reutilizadas outras vezes (Kilara, 1985).

O procedimento padrão para imobilização de lipases em carreadores sólidos hidrofílicos na forma de pó, consiste em dissolver a lipase em solução tampão, misturando esta solução muito bem com o pó, remoção do sobrenadante e posterior secagem para estocagem. Celite é um dos suportes que foi muito estudado (Malcata et al., 1990). Outros métodos de imobilização consistem em adsorção em superfícies hidrofóbicas ou iônicas, fixação através de ligações covalentes e adsorção em géis poliméricos (Gandhi et al., 2000).

Gandhi et al. (2000) relatou que as enzimas imobilizadas têm preferência por ácidos graxos de cadeia curta (C2 – C6), enquanto que as enzimas livres preferem os de cadeia longa (C14 – C18), bem como demonstrou o aumento na termoestabilidade das lipases imobilizadas.

A estrutura tridimensional da lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática foram determinadas em 1990, sendo que já foram determinadas mais de onze estruturas de lipases, com exceção da lipase pancreática, todas são de origem microbiana. Estas enzimas apresentam uma característica padrão

denominada de entrelaçado de  $\alpha/\beta$  hidrolase. O sítio ativo da lipase é constituído por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos: serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina (Castro et al., 2004)



**Figura 1:** Esquema da estrutura da lipase de *B. stearothermophilus*.

A estrutura tridimensional da lipase fornece uma explicação para a ativação interfacial. O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, chamada de tampa ou borda. Quando o substrato liga-se na superfície da enzima, a tampa se move, tornando o sítio ativo acessível ao substrato e, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilitar a ligação da lipase à interface. Entretanto, uma estrutura em forma de tampa não está necessariamente relacionada com a ativação interfacial (Castro et al., 2004)

### **3- ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS**

A esterificação direta dos ácidos graxos com álcool pode ser catalisada por um catalisador ácido ou enzimático:



Os solventes afetam o equilíbrio da reação, sendo que solventes orgânicos miscíveis e imiscíveis em água tem sido utilizado nos meios reacionais para reações de condensação, catalisados por lipases. O uso de solventes miscíveis em água, apresenta a vantagem que os substratos hidrofílicos, são solubilizados em certa extensão, sem a necessidade de adição de reagentes solubilizantes para facilitar a esterificação dos substratos. Entretanto, solventes miscíveis em água podem remover a água da molécula de lipase, essencial a atividade catalítica; podendo levar a uma desativação da enzima (Adachi & Kobayashi, 2005).

A reação de condensação ocorre geralmente com solvente puro com baixo teor de água. Mesmo que o solvente fornece somente o meio para a reação, existem casos no qual o tipo de solvente afetar o equilíbrio da conversão, podendo levar a formação de um tipo de éster, como por exemplo, monoésteres (Adachi & Kobayashi, 2005).

As reações catalisadas por lipases ocorrem na interface água-lipídeo, fazendo que algumas vezes, as cinéticas das reações enzimáticas não sejam descritas pelas equações de Michaelis-Menten, as quais são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea (Castro et al., 2004).

Mono e diglicerídeos são muito utilizados como emulsificantes e podem ser obtidos por síntese química envolvendo temperaturas superiores a 200°C, gerando produtos com cor, gosto e aroma indesejáveis. A obtenção de emulsificantes, utilizando lipase de *Penicillium cyclopium* permitiu a obtenção de 95% de monoglicerídeos sob condições de excesso de glicerol (1:15), durante 100 horas e temperatura de 40°C. As lipases também podem catalisar a síntese de ésteres de poliglicerol, sendo estes ingredientes multifuncionais, possuindo as seguintes aplicações: emulsificantes, substitutos de gorduras, meio de solubilização de vitaminas lipossolúveis, sorvetes, margarinas, coberturas, sobremesas e produtos de panificação (Castro et al., 2004).

Castro et al. (2004) também relataram a produção de ésteres de ácidos graxos e açúcares, utilizando biocatalisadores, os quais são muito utilizados como emulsificantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. O processo consiste na esterificação de carboidratos (glicose, frutose, sacarose e sorbitol) com ácidos graxos (esteárico, oleico e linoleico) utilizando enzimas lipolíticas de fontes diferentes. Uma limitação deste processo é a alta polaridade do solvente necessário para a dissolução dos açúcares, o que pode levar à inativação da enzima.

Diacil e monoacilglicerol foram obtidos utilizando ácido oleico em solvente orgânico (hexano) e lipases de *Rhizomucor miehei* (RMIM) e *Thermomyces lanuginosa* (TLIM), sendo observado um alto grau de esterificação (>90%) (Tripathi et al., 2006).

O acetato de citronila foi sintetizado por transesterificação com acetato de etila e citronelol, com rendimento de 58% após 48 horas a 45°C e 48% de rendimento quando foi utilizado acetato de butila e citronelol. O butirato de citronila também foi obtido por esterificação direta com rendimento variando de 95 a 100% após 24 horas de reação com ou sem hexano. Os resultados indicaram que o tamanho da cadeia alifática do doador acila influencia na taxa de conversão. Ácidos com mais de dois carbonos mostraram-se um bom substrato para lipase de *Rhizopus* sp. A reação de transesterificação apresentou diferente comportamento, sendo que ao utilizar éster com quatro carbonos, como substrato, o rendimento foi superior ao observado para éster de seis carbonos, na síntese do acetato de citronila (Macedo et al., 2003).

Atualmente, muitos grupos de pesquisadores estão estudando a transesterificação catalisada por lipase de substratos quirais em líquidos iônicos. Os líquidos iônicos estão recebendo atenção como solvente para sínteses orgânicas em geral e alguns processos catalíticos em particular, sendo considerados como solventes "green". Por não serem voláteis e apresentarem estabilidade térmica, tornam-se atrativos como potenciais alternativos para os solventes orgânicos voláteis, principalmente os hidrocarbonetos clorados (Sheldon et al., 2002).

A estabilidade térmica de diferentes preparações de *Cândida antarctica* (CaLB) em solvente orgânico e líquido iônico. Foi observado aumento da atividade da enzima livre e imobilizada, quando diluída em líquido iônico [bmim] [PF6] comparado com solvente orgânico (butanol). Em contraste com os resultados relatados anteriormente, não foi observado o mesmo efeito quando a enzima de *Cândida antarctica* foi utilizada na forma de CLECs (“crosslinked enzyme crystals”) e CLEAs (“crosslinked enzyme aggregates”), sendo necessário novos estudos (Sheldon et al., 2002).

Castro et al. (1995) citou que a demanda por ácidos graxos tem crescido cerca de 4% por ano, nos últimos 10 anos e atingiu cerca de 3.000.000 toneladas métricas por ano. Os ácidos graxos naturais são obtidos da hidrólise de gordura animal, óleo de coco, palma e soja e da fração de destilação do “tall oil” cru.

Cerca de 100.000 toneladas métricas de ácidos graxos naturais são consumidos na preparação de vários ésteres de ácido graxo. Os ésteres simples com álcoois de cadeia pequena (ésteres de metila, etila, n-propila, isopropila e butila) são usados como emolientes em cosméticos e outros produtos de higiene pessoal e lubrificantes. Ésteres de ácidos graxos com álcoois mais complexos, como sorbitol, etilenoglicol, dietilenoglicol e polietilenoglicol são utilizados em alimentos, produtos de higiene pessoal, papel, tratamento de águas e lubrificantes sintéticos

#### **4- PRODUTOS DERIVADOS DE ÓLEOS E GORDURAS**

Gervajio (2005) relatou que a indústria oleoquímica apresenta um bom desenvolvimento e um futuro seguro devido ao fornecimento seguro de matérias-primas. A produção mundial de óleos e gorduras tem crescido rapidamente ao longo das últimas décadas. As principais fontes de matérias-primas dos ácidos graxos naturais são derivadas de sebo, óleo de “tall oil” cru, óleo de soja, côco e palma.

Diferentes frações de ácidos graxos podem ser esterificadas com um monoálcool

ou poliálcool para produzir vários ésteres. Ésteres de poliálcoois podem ser utilizados como base para a produção de lubrificantes de alta performance. A re-esterificação de ácidos graxos com cadeia C8 – C10 com glicerol produz um triglicerídeo de cadeia média, baixa viscosidade e altamente estável. Triglicerídeos de cadeia média são utilizados com solventes para aromatizantes e no tratamento da superfície de frutos secos (Gervajio, 2005).

A esterificação com monoálcool, como isopropanol e ácido mirístico, produz miristato de isopropila, um componente de grande relevância na indústria cosmética. Monoésteres de glicerila e ésteres de cera são utilizados com emulsificantes em alimentos, agentes de desmoldagem e lubrificantes para a indústria plástica (Gervajio, 2005).

Os oleoquímicos, como o próprio nome diz, pode ser definido como a química dos óleos. Estes podem ser naturais ou óleos de origem petroquímica. Os oleoquímicos naturais são obtidos de óleos naturais com a mínima modificação na fração da cadeia carbônica. Ao contrário, os oleoquímicos sintéticos são formados a partir do etileno para uma fração desejada da cadeia carbônica ou da oxidação das ceras do petróleo.

Os óleos e gorduras são considerados produtos naturais renováveis, sendo que os óleos se apresentam na forma líquida à 20° C.

Os ácidos graxos e os ésteres metílicos de ácidos graxos são provavelmente os mais importantes oleoquímicos básicos desta indústria. Os ácidos graxos são usados como precursores de sabões, triglicerídeos de cadeia média, ésteres de poliálcoois, alcanolamidas e muitos outros.

Existem quatro processos bem conhecidos utilizados na quebra de produtos graxos (Gervajio, 2005):

a) Twitchell: foi um dos primeiros processos desenvolvidos para quebra de produtos graxos. Ainda é utilizado para pequenas quantidades, devido ao seu baixo custo inicial e simplicidade de instalação e operação. Entretanto não é de

interesse comercial, devido ao alto consumo de energia e baixa qualidade do produto. O processo faz uso do reagente de Twitchell e ácido sulfúrico para catalisar a hidrólise.

b) descontínuo por autoclave: é o mais antigo método comercial para a quebra alta quantidade e produzir ácidos graxos de coloração mais clara. É um processo mais rápido que o Twitchell, levando de 6 a 10 horas para completar, utilizando como catalisador, óxidos de zinco, magnésio ou cálcio.

c) contínuo: é um processo contínuo e em contra corrente para quebra de material graxo, utilizando alta temperatura e pressão, permitindo a reação em curto espaço de tempo. Não é necessário utilizar catalisadores, mas seu uso pode aumentar a velocidade da reação.

d) enzimático: óleos e gorduras podem ser hidrolizados na presença de enzimas lipolíticas, sendo que os estudos realizados com *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus* com temperatura na faixa de 26 – 46°C, por um período de 48 – 72 horas permitiu uma quebra de até 98%. Existe ainda necessidade de mais desenvolvimento para que este produto torne-se economicamente viável.

Lindfield et al., em 1984, estudou a hidrólise enzimática de óleos e gorduras por lipase de *Cândida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, numa faixa de temperatura de 26-46°C por um período de 48-72 horas, sendo possível obter 98% de quebra, sendo que ainda havia problemas a serem estudados no desenvolvimento deste processo, antes de se tornar comercialmente viável.

## **5- PRODUÇÃO DE ÉSTERES UTILIZANDO LIPASE EM LARGA ESCALA**

Poucos estudos tem sido realizados para síntese de ésteres em grande escala, utilizando lipase com catalisador. Estes estudos podem ser úteis para auxiliar na comercialização dos processos de esterificação enzimáticos. Foi relatado o aumento de escala, na síntese do acetato de hexenila em hexano, do laboratório (3-5g) para a planta piloto (1-5Kg). Quando o volume da reação aumentou de 20 para 2000mL, o tempo necessário par atingir a conversão de 90% aumentou de 24

para 48 horas. Para um volume de 13,5L, a conversão foi baixa, 43% mesmo após 46 horas. Removendo a água formada durante a esterificação por destilação a conversão atingiu 50% em 48 horas. Reduzindo o volume pela metade, a conversão aumentou para >90%. O acúmulo de água pode reduzir a eficiência da enzima em relação a esterificação. Muitos estudos para a produção de ésteres utilizando lipases foram realizados em escala de laboratório, porém poucos estudos tem sido feito, principalmente de maneira sistemática, para a produção em escala maior (Gandhi et al., 2000).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, S., KOBAYASHI, T.. Synthesis of esters by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water miscible organic solvent. **J. Biosci. Bioeng.**, 99(2):87-97, 2005.

BESANCON, X., RATOMAHENINA, R., GALZY, P.. Isolation and partial characterization of an esterase from *Debaryomyces hansenii* strain. **Ned. Melk Zuiveltijdschr.**, 49(2-3):97-110, 1995.

CARVALHO, P.O., CAMPOS, P.R.B., NOFFS, M.D., OLIVEIRA, J.G., SHIMIZU, M.T., SILVA, D.M.. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Quím. Nova**, 26(1):75-80, 2003.

CASTRO, H.F., ANDERSON, W.A.. Fine chemicals by biotransformation using lipase. **Química nova**, 18(6):544- 554, 1995.

CASTRO, H.F., PAULA, A.V., BARBOZA, J.C.S.. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**, 28 (5):792-796, 2005.

CASTRO, H.F., MENDES, A.A., SANTOS, J.C., AGUIAR, C.L.. Modificação de oleos e gorduras por biotransformação. **Química nova**, 27(1):146-156, 2004.

CHANG, M.K., ABRAHAN,G., JOHN,V.T.. Production of Cocoa Butter-Like Fat from Interesterification of Vegetable Oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 67(11):832-834, 1990.

CHRISTENSEN, M.W., KIRK, O.. Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin. **Organic Process Research & Development**, 6(4):446-451, 2002.

GANDHI, N.N., PATIL, N.S., SAWANT, S.B., JOSHI, J.B.. Lipase-catalyzed esterification. **CATAL. REV.-SCI. ENG.**,42(4):439-480, 2000.

GERVAJIO, G.C.. Fatty acids and derivatives from coconut oil. **Bailey's industrial oil and fat products**, 1- 55, 2005.

KILARA, A.. Enzyme modified lipid food ingredients. **Process Biochem.**, 20(4):35-

45, 1985.

LINFIELD.W.M., BARAUSKAS, R.A., SIVIERI, L., SEROTA, S.,STENVENSON R.W.. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61(2):191-195, 1984.

MACEDO, G.A..Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações de lipase de *Geotrichum* sp.. **Tese de mestrado**, 1995.

MACEDO, G.A., LOZANO, M.M.S., PASTORE, G.M.. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp. *J. Biotechnol.*, 6 (1):1-4, 2003.

MALCATA, F.X., REYES, H.R., GARCIA, H.S., HILL, C.G.. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67 (12):890-908, 1990.

MACRAE, A.R., HAMMOND, R.C.. **Present and Future Applications of Lipases. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.**, 3:193-217, 1985.

MERÇON,F., SANTÁNNA, G.L., NOBREGA,R.. Lipase immobilized membrana reactor applied to babassu oil hydrolisis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 14(1):1-12, 1997.

PASTORE, G.M..Produção e caracterização bioquímica de monoacilglicerol lipase microbiana e aplicação de lipases na hidrólise e esterificação enzimática. **Tese de doutorado**, 1992.

POSORSKE, L.H. at all. Process Consideration of Continuous Fat Modification with an Immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65(6), 1988.

RATTRAY, J.B.M.. Biotechnology and the Fats and Oils Industry. An Overview. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61(11):1701-1712, 1984.

SHELDON, R.A., LAU, R.M., SORGEDRAGER, M.J., RANTWIJK, F., SEDDON,

K.R.. Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chemistry*, 4:147-151, 2002.

SONNET, P.E.. Lipases Selectivities. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65(6):900-904, 1988.

TRIPATHI, V., TRIVEDI, R. SINGH, R.P.. Lipase catalyzed synthesis of diacylglycerol and monoacylglycerol from unsaturated fatty acid in organic solvent. *J. Oleo Sci.*, 55(2):65-69 (2006).

ZACHARY, L.G., BAJAK, H.W., EVELINE, F.J.. Introduction to tall oil. *In: Tall oil and its uses*, Pulp Chemicals association, New York, 1965.

ZACHARY, L.G., BAJAK, H.W., EVELINE, F.J.. The chemistry of tall oil fatty and rosin acids. *In: Tall oil and its uses*, Pulp Chemicals association, New York, 1965.

## CAPÍTULO 2

### SELEÇÃO DE ENZIMAS COMERCIAIS PARA A SÍNTESE DE MONO e DIÉSTERES DE POLIETILENOGLICOL COM FUNÇÃO SURFACTANTE

Luiz W. B. PACE; Gláucia M. PASTORE

## RESUMO

A necessidade de processos seguros para a síntese de ésteres economicamente viáveis e que levem a obtenção de produtos com maior pureza e consequentemente, melhor qualidade é uma realidade atualmente.

O objetivo desse trabalho foi avaliar e selecionar enzimas (lipases) comerciais a serem utilizadas como biocatalisadores na síntese de ésteres de polietilenoglicol, visando a manufatura destes em escala industrial.

A seleção de enzimas para a obtenção de ésteres de ácidos graxos de “tall oil” e polietilenoglicol, foi realizada utilizando síntese em escala de laboratório em “shaker” com temperatura e velocidade controladas.

O acompanhamento da esterificação foi realizada através de análise titulométrica, para a determinação de ácidos graxos.

O método apresentou-se eficiente para a seleção prévia das enzimas, sendo observado percentual de esterificação superior a 80% para o éster 1 e de 70% para o éster 2.

Três enzimas foram selecionadas para continuidade dos estudos, visando estabelecer a melhor temperatura e tempo de reação para a obtenção de mono e diésteres de ácidos graxos de “tall oil” e polietilenoglicol

**Palavras-chave:** biocatalisadores, lipases, ésteres.

## SUMMARY

The necessity of a process for ester synthesis, safe and economically viable, to have products with high purity and better quality is a reality nowadays.

The objective of this paper is to evaluate and select commercial enzymes (lipases) to be used as biocatalysts in the synthesis of polyethyleneglycol esters, so they can be used in manufacturing on industrial scale.

Enzyme selection for tall oil fatty ester of high molecular weight polyethylene glycol was carried using synthesis in laboratory, with a controlled temperature and speed shaker.

The esterification evaluation was made using titration analysis for fatty acid determination.

The method showed to be efficient for the previous selection of the enzymes. The esterification percentage showed to be superior to 80% for ester 1 and to 70% for ester 2.

Three enzymes were selected for the continuity of the studies to determine the best temperature and reaction time in order to obtain mono and diesters of polyethylene glycol fatty acid esters.

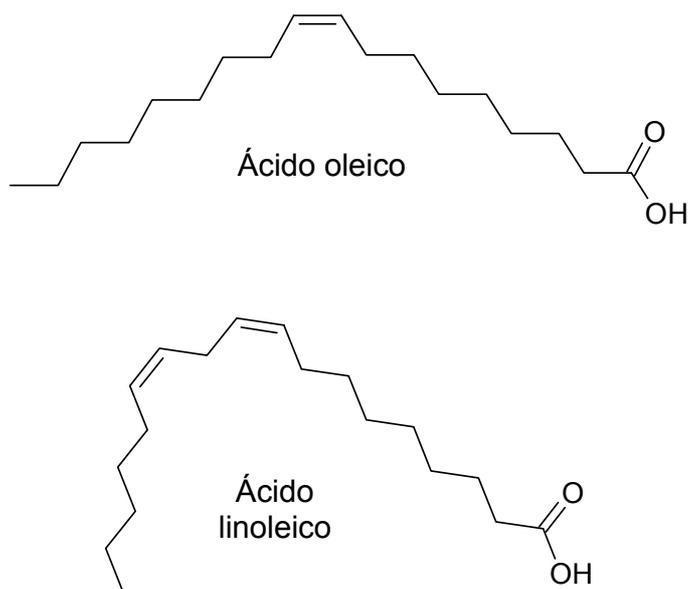
**Key words:** biocatalysts, lipases, esters

## **1- INTRODUÇÃO**

Os ésteres de ácidos graxos com polietilenoglicol são surfactantes não-iônicos de aixa espuma, os quais são usados em diversas aplicações, como agentes de destintamento, emulsificantes em microbicidas e agentes de limpeza. Produtos

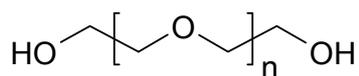
cosméticos, nutricionais e farmacêuticos frequentemente possuem mono e diésteres de dióis em sua composição (Janssen & Haas, 1994).

Na figura 1 estão representadas as estruturas do ácido oleico e ácido linoleico, principais componentes do “tall oil” e utilizados em reações de esterificação com polietilenoglicóis para a obtenção de ésteres com propriedade de surfactante não iônico (Zachary et al., 1965).



**Figura 1:** Representação da estrutura do ácido oleico e ácido linoleico.

O polietilenoglicol de peso molecular 400 está representado na figura 2.



Onde  $n = 7-8$

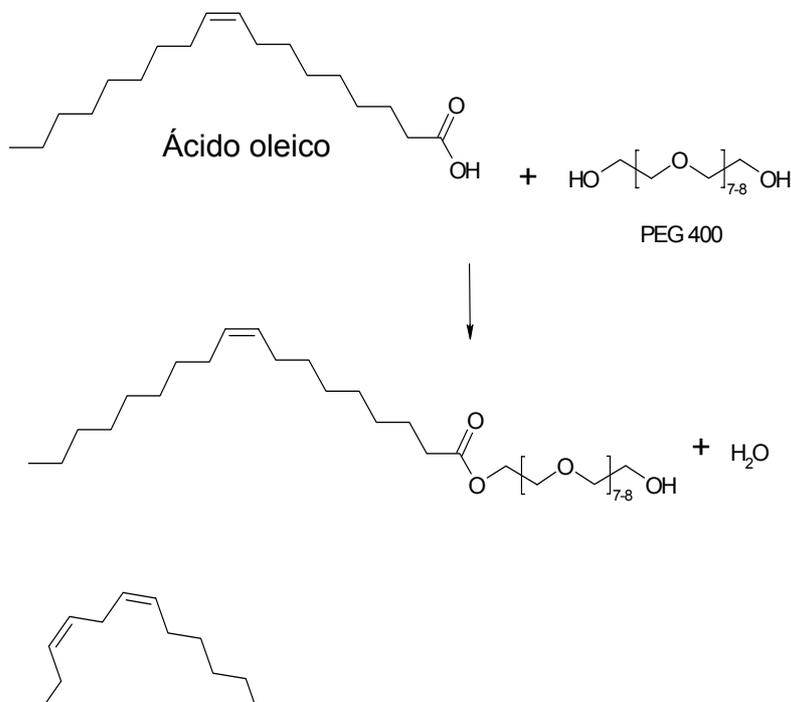
**Figura 2:** Representação da estrutura do polietilenoglicol 400.

Janssen & Haas (1994) estudaram a síntese enzimática de mono e diésteres formado pela reação de ácido oleico com polietilenoglicol 400. Ao contrário da síntese química desses compostos, na qual se utiliza temperaturas elevadas e catalisadores tóxicos, as reações catalisadas por enzimas parecem ser uma alternativa mais atrativa e com redução de energia. Além das condições mais moderadas em que as reações catalisadas por enzimas ocorrem, uma maior pureza do produto, resultante da seletividade pelo substrato e ausência da formação de subprodutos são outras vantagens observadas quando enzimas são utilizadas como biocatalisadores.

As lipases são conhecidas e amplamente utilizadas não somente pela capacidade de hidrolisar os ésteres em meio aquoso, mas também por formar ligações ésteres em solventes aquosos e orgânicos (Janssen & Haas, 1994).

Janssen & Haas (1994), relataram a relativa insolubilidade dos dióis, particularmente do polietilenoglicol, em solventes não polares, aumentando a possibilidade de baixa esterificação, uma vez que estes solventes são utilizados em esterificações catalisadas por enzimas.

A reação do ácido oleico e ácido linoleico com polietilenoglicol 400 (PEG 400) formando monoésteres está representada na figura 3.



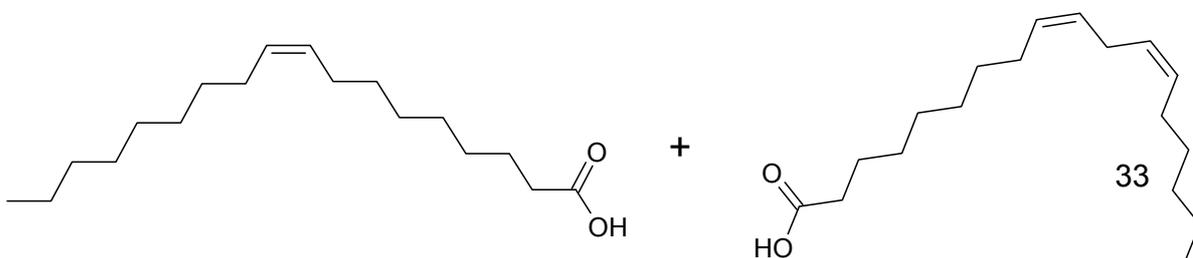
Monooleato de PEG 400

Ácido linoleico

Monolinolato de PEG 400

**Figura 3:** Representação da reação de formação de monoésteres pela reação de ácidos graxos de cadeia longa com polietilenoglicol.

Existem várias versões para os diésteres formados pela reação dos ácidos oleico e linoleico com polietilenoglicol 400; polietilenoglicol esterificado com duas moléculas de ácido oleico, polietilenoglicol esterificado com duas moléculas de ácido linoleico e polietilenoglicol esterificado com uma molécula de ácido oleico e com outra molécula de ácido linoleico. A última versão deste composto está ilustrada na figura 4.



Ácido oleico

Ácido linoleico

Diéster de polietilenoglicol 400

**Figura 4:** Representação da formação de diéster pela reação de uma molécula de polietilenoglicol com uma molécula de ácido oleico e outra de ácido linoleico.

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- MATERIAL

Reagentes químicos: hidróxido de sódio 0,05N, acetona e etanol

Indicador: fenolftaleína em solução etanólica a 1%

Frascos para reação: erlenmeyer ou flaeker

Ácido graxo: ácido de graxo de “tall oil” destilado – fornecido pela Chemtra

Álcool: polietilenoglicol 400 – fornecido pela Oxiteno

Como biocatalisadores foram utilizados preparações comerciais das enzimas apresentadas na tabela 1, com o valor de atividade fornecida pelo fabricante. A medida da atividade lipolítica foi medida em Kilograma de unidades de lipase, sendo que um KLU é a quantidade de enzima capaz de liberar um milimol de ácido butírico por minuto de uma emulsão de tributirina a 30°C e pH de 7,0:

**Tabela 1:** Preparações comerciais das enzimas utilizadas nas reações de esterificação, incluindo o valor de atividade enzimática de hidrólise (KLU) e de esterificação (IUN).

Enzimas	Descrição	Atividade enzimática
---------	-----------	----------------------

---

A	Lipase - <i>Aspergillus</i> (organismo de produção)	100KLU/g
B	Lipase – <i>Aspergillus oryzae</i> (organismo de produção)	100KLU/g
C	Lipase – <i>Aspergillus oryzae</i> (organismo de produção); <i>Thermomyces lanuginosus</i> (organismo doador)	100KLU/g
D	Lipase – <i>Aspergillus niger</i> (organismo de produção); <i>Candida antarctica</i> (organismo doador)	5000LU/g
E	Lipase – <i>Aspergillus oryzae</i> (organismo de produção); <i>Rhizomucor miehei</i> (organismo doador)	150IUN/g

---

## 2.2- EQUIPAMENTOS

Para a obtenção dos ésteres foi utilizado um agitador orbital (tipo “Shaker”) da empresa Tecnal Ltda, com temperatura e velocidade controladas.

Para as titulações foi utilizado bureta digital, marca Brand.

## 2.3- MÉTODOS

A obtenção dos ésteres foi baseada no método descrito por Janssen & Haas (1994), sendo preparado quantidade suficiente de substrato para as reações, misturando ácido graxo de “tall oil” e polietilenoglicol 400 nas proporções de 42:58 e 58:42 (em massa), visando a obtenção de monoésteres (éster 1) e diésteres

(éster 2), respectivamente.

Alíquota de 50g do substrato foi adicionada aos frascos de reação e adicionado as enzimas a serem avaliadas separadamente a cada um, sendo utilizado 0,5 e 5,0% de enzima sobre a quantidade de substrato total.

A agitação orbital dos frascos foi realizada com temperatura controlada em 50°C e agitação a 200rpm. A reação foi acompanhada, através da determinação da quantidade de ácido graxo livre, através de titulação com hidróxido de sódio 0,05N e fenolftaleína como indicador, baseado no método descrito por Pastore (1994).

Os tempos de reação estabelecidos para acompanhamento foram 1, 3, 6, 10, 24, 34 e 48 horas.

Os resultados foram expressos em % de ácidos graxos livres e % de esterificação durante o tempo de reação planejado.

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do percentual de ácidos graxos livres obtidos para cada enzima , nas concentrações de 0,5 e 5% e nos tempos de reação determinados, obtidos por titulometria estão apresentados nas tabelas 2 e 3, para o Éster 1 e nas tabelas 4 e 5 para o Éster 2:

**Tabela 2:** Éster 1; percentual de ácidos graxos livres por 0,5%(m/m) de enzima, na temperatura de 50°C

Enzima	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
--------	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----

Branco	46,1	45,8	46,1	45,5	46,0	44,9	45,1	43,9
A	44,2	44,1	42,5	41,1	40,0	31,9	28,3	24,1
B	42,5	30,9	29,1	29,6	29,3	29,2	25,1	24,8
C	44,6	43,2	42,4	41,4	40,5	37,6	35,4	32,1
D	43,4	21,0	16,8	10,5	8,1	7,4	9,0	6,8
E	42,8	25,8	19,4	11,6	8,3	5,5	5,5	5,6

**Tabela 3:** Éster 1; percentual de ácidos graxos livres por 5%(m/m) de enzima, na temperatura de 50°C

Enzima	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
Branco	46,0	45,8	46,1	45,5	46,0	44,9	45,1	43,9
A	44,4	25,5	20,9	17,0	13,7	10,8	10,7	11,1
B	38,3	20,1	14,6	9,6	7,7	6,6	7,4	7,3
C	43,4	24,3	17,4	12,2	9,3	7,2	7,3	7,4
D	43,0	15,6	14,7	13,5	12,6	10,2	9,7	6,2
E	43,0	10,3	8,6	7,3	6,1	6,5	7,0	6,8

**Tabela 4:** Éster 2; percentual de ácidos graxos livres por 0,5%(m/m) de enzima, na temperatura de 50°C

Enzima	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
Branco	60,1	58,5	58,6	59,2	60,0	56,1	59,0	55,3
A	58,7	58,3	57,5	56,7	55,6	49,9	49,2	42,8
B	58,7	57,9	57,8	56,7	55,5	49,0	47,5	39,7
C	59,0	58,3	57,6	57,2	56,4	52,9	52,2	48,0
D	58,4	51,5	37,6	28,2	22,3	16,9	15,4	13,6
E	58,0	53,4	43,0	31,7	25,0	17,3	17,3	14,9

**Tabela 5:** Éster 2; percentual de ácidos graxos livres por 5%(m/m) de enzima, temperatura de 50°C

Enzima	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
Branco	60,1	58,5	58,6	59,2	60,0	56,1	59,0	55,3
A	58,9	51,2	47,9	45,2	42,9	27,3	22,1	17,0
B	58,5	46,0	36,3	29,4	24,9	16,7	16,9	13,1
C	58,5	51,8	48,7	46,7	44,3	35,5	32,5	25,5
D	58,5	51,2	49,9	48,3	46,9	40,6	39,0	36,3
E	58,6	29,7	23,1	18,5	16,2	15,7	17,2	13,7

Os resultados do percentual de esterificação obtido por cada enzima, nas concentrações de 0,5 e 5% e nos tempos de reação determinados, estão apresentados nas tabelas 6 e 7 para o Éster 1 e nas tabelas 8 e 9, para o Éster 2.

**Tabela 6:** Éster 1; percentual de esterificação por 0,5%(m/m) de enzima, temperatura de 50°C

Enzima	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
Branco	0,0	0,6	1,0	1,2	1,1	2,4	2,2	4,8
A	0,0	0,0	3,3	6,4	9,1	27,3	35,7	45,1
B	0,0	27,0	31,2	30,2	30,7	31,1	40,6	41,3
C	0,0	2,7	4,7	6,8	8,9	15,3	20,4	27,7
D	0,0	51,3	61,1	75,8	81,3	82,8	82,1	84,2
E	0,0	40,1	55,1	73,2	80,9	87,3	87,2	87,1

**Tabela 7:** Éster 1; percentual esterificação por 5%(m/m) de enzima, temperatura de 50°C

Enzima	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
Branco	0,0	0,6	1,0	1,2	1,1	2,4	2,2	4,8
A	0,0	39,7	50,6	59,7	67,6	74,5	74,8	73,9
B	0,0	44,8	59,9	73,6	78,9	81,8	79,7	80,0
C	0,0	41,3	57,8	70,6	77,5	82,7	82,4	81,4
D	0,0	62,0	64,1	67,1	69,2	75,2	76,3	84,8
E	0,0	74,8	79,1	82,1	85,2	84,1	82,9	83,4

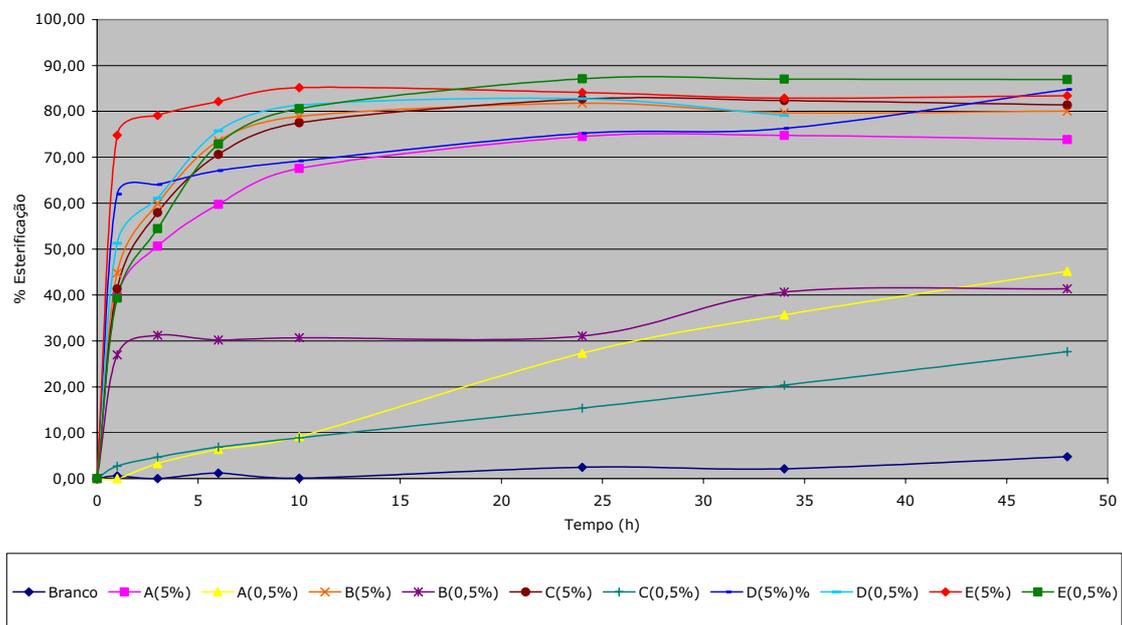
**Tabela 8:** Éster 2; percentual de esterificação 0,5%(m/m) de enzima, temperatura de 50°C

Enzima	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
Branco	0,0	2,7	2,5	2,5	2,2	6,7	5,9	8,1
A	0,0	0,3	1,6	2,9	4,9	14,6	15,8	26,7
B	0,0	0,9	1,0	2,9	5,0	16,0	18,7	32,0
C	0,0	0,7	1,9	2,6	3,9	9,8	11,0	18,1
D	0,0	11,5	35,2	51,6	61,6	71,0	73,5	76,6
E	0,0	7,4	25,5	45,0	56,6	70,0	70,0	74,2

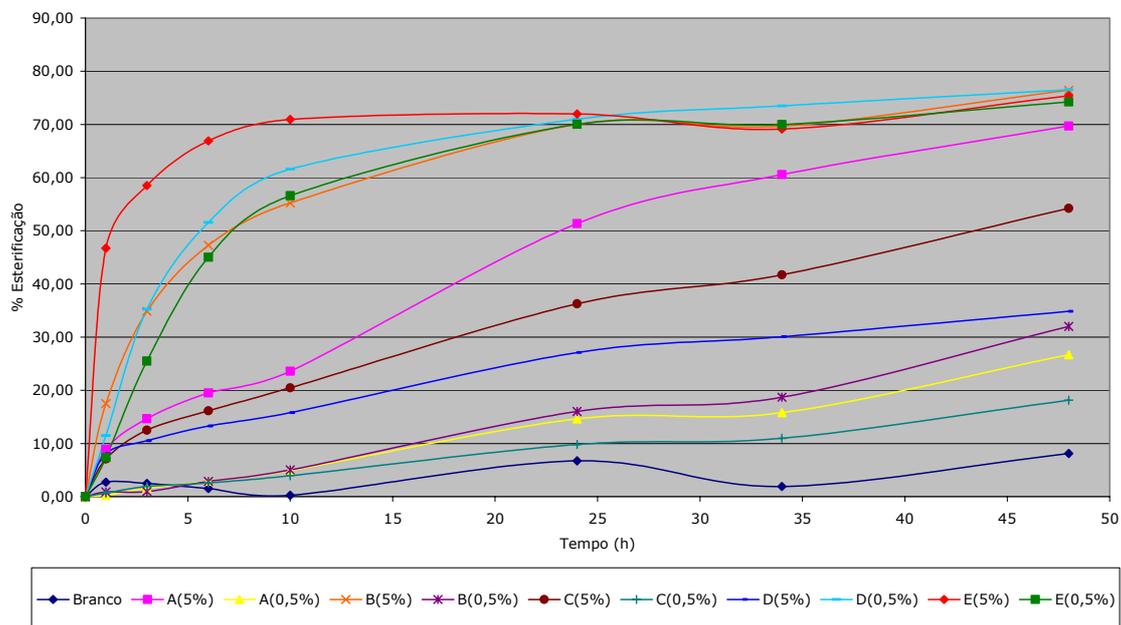
**Tabela 9:** Éster 2; percentual de esterificação por 5%(m/m) de enzima, temperatura de 50°C

Enzima	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
Branco	0,0	2,7	2,5	2,5	2,2	6,7	5,9	8,1
A	0,0	8,9	14,7	19,5	23,6	51,3	60,5	69,7
B	0,0	17,5	34,9	47,3	55,3	70,0	70,0	76,4
C	0,0	7,1	12,5	16,2	20,5	36,3	41,7	54,2
D	0,0	8,1	10,5	13,3	15,8	27,1	30,1	34,8
E	0,0	46,7	58,5	66,9	71,9	72,0	72,2	75,4

O percentual de esterificação das reações do Éster 1 e do Éster 2, obtidos com diferentes enzimas na concentração de 0,5 e 5%; na temperatura de 50°C e nos tempos estabelecidos estão apresentados nas figuras 5 e 6 (Gráficos).



**Figura 5:** Éster 1; percentual de esterificação com diferentes enzimas, obtidos à 50°C e agitação de 200rpm



**Figura 6:** Éster 2; percentual de esterificação com diferentes enzimas, obtidos à 50°C e agitação de 200rpm

Os resultados obtidos para o éster 1 (monoéster) e éster 2 (diéster) indicaram menor esterificação do éster 2, o qual possui maior quantidade de ácidos graxos, e estão de acordo com os dados apresentados por Jannssen & Haas (1994).

#### 4- CONCLUSÕES

Os resultados indicam que há um grande potencial para o uso de enzimas (lipases) para obtenção de monésteres e diésteres de ácidos graxos e polietilenoglicol de peso molecular 400, sendo obtido percentual de esterificação de 85,2% para o éster 1 e de 71,0% para o éster 2

As enzimas que apresentaram melhor performance no que se refere a esterificação para o Éster 1, foram as identificadas como B; D e E, na temperatura

de 50°C

Para o Éster 1, a enzima D apresentou performance superior quando utilizada em menor quantidade (0,5%), sendo obtido 81,3% de esterificação, comparado com 69,2% obtido com 5% desta enzima. Para as demais enzimas, os resultados de esterificação foi melhor quanto foi utilizado 5%.

A enzima E apresenta-se na forma imobilizada o que permitirá seu uso na obtenção deste éster com processos diferentes ao utilizado neste experimento, permitindo a recuperação da mesma e posterior reuso.

Para o Éster 2, as enzimas que apresentaram melhor performance no que se refere a esterificação, também foram as indentificadas como B; D e E

O percentual de esterificação para o Éster 2 (máximo de 71,0%) é inferior ao do Éster 1 (máximo de 85,2%) para todas as enzimas avaliadas, comprovando que o excesso de poliglicol aumenta o rendimento por deslocamento da reação no sentido da formação do éster.

Nas condições ensaiadas, para as enzimas B; D e E, foi obtido um percentual de esterificação satisfatório em tempo inferior aos observados nos escassos relatos encontrados na literatura para ésteres similares. Os dados da literatura relatam tempo de 50 horas, enquanto que para as condições ensaiadas neste estudo, o tempo foi inferior a 24 horas.

Nas condições em que os estudos foram realizados, a formação de ésteres na ausência de enzimas é muito baixa na ausência de enzimas, sendo obtido o máximo de 4,8% de esterificação para o éster 1 e 8,1% para o éster 2, após 48 horas de reação.

As enzimas B; D e E serão utilizadas no aprofundamento dos estudos de esterificação dos ésteres 1 e 2.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

JANSSEN, G.G., HAAS, M.J.. Lipase-catalyzed synthesis of oleic acid esters of polyethylene glycol 400. *Biotechnol. Letters*, 16(2):163-168, 1994.

PASTORE, G.M..Produção e caracterização bioquímica de monoacilglicerol lipase microbiana e aplicação de lipases na hidrólise e esterificação enzimática. *Tese de doutorado*, 1992.

ZACHARY, L.G., BAJAK, H.W., EVELINE, F.J.. Introduction to tall oil. *In: Tall oil and its uses*, Pulp Chemicals association, New York, 1965.

ZACHARY, L.G., BAJAK, H.W., EVELINE, F.J.. The chemistry of tall oil fatty and rosin acids. *In: Tall oil and its uses*, Pulp Chemicals association, New York, 1965.



## CAPÍTULO 3

### ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS COMERCIAIS PARA A SÍNTESE DE MONO e DIÉSTERES DE POLIETILENOGLICOL COM FUNÇÃO SURFACTANTE

Luiz W. B. PACE; Gláucia M. PASTORE

#### RESUMO

Com base nos resultados dos estudos prévios de seleção de enzimas comerciais para a obtenção de ésteres de ácidos graxos de “tall oil”, foram selecionadas três lipases que apresentaram maior rendimento de esterificação.

Neste trabalho, foi avaliado três concentrações de cada enzima para a seleção da melhor concentração das mesmas, visando a obtenção dos ésteres 1 e 2 através de síntese em escala de laboratório.

Foram realizadas 12 reações para cada éster, sendo o método considerado eficiente para avaliar a concentração de enzimas visando a síntese de ésteres graxos de polietilenoglicol.

Baseado nos resultados dos experimentos foi observado que para a obtenção do éster 1 a enzima D, na concentração de 0,5% apresentou melhor rendimento, enquanto que para o éster 2 o melhor rendimento foi obtido com a enzima E, na concentração de 2,5%.

**Palavras-chave:** enzimas, lipases, ésteres de polietilenoglicol.

## **SUMMARY**

Based on the results of previous studies of commercial enzyme selection to obtain tall oil fatty acids esters, three lipases were selected, which presented higher esterification efficiency.

This paper evaluates three concentrations of each enzyme to select their best concentrations in order to obtain esters 1 and 2, through synthesis on a laboratory scale.

Twelve reactions were performed for each ester and the method was considered efficient to evaluate the enzyme concentration aiming at the synthesis of polyethylene glycol fatty esters

Based on the results from the experiments it was observed that for obtaining ester 1, enzyme D in the concentration of 0.5% presented the best efficiency, whereas for ester 2 the best efficiency was obtained with enzyme E in the concentration of 2.5%.

**Key words:** enzymes, lipases, polyethylene glycol esters

## 1- INTRODUÇÃO

As lipases catalisam a reação de hidrólise de triacilgliceróis na interface óleo-água e são amplamente encontradas na natureza. Estas enzimas possuem grande versatilidade de propriedades tais como resistência a variação de pH, estabilidade térmica, resistência a diferentes solventes orgânicos, especificidade, regioseletividade e estereosseletividades (Taipa et al., 1992)

As lipases possuem a capacidade de permanecerem ativas em meios com baixa concentração de água ou anidros, sendo que estas condições permitem a reação reversa, possibilitando o uso das lipases como catalisador das reações de esterificação e transesterificação. (Roberts et al., 1995). Podem também catalisar reações de interesterificação de óleos e gorduras, obtendo-se produtos que não são formados pelos métodos químicos convencionais (Gioielli et al., 1994).

As lipases podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana e são classificadas como hidrolases (EC 3.1.1.3), que atuam sobre as ligações ésteres de tri, di e monoacilgliceróis. Hidrolisam somente ligações acil de lipídeos emulsificados, diferindo das esterases, as quais atuam sobre ligações ésteres de substâncias solúveis em água (Kilara, 1985).

A lipase pode ser utilizada na forma livre ou imobilizada. Os reagentes formam duas fases e a enzima adsorve à interface, onde é ativa (Ramamurthi et al., 1991)

A principal aplicação da especificidade no caso de reações de síntese é a obtenção de ésteres graxos poliinsaturados (Aggelis et al., 1995).

Para minimizar a degradação térmica, o consumo de energia e processo a baixa pressão, o uso de lipase como biocatalisador constitui uma alternativa ao processo químico para a produção de ésteres de ácidos graxos (Merçon, 1997 e 2000).

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1- MATERIAL

Reagentes químicos: hidróxido de sódio 0,05N, acetona e etanol

Indicador: fenolftaleína em solução etanólica a 1%

Frascos para reação: erlenmeyer ou flaeker

Ácido graxo: ácido de graxo de “tall oil” destilado – adquirido da Chemtra

Álcool: polietilenoglicol 400 – adquirido da Oxiteno

Como biocatalisadores foram utilizadas as preparações comerciais das enzimas previamente selecionadas e apresentadas na tabela 1, com o valor de atividade fornecida pelo fabricante. A medida da atividade lipolítica foi medida em Kilo de unidades de lipase, sendo que um KLU é a quantidade de enzima capaz de liberar um milimol de ácido butírico por minuto de um emulsão de tributirina a 30°C e pH de 7,0.

**Tabela 1:** Preparações comerciais das enzimas utilizadas nas reações de

esterificação, incluindo o valor de atividade enzimática de hidrólise (KLU) e de esterificação (IUN)

Enzimas	Descrição	Atividade enzimática
B	Lipase – <i>Aspergillus oryzae</i> (organismo de produção)	100KLU/g
D	Lipase – <i>Aspergillus niger</i> (organismo de produção); <i>Candida antarctica</i> (organismo doador)	5000LU/g
E	Lipase – <i>Aspergillus oryzae</i> (organismo de produção); <i>Rhizomucor miehei</i> (organismo doador)	150IUN/g

## 2.2- EQUIPAMENTOS

Para a obtenção os ésteres foi utilizado um agitador orbital (tipo “Shaker”) da empresa Tecnal Ltda, com temperatura e velocidade controladas.

Para as titulações foi utilizado bureta digital, marca Brand.

## 2.3- MÉTODOS

Foi preparado quantidade suficiente de substrato para as reações, misturando ácido graxo de “tall oil” e polietilenoglicol 400 nas proporções de 42:58 e 58:42, (em massa), visando a obtenção respectivamente de monoésteres (éster 1) e diésteres (éster 2), baseado no método descrito por Janssen & Haas (1994).

Alíquota de 50g do substrato foi transferido para os frascos de reação e adicionado as enzimas a serem avaliadas separadamente a cada um. As enzimas

a serem avaliadas e suas respectivas concentrações sobre a quantidade de substrato total foram: B (0,5; 2,5, 5,0%); D (0,25; 0,50; 2,5%) e E (0,50; 2,5; 5,0%)

Os frascos foram agitados no agitador orbital, com temperatura controlada em 50°C e agitação a 200rpm. A reação foi acompanhada, através da determinação da quantidade de ácido graxo livre nos tempos estabelecidos, através de titulação com hidróxido de sódio 0,05N e fenolftaleína como indicador, baseado no método descrito por Pastore (1992).

Os tempos de reação estabelecidos para acompanhamento foram 1, 3, 6, 10, 24, 34 e 48 horas.

Os resultados foram expressos em % de ácidos graxos livres utilizando o peso molecular médio do “tall oil” e % de esterificação durante o tempo de reação planejado.

$$\% \text{esterificação} = \frac{(\% \text{ácido graxo inicial} - \% \text{ácido graxo final})}{\% \text{ácido graxo inicial}} \times 100$$

#### **4- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados do percentual de residual de ácidos graxos livres no sistema para cada enzima, nas concentrações e tempos de reação determinados, obtidos por titulometria, para o Éster 1 e 2 estão apresentados nas tabelas 2 à 7.

**Tabela 2:** Enzima B, Éster 1 - Percentual de ácidos graxos livres, temperatura de

50°C, 200 rpm e nos tempos de reação estabelecidos

A*	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
0,0	41,7	42,1	41,7	42,7	42,8	40,4	41,6	40,9
0,5	35,7	35,5	33,4	30,5	26,5	14,9	12,3	10,5
2,5	37,8	28,1	13,4	10,6	8,3	6,9	8,1	7,4
5,0	38,0	18,4	15,3	12,3	9,3	7,5	7,9	7,3

\* = %de enzima sobre o substrato.

**Tabela 3:** Enzima B, Éster 2 - Percentual de ácidos graxos livres, temperatura de 50°C, 200 rpm e nos tempos de reação estabelecidos

A*	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
0,0	58,9	58,7	57,9	59,0	59,5	58,9	57,1	57,2
0,5	55,9	53,9	50,6	47,7	45,0	36,4	29,5	26,4
2,5	56,5	53,0	50,6	48,6	46,6	35,9	25,0	21,1
5,0	56,3	43,4	33,4	26,3	20,9	13,2	12,2	12,0

\* = %de enzima sobre o substrato.

A concentração da enzima B que apresentou melhor performance de esterificação foi de 2,5% sobre a quantidade de substrato total, com 24 horas de reação para o Éster 1 e de 5,0% nas mesmas condições para o Éster 2.

**Tabela 4:** Enzima D, Éster 1 - Percentual de ácidos graxos livres, temperatura de

50°C, 200 rpm e nos tempos de reação estabelecidos

A*	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
0,00	41,7	42,1	41,7	42,7	42,8	40,4	41,6	40,9
0,25	39,4	37,1	21,7	11,3	8,9	7,1	7,5	7,5
0,50	40,4	33,2	15,1	10,1	8,4	6,6	7,8	6,7
2,50	41,2	16,4	12,5	9,8	8,7	6,9	7,4	7,3

\* = % de enzima sobre o substrato.

**Tabela 5:** Enzima D, Éster 2 - Percentual de ácidos graxos livres, temperatura de 50°C, 200 rpm e nos tempos de reação estabelecidos

A*	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
0,00	58,9	58,7	57,9	59,0	59,52	58,9	57,1	57,2
0,25	57,4	54,6	47,3	37,0	29,02	16,6	14,7	13,1
0,50	57,6	52,6	41,7	32,0	25,77	16,4	17,0	15,0
2,50	57,8	47,0	39,7	33,4	29,32	22,1	21,7	17,7

\* = % de enzima sobre o substrato.

A concentração da enzima D que apresentou melhor rendimento de esterificação para os dois ésteres estudados, foi de 0,5 sobre a quantidade de substrato total, com 24 horas de reação. Concentração de 2,5 e 5,0% desta enzima sobre o substrato apresentou menor percentual de esterificação.

**Tabela 6:** Enzima E, Éster 1 - Percentual de ácidos graxos livres, temperatura de 50°C, 200 rpm e nos tempos de reação estabelecidos

A*	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
0,0	41,7	42,1	41,7	42,7	42,8	40,4	41,6	40,9
0,5	41,4	40,0	31,6	22,1	15,2	9,0	9,4	9,0
2,5	42,3	26,5	13,2	9,1	7,7	6,3	6,0	6,4
5,0	42,4	19,2	11,0	9,9	8,8	7,5	7,1	7,6

\* = % de enzima sobre o substrato.

**Tabela 7:** Enzima E, Éster 2 - Percentual de ácidos graxos livres, temperatura de 50°C, 200 rpm e nos tempos de reação estabelecidos

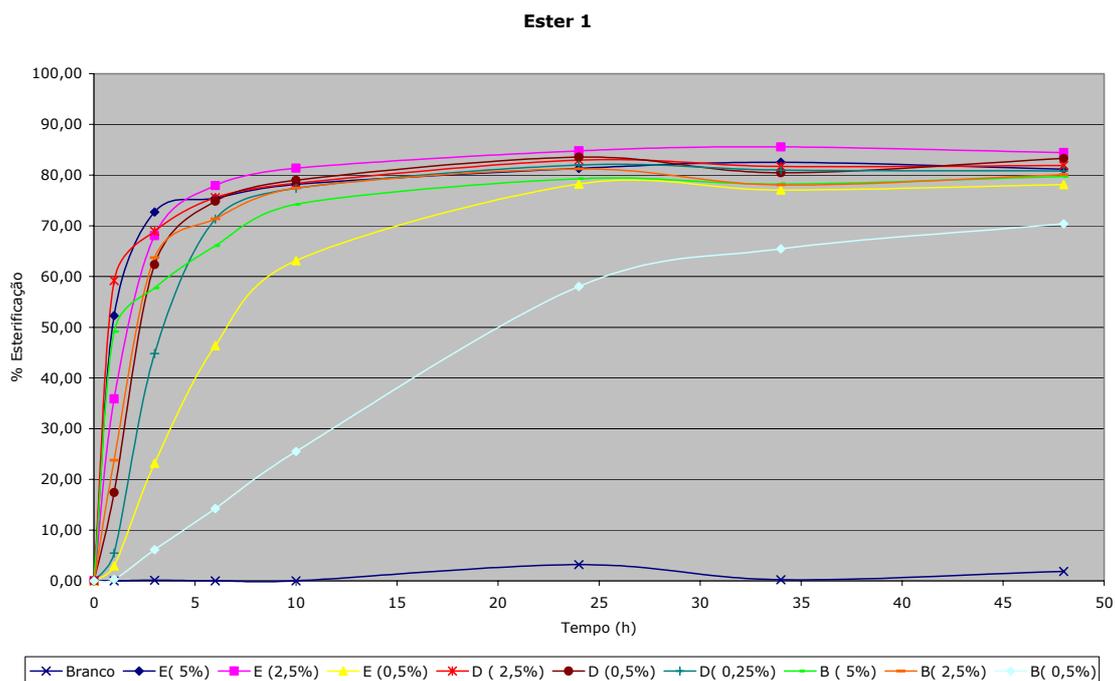
A*	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
0,0	58,9	58,7	57,9	59,0	59,5	58,9	57,1	57,2
0,5	58,4	54,8	45,7	34,1	25,6	16,6	16,9	15,3
2,5	58,6	39,4	23,2	16,5	15,0	15,5	15,8	15,0
5,0	58,9	30,1	23,9	17,2	15,1	15,7	16,5	14,9

\* = % de enzima sobre o substrato.

A concentração da enzima E que apresentou melhor rendimento de esterificação foi de 2,5% sobre a quantidade de substrato total, com 24 horas de reação, para os dois ésteres estudados.

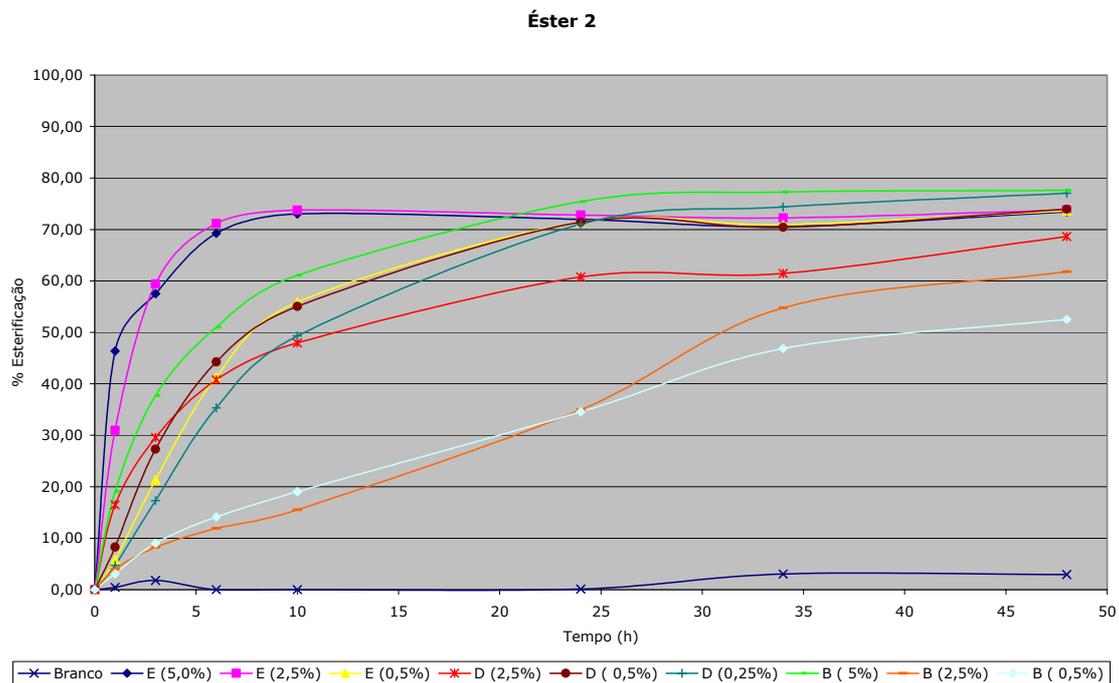
O percentual de esterificação para o Éster 1 e Éster 2, obtidos com as enzimas que apresentaram melhor performance no que se refere a esterificação nas

condições indicadas nos experimentos realizados, estão apresentados na respectivamente nas figuras 1 e 2 (Gráficos).



**Figura 1:** Éster 1, percentual de esterificação das enzimas com melhor performance no que se refere a % de esterificação, obtidos à 50°C e agitação de 200rpm

Para o Éster 1, a enzima E, na concentração de 2,5% sobre o substrato total, apresentou esterificação de 81,4% em 10 horas de reação, enquanto que a enzima D, na concentração de 0,5% apresentou 79,0% de esterificação.



**Figura 2:** Éster 2, percentual de esterificação das enzimas com melhor performance no que se refere a % de esterificação, obtidos à 50°C e agitação de 200rpm

Para o Éster 2, a enzima E, na concentração de 2,5% sobre o substrato total, apresentou esterificação de 73,8% em 10 horas de reação.

#### 4- CONCLUSÕES

Os resultados comprovam que as lipases testadas podem ser utilizadas como biocatalisadores para obtenção de ésteres de ácidos graxos e polietilenoglicol de peso molecular 400, como rota alternativa ao processo químico tradicional.

Para o Éster 1, a enzima E, na concentração de 2,5% sobre o substrato total, apresentou a melhor performance, sendo obtido esterificação de 81,4% em 10 horas de reação. A enzima D, na concentração de 0,5% apresentou performance

pouco inferior, sendo obtido 79,0% de esterificação (figura 1).

Para o Éster 2, a enzima E, na concentração de 2,5% sobre o substrato total, apresentou a melhor performance, sendo obtido esterificação de 73,8% em 10 horas de reação (figura 2).

Na literatura existem poucos trabalhos publicados sobre a síntese de monoésteres e diésteres utilizando ácidos graxos de “tall oil” e polietilenoglicol 400. Hayes & Gulari (1992) estudaram a esterificação de ácidos graxos com etilenoglicol, obtendo 60% de conversão, após 4 dias à temperatura ambiente. Baseado nos dados de síntese similares, concluímos que a esterificação com as enzimas D e E são bastante satisfatórios, visto que foi obtido taxa de esterificação superior a 79%.

O percentual de esterificação para o Éster 1 foi superior a do Éster 2, para todas as enzimas/concentração avaliadas nos experimentos realizados, comprovando a maior dificuldade de esterificação quando a quantidade de polietilenoglicol é reduzida, visando a obtenção de diésteres.

Para a viabilidade técnico-econômica do uso de enzimas como biocatalisadores, visando a obtenção dos ésteres estudados, dentre outros fatores, faz-se necessário a análise da quantidade de enzima utilizada e o tempo necessário para atingir o máximo de esterificação.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGELIS, G., MAMALAKIS, G., KOMAITIS, M.. Fatty Acid specificity (typospecificiy) of some microbial lipases. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 72(5):211-213, 1995.

GIOIELLI, L.A., PITOMBO, R.N.M., VITOLO, M., BARUFALDI, R., OLIVERIA, M.N., MORENO, P.C.. Acidolysis of babassu fat catalysed by immobilized lipase. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 71 (6):579-582, 1994.

HAYES, D.G., GULARI, E.. Formation of polyol-fatty acid esters by lipases in reverse micellar media. *Biotechnology and Bioengineering*, 40:110-118, 1992.

JANSSEN, G.G., HAAS, M.J.. Lipase-catalyzed synthesis of oleic acid esters of polyethylene glycol 400. *Biotechnol. Letters*, 16(2):163-168, 1994.

KILARA, A.. Enzyme modified lipid food ingredients. *Process Biochem.*, 20(4):35-45, 1985.

MERÇON,F., SANTÁNNA, G.L., NOBREGA,R.. Lipase immobilized membrana reactor applied to babassu oil hydrolisis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 14(1):1-12, 1997.

MERÇON,F., SANTÁNNA, G.L., NOBREGA,R.. Enzymatic hydrolisis of babassu oil in a membrane bioreactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77(10):1043-1045, 2000.

PASTORE, G.M..Produção e caracterização bioquímica de monoacilglicerol lipase microbiana e aplicação de lipases na hidrólise e esterificação enzimática. *Tese de doutorado*, 1992.

ROBERTS,S.M., TURNER, N.J., WILLETS, A.J., TURNER, M.K.. Introduction to biocatalysis using enzumes and microorganisms, *Cambridge University Press*, 1995.

TAIPA,M.A., AIRES-BARROS,M.R., CABRAL, J.M.S.. *J. Biotechnol.*, 26:111-142, 1992.

## CAPÍTULO 4

### ESTUDO DA TEMPERATURA NA SÍNTESE DE MONO e DIÉSTERES DE POLIETILENOGLICOL UTILIZANDO LIPASES COMERCIAIS COMO BIOCATALISADOR

Luiz W. B. PACE; Gláucia M. PASTORE

#### RESUMO

Visando o desenvolvimento de um processo que utilize biocatalisadores em substituição aos catalisadores químicos e temperaturas elevadas para a síntese de ésteres de poliglicóis, é necessária a seleção das enzimas e respectivas concentrações, bem como determinar o tempo e a temperatura ideais para a obtenção de cada produto.

Este trabalho teve como objetivo a seleção da melhor temperatura para a obtenção de dois ésteres de ácidos graxos de “tall oil”, utilizando lipases previamente avaliadas. A avaliação foi realizada através de síntese em escala de laboratório, utilizando “shaker” nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70°C.

Foram realizadas 20 reações de esterificação para cada éster, sendo avaliado 4 enzimas diferentes.

A melhor temperatura de esterificação para os ésteres estudados foi de 70°C, sendo que para o éster 1 o rendimento foi de 95%, obtido com o uso da enzima D, na concentração de 0,5%. Para o éster 2, o melhor resultado foi obtido com a enzima E, na concentração de 2,5%, sendo observado 87% de esterificação.

**Palavras-chave:** ésteres de ácidos graxos, polietilenoglicol, temperatura.

## **SUMMARY**

The focus on the development of a process that uses biocatalysts in the place of chemical catalysts and high temperatures makes it necessary to select enzymes in certain concentrations, as well as to determine ideal time and temperatures in order to obtain each product.

The objective of this work was the selection of the best temperature to obtain two “tall oil” fatty acids esters using previously evaluated lipases. The evaluation was made through synthesis on laboratory scale, using shaker, at the following temperatures: 30, 40, 50, 60, and 70°C.

Twenty esterification reactions were performed for each ester. Four different enzymes were evaluated.

The best esterification temperature for the esters studied was 70°C. Ester 1 presented a 95% efficiency using enzyme D in the concentration of 0.5%.

For ester 2, the best result was obtained using 2,5% of enzyme E. The esterification presented 87% efficiency.

**Key words:** fatty acid esters, polyethylene glycol, temperature

## 1- INTRODUÇÃO

Os ésteres de polietilenoglicol podem ser sintetizados quimicamente à altas temperaturas (140-250°C), com formação de subprodutos indesejáveis e podendo levar a obtenção de produtos com coloração escura e turva. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de processos menos agressivos e mais seguros, utilizando lipases como catalisador. (Maag, 1984) e (Castro et al., 2004)

Os ésteres obtidos da reação de ácidos graxos e poliglicóis de alto peso molecular, podem ser utilizados como surfactantes e/ou antiespumantes nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e de especialidades químicas (Castro et al., 1995).

Neste trabalho estudamos a esterificação de ácidos graxos com poliglicol de alto peso molecular sem adição de solventes orgânicos. A esterificação de ácidos graxos com poliglicol, em diferentes sistemas reacionais e com diversas enzimas, tem sido estudada por vários autores. Janssen & Haas (1994) estudaram a esterificação do polietilenoglicol (PEG) 400 usando ácido oleico e Lipozyme usando hexano como solvente e temperatura de 42°C, sendo obtido seletivamente monooleato e dioleato de PEG 400. Foi utilizado Lipozyme imobilizada, sendo mantido 80% de atividade após cinco ciclos de reação.

Em outro trabalho, Das & Bhattacharyya (2006), sintetizaram dois ésteres de polietilenoglicol com dois ácidos pelo processo de bioesterificação. A reação de esterificação com lipase imobilizada de *Mucor miehei* na temperatura de 70 – 75°C, durante 7 horas e 2mm de Hg de pressão, sendo observado conversão do PEG para os ésteres na faixa de 40 – 54%.

Castro et al. (2004) estudaram a influência do tamanho da cadeia do ácido graxo (C2 a C8) e observaram alta capacidade de esterificação, 95 a 98%, para ácidos contendo 4 ou mais carbonos. Resultados similares foram obtidos por Janssen & Haas (1994).

As enzimas capazes de realizar este tipo de reação são as lipases pertencentes à classe das hidrolases (EC 3.1.1.3), atuando nas transformações na qual o substrato é muito pouco solúvel em água. Atualmente existem lipases que são termoestáveis e ativas na faixa de 30 a 70°C, sendo encontradas na forma livres e imobilizadas. Entretanto, a termoestabilidade varia principalmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que apresentam maior estabilidade térmica (Castro et al., 2004).

Para que o processo biocatalítico inicie, é necessário um grau de hidratação mínimo de 10 a 12%p/p, variando de acordo com a hidrofobicidade dos reagentes, dos produtos e do solvente utilizados. Outros estudos indicam que a catálise ocorre com um nível de hidratação de 0,2g água por grama de enzima (Gorman & Dordick, 1991). Geralmente, na síntese de ésteres, não é necessário o ajuste prévio da quantidade de água, visto que ocorre formação de água na reação de esterificação. (Monteiro et al., 1996).

O controle e remoção de água do produto pode ser realizado por espargimento de ar ou nitrogênio, evaporação simples, peneira molecular, destilação ou “stripping” sob vácuo (Castro et al., 1995).

As lipases catalisam a reação de hidrólise de triacilgliceróis na interface óleo-água e são amplamente encontradas na natureza. Estas enzimas possuem grande versatilidade de propriedades tais como resistência a variação de pH, estabilidade térmica, resistência a diferentes solventes orgânicos, especificidade, regioseletividade e estereosseletividades (Taipa, 1992).

As lipases possuem a capacidade de permanecerem ativas em meios com baixa concentração de água ou anidros, sendo que estas condições permitem a reação reversa, possibilitando o uso das lipases como catalisador das reações de esterificação e transesterificação (Roberts et al., 1995 e Castro et al., 2004). Podem também catalisar reações de interesterificação de óleos e gorduras, obtendo-se produtos que não são formados pelos métodos químicos convencionais (Gioielli et al., 1994).

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- MATERIAL

Reagentes químicos: hidróxido de sódio 0,05N, acetona e etanol

Indicador: fenolftaleína em solução etanólica a 1%

Frascos para reação: erlenmeyer ou flaecker

Ácido graxo: ácido de graxo de “tall oil” destilado – adquirido da Chemtra

Álcool: polietilenoglicol 400 – adquirido da Oxiteno

Como biocatalisadores foram utilizadas as preparações comerciais das enzimas previamente selecionadas e apresentadas na tabela 1, com o valor de faixa de temperatura indicada para o uso fornecida pelo fabricante:

**Tabela 1:** Preparações comerciais utilizadas como biocatalisadores

Enzimas	Descrição	Temperatura (°C)
A	Lipase - <i>Aspergillus</i> (organismo de produção)	50 – 70
B	Lipase – <i>Aspergillus oryzae</i> (organismo de produção)	30 – 70
D	Lipase – <i>Aspergillus niger</i> (organismo de produção); <i>Candida antarctica</i> (organismo doador)	20 – 50
E	Lipase – <i>Aspergillus oryzae</i> (organismo de produção); <i>Rhizomucor miehei</i> (organismo doador)	30 – 70

## 2.2- EQUIPAMENTOS

Para a obtenção os ésteres foi utilizado um agitador orbital (tipo “Shaker”) da empresa Tecnal Ltda, com temperatura e velocidade controladas.

Para as titulações foi utilizado bureta digital, marca Brand.

## 2.3- MÉTODOS

A obtenção dos ésteres foi baseada no método descrito por Janssen & Haas (1994), sendo preparado quantidade suficiente de substrato para as reações, misturando ácido graxo de “tall oil” e polietilenoglicol 400 nas proporções de 42:58 e 58:42 em massa, visando a obtenção de monoésteres (éster 1) e diésteres (éster 2), respectivamente.

Alíquota de 50g do substrato foi transferida aos frascos de reação e adicionado as enzimas a serem avaliadas separadamente a cada um. A concentração das enzimas a serem avaliadas, foram selecionadas dos estudos realizados previamente: A-5,0%; B-2,5%; D-0,5% e E-2,5%.

Os frascos foram colocados no agitador orbital, com temperatura controlada em 30; 40; 50; 60 e 70°C e agitação a 200rpm. A reação foi acompanhada, através da determinação da quantidade de ácido graxo livre com o decorrer do tempo, através de titulação com hidróxido de sódio 0,05N e fenolftaleína como indicador, baseado no método descrito por Pastore (1992).

Os tempos de reação estabelecidos para acompanhamento foram 0, 1, 3, 6, 10, 24, 34 e 48 horas.

Os resultados foram expressos em % de ácidos graxos livres utilizando o peso molecular médio do “tall oil” e % de esterificação durante o tempo de reação planejado.

### 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação dos resultados foi baseada na concentração de ácido graxo não reagido, presente nas amostras durante a esterificação com as diferentes enzimas em diversas temperaturas, visando o percentual de interesse de ácido graxo livre que era máximo de 4,0% para o éster 1. Este valor é especificado para este produto quando obtido por síntese química, utilizando catalisador ácido e temperatura de 140°C. Para o éster 2, o percentual de interesse de ácido graxo livre é máximo de 8,0%.

Os resultados do percentual de ácidos graxos livres obtidos para cada enzima, nas temperaturas e tempos de reação determinados, obtidos por titulometria, para o Éster 1 estão apresentados nas tabelas 2 à 5.

**Tabela 2:** Enzima A (5,0%), Éster 1 - Percentual de ácidos graxos livres, 200 rpm e nas temperaturas e tempos de reação estabelecidos

Temperatura (°C)	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
30	42,2	16,6	16,3	15,9	16,1	16,1	15,9	15,1
40	40,7	24,2	18,7	17,7	15,6	11,3	9,3	9,5
50	44,4	25,5	20,9	17,0	13,7	10,8	10,7	11,1
60	41,3	16,2	10,3	5,4	3,9	3,6	5,3	7,5
70	39,8	27,7	27,4	27,2	26,9	27,7	30,2	33,3

A enzima A não apresentou boa performance, na temperatura de 70°C, embora o

fabricante indica boa atividade na faixa de 50 – 70°C. A atividade de esterificação nesta temperatura não foi suficiente para a esterificação necessária no período de até 48 horas.

A atividade desta enzima foi melhor a 60°C, porém os valores de ácido graxo não esterificado encontra-se próximo ao limite superior especificado para este éster obtido pelo processo químico (4,0%).

**Tabela 3:** Enzima B (2,5%), Éster 1 - Percentual de ácidos graxos livres, 200 rpm e nas temperaturas e tempos de reação estabelecidos

Temperatura (°C)	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
30	41,2	30,6	16,5	16,1	16,1	16,9	17,0	16,4
40	41,9	30,5	19,3	18,4	15,5	9,9	8,7	8,7
50	37,8	28,1	13,4	10,6	8,3	6,9	8,1	7,4
60	42,1	31,1	21,4	14,2	9,9	7,0	7,9	10,5
70	39,8	33,2	31,7	31,0	29,8	28,2	28,2	34,0

A enzima B não apresentou boa performance na temperaturas e condições avaliadas, sendo que a 70°C a esterificação apresentou performance inferior as demais temperaturas, indicando que a mesma não possui atividade suficiente para a esterificação necessária no período de até 48 horas.

**Tabela 4:** Enzima D (0,5%), Éster 1 - Percentual de ácidos graxos livres, 200 rpm e nas temperaturas e tempos de reação estabelecidos

Temperatura (°C)	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
30	43,4	39,0	22,1	17,4	16,5	18,4	18,3	17,3
40	42,1	29,0	16,2	15,3	12,7	10,7	9,7	9,6
50	43,4	21,0	16,8	10,5	8,1	7,4	9,0	6,8
60	42,8	28,2	9,1	4,1	3,4	3,5	4,6	5,7
70	39,8	22,1	5,5	2,2	1,7	2,5	4,7	7,7

A enzima D apresentou excelente rendimento de esterificação na temperatura de 70°C, indicando que a mesma possui atividade suficiente para a esterificação necessária no período de 6 horas de reação. O teor de ácidos graxos livres de 2,2%, obtido após 6 horas de reação está dentro do parâmetro especificado para este Éster quando obtido por processo químico (máximo 4,0%)

Foi observado que após 10 horas de reação o valor de ácidos graxos livres para a enzima D, na temperatura de 60°C foi de 3,4% (dentro do valor especificado para o processo químico). Porém considerando a redução do tempo de reação em 4 horas, a concentração inferior de ácidos graxos livres, implicando em maior percentual de esterificação (rendimento), bem como uma possível variação no controle de temperatura num futuro processo industrial, sugerimos a temperatura de 70°C.

**Tabela 5:** Enzima E (2,5%), Éster 1 - Percentual de ácidos graxos livres, 200 rpm e nas temperaturas e tempos de reação estabelecidos

Temperatura (°C)	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
30	44,1	38,4	20,8	17,8	17,2	21,7	21,6	17,4
40	40,7	27,5	16,3	15,0	11,9	9,4	8,9	9,0
50	42,3	26,5	13,2	9,1	7,7	6,3	6,0	6,4
60	42,3	29,3	20,1	6,4	4,4	4,2	4,9	6,3
70	39,8	28,8	14,7	8,9	5,3	3,5	3,4	5,7

A enzima E apresentou bom rendimento na temperatura de 70°C, indicando que a mesma possui atividade suficiente para a esterificação necessária, porém com 24 horas de reação; ou seja, é necessário um tempo de reação superior ao obtido com a enzima D para este éster.

O teor de ácido graxo livre de 3,5% está dentro do parâmetro especificado para este Éster quando obtido por processo químico (máximo 4,0%)

A avaliação dos resultados também foram baseadas na concentração de ácido graxo não reagido, presente nas amostras durante a esterificação com as diferentes enzimas em diversas temperaturas, visando obter percentual de ácido graxo livre inferior a 8,00% para o Éster 2, sendo este valor especificado para este obtido por síntese utilizando catalisador químico e temperatura de 150°C.

Os resultados do percentual de ácidos graxos livres obtidos para cada enzima, nas temperaturas e tempos de reação determinados, obtidos por titulometria, para o Éster 2 estão apresentados nas tabelas 6 à 9.

**Tabela 6:** Enzima A (5,0%), Éster 2 - Percentual de ácidos graxos livres, 200 rpm e nas temperaturas e tempos de reação estabelecidos

Temperatura (°C)	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
30	58,8	49,3	36,4	35,0	34,3	32,3	31,2	29,05
40	58,4	49,1	37,9	32,0	27,6	19,6	17,3	16,3
50	58,9	51,1	47,9	45,2	42,9	27,3	22,1	17,0
60	58,7	33,8	25,7	22,2	18,8	11,80	11,3	13,5
70	62,3	52,7	52,4	51,7	51,1	48,6	50,2	51,8

A enzima A não apresentou bom rendimento quanto a esterificação, principalmente na temperatura de 70°C, indicando que a mesma não possui atividade suficiente para a esterificação necessária no período de até 48 horas. A melhor temperatura de reação foi de 60° C, porém o teor de ácido graxo não reagido foi superior a 8,0% para todas as amostras no período de 48 horas de reação.

Comparando os resultados com os obtidos para o Éster 1 com esta mesma enzima, a temperatura de 60° C foi a que possibilitou maior esterificação para os dois ésteres

**Tabela 7:** Enzima B (2,5%), Éster 2 - Percentual de ácidos graxos livres, 200 rpm e nas temperaturas e tempos de reação estabelecidos

Temperatura (°C)	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
30	58,1	43,4	34,9	34,6	34,4	32,8	32,0	30,2
40	58,8	42,9	33,8	30,2	27,0	19,9	17,8	17,5
50	58,5	46,0	36,3	29,4	24,9	16,7	16,9	13,1
60	60,1	46,2	40,1	37,1	33,8	25,0	24,6	26,1
70	62,3	47,5	47,6	47,2	45,5	43,5	44,4	46,2

A enzima B não apresentou rendimento satisfatório, sendo observado a menor atividade na temperatura de 70°C. Os valores de ácidos graxos não reagido foram superiores ao especificado para este produto quando obtido com o uso de catalisadores químicos e temperatura de 150° C (máximo 8,0%); em todas temperaturas e tempo de reação avaliados.

Na média, os resultados obtidos com a enzima B, para o éster 2, foram inferiores aos obtidos com a enzima A. Comparando com os resultados obtidos com esta enzima para o Éster 1, foi verificado a menor eficiência da mesma na síntese do éster 2

**Tabela 8:** Enzima D (0,5%), Éster 2 - Percentual de ácidos graxos livres, 200 rpm e nas temperaturas e tempos de reação estabelecidos

Temperatura (°C)	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
30	57,1	56,5	46,4	34,7	31,8	29,6	28,0	26,9
40	58,8	55,1	43,3	33,9	27,8	20,0	18,2	17,9
50	58,4	51,4	37,6	28,2	22,3	16,9	15,4	13,6
60	60,1	57,7	45,1	32,7	26,2	18,0	18,4	19,0
70	62,3	49,3	31,4	19,1	10,1	6,4	10,2	14,3

A enzima D apresentou bom rendimento na temperatura de 70°C, indicando que a mesma possui atividade suficiente para a esterificação necessária com 24 horas de reação. O teor de ácido graxo livre de 6,4% está dentro do parâmetro especificado para este Éster quando obtido por processo químico.

**Tabela 9:** Enzima E (2,5%), Éster 2 - Percentual de ácidos graxos livres, 200 rpm e nas temperaturas e tempos de reação estabelecidos

Temperatura (°C)	0h	1h	3h	6h	10h	24h	34h	48h
30	58,6	51,0	33,9	28,4	28,1	27,0	25,7	25,0
40	59,1	47,6	31,1	28,9	24,2	17,4	16,8	16,3
50	58,6	39,4	23,2	16,5	15,0	15,5	15,9	15,0
60	61,0	44,6	23,7	18,4	17,8	18,0	18,8	19,7
70	62,3	38,2	15,7	9,2	7,7	6,5	8,0	9,9

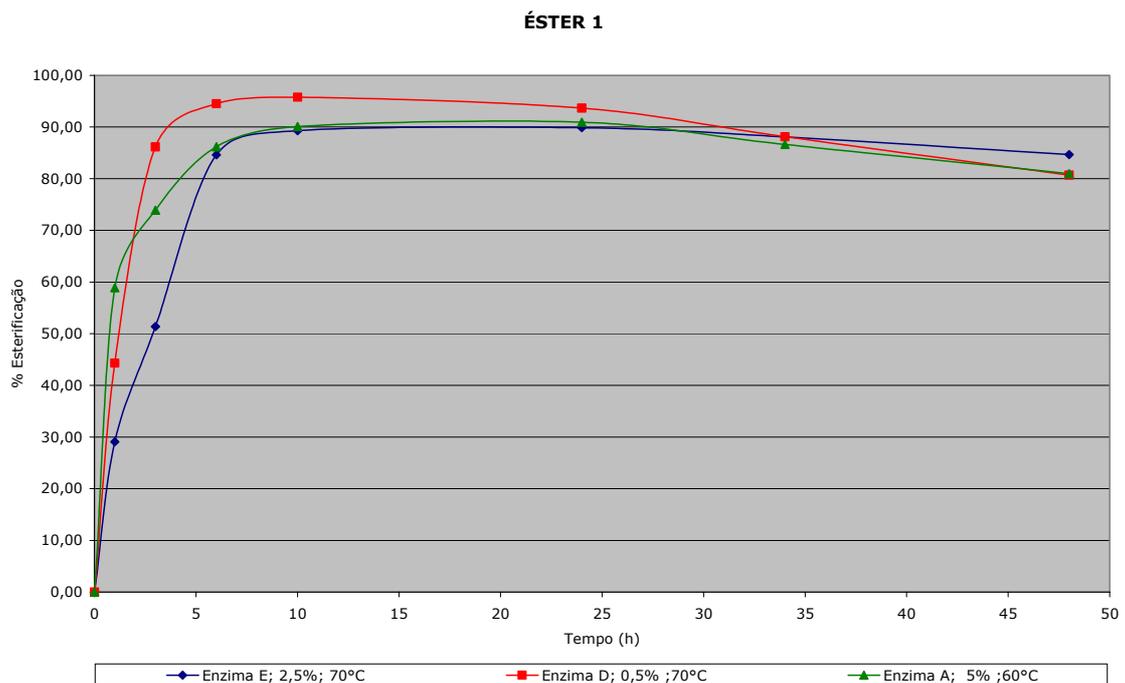
A enzima E apresentou boa performance na temperatura de 70°C, indicando que a mesma possui atividade suficiente para a esterificação necessária, porém com 24 horas de reação. O teor de ácido graxo livre de 6,5% está dentro do parâmetro especificado para este Éster quando obtido por processo químico.

Para o Éster 2, o tempo de reação necessário para que a concentração de ácido graxo fosse inferior a 8,0% foi de 10 horas com a enzima E e 24 horas com a enzimas D.

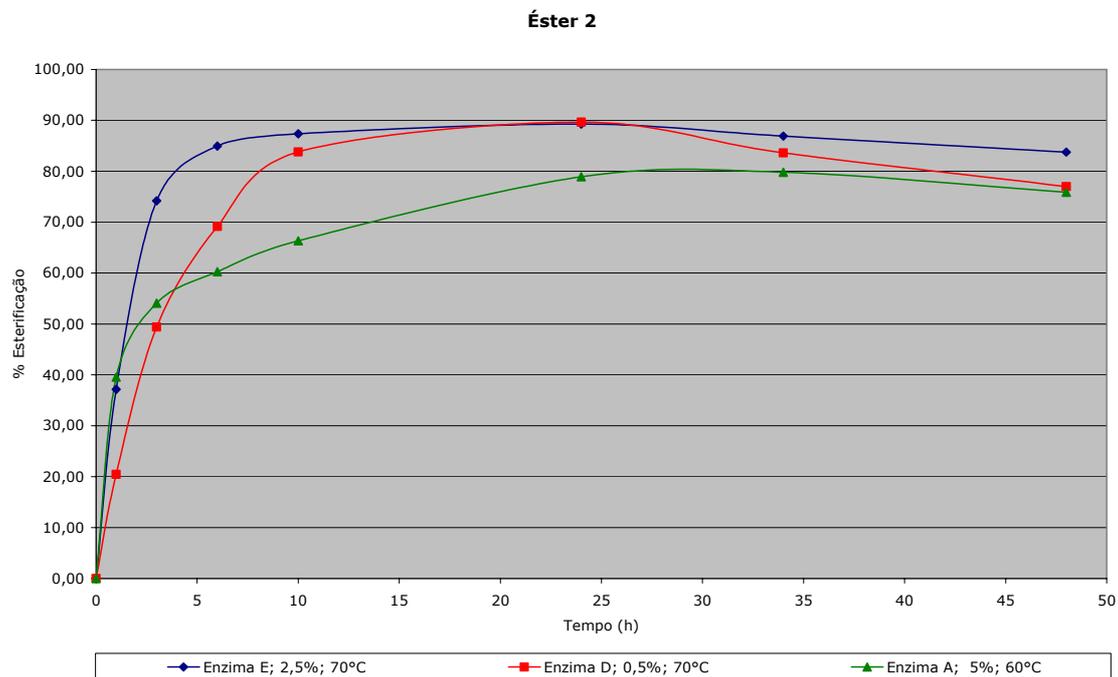
O percentual de esterificação para o Éster 1 e Éster 2, obtidos com as enzimas

que apresentaram melhor performance no que se refere a esterificação nas condições indicadas nos experimentos realizados, estão apresentados na respectivamente nas figuras 1 e 2 (Gráficos) e foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{esterificação} = \frac{(\% \text{ácido graxo inicial} - \% \text{ácido graxo no tempo desejado})}{\% \text{ácido graxo inicial}} \times 100$$



**Figura 1:** Éster 1, percentual de esterificação das enzimas com melhor performance no que se refere a % de esterificação, obtidos na melhor temperatura para cada enzima e agitação de 200rpm



**Figura 2:** Éster 2, percentual de esterificação das enzimas com melhor performance no que se refere a % de esterificação, obtidos na melhor temperatura para cada enzima e agitação de 200rpm

Na literatura consultada não foi encontrado dados relativos ao uso das enzimas avaliadas para a obtenção destes ésteres.

Resultados apresentados por Janssem & Haas (1994), foram obtidos utilizando ácido oleico e polietilenoglicol 400 (PEG 400) com lipase comercial de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM 20). Foi avaliado duas temperaturas 30° e 42°C, sendo que o melhor rendimento (&0%) foi obtido à 42° C, utilizando hexano como solvente. Foi avaliada a relação molar entre ácido oleico/PEG, indicando que a variação molar permite controlar a formação de monoéster e diéster.

No presente trabalho, também foi avaliado a influência da relação molar entre ácidos graxos:polietilenoglicol, nos estudos realizados com o éster 1 (42g:58g) e éster 2 (58g:42g), indicando variação do rendimento da esterificação dependendo da enzima utilizada.

#### 4- CONCLUSÕES

Para cada enzima e para cada éster existe uma temperatura mais adequada para a reação de esterificação. Baseado nas informações disponíveis na literatura sobre a temperatura ótima para hidrólise, foi verificado que não há necessariamente uma correlação entre a melhor temperatura para as reações de esterificação e hidrólise

O controle do tempo de reação é importante, visto que após determinado período pode ocorrer a hidrólise do éster formado, sendo que a hidrólise variou conforme a enzima utilizada. Baseado no fato de hidrólise do éster formado, é necessário remover a água formada no sistema reacional. Para isto pode ser utilizado processo de destilação e “sparge” com nitrogênio ou remoção da água por adição de peneira molecular ou sulfato de sódio anidro e posterior filtração do éster.

Das enzimas avaliadas, podemos concluir que a B apresentou a menor performance nas condições testadas.

O Éster 2 necessita de tempo de reação superior ao Éster 1 para atingir o percentual de ácido graxo livre especificado para o produto obtido por via química (máximo 8,0%).

O tempo de reação para a obtenção do Éster 2 é superior ao do Éster 1 com as duas melhores enzimas (D e E). Este fato pode estar relacionado principalmente com a menor quantidade de polietilenoglicol usado na síntese do éster 2, a formação de maior quantidade de diéster, podendo levar a um impedimento estérico, diferença de solubilidade das enzimas no meio reacional e a maior estabilidade das enzimas na presença de maior quantidade de polietilenoglicol.

Nas condições de processo estudadas, as enzimas mais indicadas para a bicatálise destes ésteres são a D e E.

A enzima D a 0,5% e 70°C é mais indicada para a obtenção do Éster 1, pelo maior percentual de esterificação (95,6%) e em menor tempo de reação. A enzima E a

2,5% e 70°C, é mais indicada para a obtenção do Éster 2, por ter apresentado um percentual de esterificação de 87,3%.

O aumento da temperatura reduz a viscosidade do meio reacional (acima de 50° C), facilitando a agitação e podendo contribuir para o aumento no rendimento da esterificação.

A enzima E, uma enzima imobilizada, permite o reuso mantendo sua capacidade de esterificação em níveis de 80% por até 5 ciclos, conforme dados apresentados por Janssem & Haas, para síntese de ésteres de ácido oleico e polietilenoglicol 400.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTRO, H.F.. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, 18 (6):544 - 554, 1995.

CASTRO, H.F., MENDES, A.A., SANTOS, J.C., AGUIAR, C.L.. Modificação de oleos e gorduras por biotransformação. **Química nova**, 27(1):146-156, 2004.

DAS, S., BHATTACHARYYA, D.K.. Enzymatic synthesis and evaluation of surface active properties of di-basic acid ésteres of polyehtylene glycols. **J. Oleo Sci.**, 55 (5):233-238, 2006.

GIOIELLI, L.A., PITOMBO, R.N.M., VITOLO, M., BARUFALDI, R., OLIVERIA, M.N., MORENO, P.C.. Acidolysis of babassu fat catalysed by immobilized lipase. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, 71 (6):579-582, 1994.

GORMAN, L.A.S., DORDICK, J.S.. Organic solvents strip water off enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, 39:392-397, 1992.

JANSSEN, G.G., HAAS, M.J.. Lipase-catalyzed synthesis of oleic acid esters of polyethylene glycol 400. **Biotechnol. Letters**, 16(2):163-168, 1994.

MAAG,H.. Fatty acid derivates: important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 61(2):259-267, 1984.

MONTEIRO, J.B., NINOW, J.L., NASCIMENTO, M.G.. Obtenção de glicerídeos parciais via esterificação do ácido láurico com o glicerol catalisada por lipase, **Seminar on enzymatic hydrolysis of biomass proceedings**, 1996.

PASTORE, G.M..Produção e caracterização bioquímica de monoacilglicerol lipase microbiana e aplicação de lipases na hidrólise e esterificação enzimática. **Tese de doutorado**, 1992.

ROBERTS,S.M., TURNER, N.J., WILLETS, A.J., TURNER, M.K.. Introduction to biocatalysis using enzumes and microorganisms, **Cambridge University Press**, 1995.

TAIPA,M.A., AIRES-BARROS,M.R., CABRAL, J.M.S.. **J. Biotechnol.**, 26:111-142, 1992.



## CAPÍTULO 5

### PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE MONO e DIÉSTERES DE POLIETILENOGLICOL UTILIZANDO LIPASES COMO BIOCATALISADORES E AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE SURFACTANTE DOS PRODUTOS OBTIDOS

Luiz W. B. PACE; Gláucia M. PASTORE

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi propor um modelo para validação do processo de obtenção ésteres de polietilenoglicol utilizando lipases como biocatalisadores, comparando os resultados com os mesmos produtos obtidos por processo químico, baseado na caracterização dos ésteres obtidos, a ação como surfactante e a variância do processo.

As análises de caracterização dos produtos foram realizadas por espectrometria no infravermelho, cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência. A avaliação da performance como surfactante, dos produtos obtidos, foi baseada na capacidade de formação de espuma e estabilidade da emulsão.

O valor de variância para o processo biocatalisado, baseado no teor de ácido graxo, foi de 0,1 para o éster 1 e de 0,2 para o éster 2, comparado com 0,4 e 2,6, respectivamente para o éster 1 e 2, obtidos por processo químico.

Os resultados das análises indicaram que é possível obter os ésteres utilizando biocatalisadores com características semelhantes ou superiores aos produtos obtidos por processo químico.

**Palavras-chave:** esterificação, biocatálise, validação.

## **SUMMARY**

The objective of this paper is to propose a process validation model to obtain polyethylene glycol esters using lipases as biocatalysts, comparing the results to the same products obtained by a chemical process, based on the characterization of esters obtained, their action as surfactants and process variance.

Product characterization analysis were made using infrared spectroscopy, thin layer chromatography, and high performance liquid chromatography. The performance evaluation of the obtained products as surfactants was based on the capacity of foam formation and emulsion stability.

The value of variance for the biocatalyst process, based on the fatty acid content, was 0.1 for ester 1 and 0.2 for ester 2, compared to 0.4 and 2.6, for esters 1 and 2 obtained through the chemical process.

The results of the analyses indicated that it is possible to obtain esters using biocatalysts with similar or superior characteristics if compared to products obtained through the chemical process.

**Key words:** esterification, biocatalysis, validation

## 1- INTRODUÇÃO

Os ésteres de polietilenoglicol podem ser sintetizados quimicamente à altas temperaturas (140-250°C), com formação de subprodutos indesejáveis e podendo levar a obtenção de produtos com coloração escura e turva. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de processos menos agressivos e mais seguros, utilizando lipases como catalisador. (Maag, 1984) e (Castro et al., 2004)

Os ésteres obtidos da reação de ácidos graxos e poliglicóis de alto peso molecular, podem ser utilizados como surfactantes e/ou antiespumantes nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e de especialidades químicas (Castro et al., 1995).

Janssen & Haas (1994) estudaram a esterificação do polietilenoglicol (PEG) 400 usando ácido oleico e Lipozyme usando hexano como solvente e temperatura de 42°C, sendo obtido seletivamente monooleato e dioleato de PEG 400. A Lipozyme imobilizada, manteve-se com 80% de atividade após cinco ciclos de reação.

As enzimas capazes de realizar este tipo de reação são as lipases pertencentes à classe das hidrolases (EC 3.1.1.3), atuando nas transformações na qual o substrato é muito pouco solúvel em água. Atualmente existem lipases que são termoestáveis e ativas na faixa de 30 a 70°C, sendo encontradas na forma livres e imobilizadas. Entretanto, a termoestabilidade varia principalmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que apresentam maior estabilidade térmica (Castro et al., 2004).

Para que o processo biocatalítico inicie, é necessário um grau de hidratação mínimo de 10 a 12%p/p, variando de acordo com a hidrofobicidade dos reagentes, dos produtos e do solvente utilizados. Outros estudos indicam que a catálise ocorre com um nível de hidratação de 0,2g água por grama de enzima (Gorman & Dordick, 1991). Geralmente, na síntese de ésteres, não é necessário o ajuste prévio da quantidade de água, visto que ocorre formação de água na reação de

esterificação.(Monteiro et al., 1996).

As lipases possuem a capacidade de permanecerem ativas em meios com baixa concentração de água ou anidros, sendo que estas condições permitem a reação reversa, possibilitando o uso das lipases como catalisador das reações de esterificação e transesterificação (Roberts et al., 1995 e Castro et al., 2004). Podem também catalisar reações de interesterificação de óleos e gorduras, obtendo-se produtos que não são formados pelos métodos químicos convencionais (Gioielli et al., 1994).

Durante o uso das lipases no processo de esterificação pode ocorrer desativação das mesmas por diferentes fatores, incluindo temperatura, força de cisalhamento e desnaturantes químicos. A redução da desativação da lipase de *Aspergillus oryzae*, pela adição de polietilenoglicol no reator foi descrita por Gandhi et al.(2000).

## 2- MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1-MATERIAL

As preparações comerciais das enzimas, utilizadas como biocatalisadores, selecionadas previamente, estão apresentadas na tabela 1:

**Tabela 1:** Preparações comerciais das enzimas utilizadas como biocatalisadores

Enzimas	Descrição
D	Lipase – <i>Aspergillus niger</i> (organismo de produção); <i>Candida antarctica</i> (organismo doador)
E	Lipase – <i>Aspergillus oryzae</i> (organismo de produção); <i>Rhizomucor miehei</i> (organismo doador)

Como substrato foi utilizado mistura de ácidos graxos de tall oil destilado e polietilenoglicol 400, em diferentes proporções descritas nas condições experimentais.

Reagentes para análises químicas: hidróxido de sódio 0,05N, acetona, etanol, éter de petróleo, éter etílico, ácido fórmico, acetonitrila grau cromatográfico e indicador de fenolftaleína em solução etanólica a 1% e iodo sublimado.

Frascos para reação: flaeker capacidade de 300mL

Cuba cromatográfica

Placas de sílica gel.

Transfepettor 0 – 10 $\mu$ L

## **2.2- EQUIPAMENTOS**

Para a obtenção dos ésteres foi utilizado um agitador orbital (tipo “Shaker”) da marca Tecnal Ltda, com temperatura e velocidade controladas.

Para as titulações foi utilizado bureta digital Brand. Para a determinação de água foi utilizado Karl Fisher, Mettler modelo D-18.

Para a obtenção dos espectros das amostras na região do infravermelho médio foi utilizado um espectrofotômetro com transformada de Fourier da Perkin Elmer, modelo Spectrum One e acessório de reflectância atenuada horizontal (HATR) com célula de ZnSe. A comparação entre os espectros foi realizada através do “software Spectrum” da Perkin Elmer, sendo obtido os valores de correlação e comparação das bandas espectrais.

A separação/identificação dos componentes das amostras dos ésteres foram realizadas por cromatografia de camada delgada (CCD), sendo utilizadas placas de sílica Gel 60 da marca Merck, sendo a corrida cromatográfica feita em cubas

de vidro. Para aplicação das amostras de ésteres na placa de sílica Gel, foi utilizado pipeta tipo Transfepettor de volume variável.

Cromatogramas das amostras dos ésteres foram obtidos utilizando um cromatógrafo líquido da Agilent, modelo 1100A, equipado com bomba quaternária e detector com arranjo de diodos (210nm).

A distribuição do tamanho de partícula foi realizada através do equipamento marca Horiba – Laser scattering particle size distribution analyzer, modelo LA-300 e a visualização microscópica das dispersões dos produtos em água, através de microscópio ótico Olympus, modelo CB-2.

### **2.3- CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS**

Para a obtenção dos monoésteres (éster 1) e diésteres (éster 2), foi preparado quantidade suficiente de substrato para as reações, misturando ácido graxo de “tall oil” e polietilenoglicol 400 nas proporções de 42:58 (em massa) e 58:42 (em massa), respectivamente; sendo este procedimento baseado no método descrito por Janssen & Haas (1994).

Alíquota de 50g do substrato foi transferida aos frascos de reação e colocados no agitador orbital, com temperatura controlada em 70°C e agitação a 200rpm.

Após estabilização da temperatura foi adicionada a quantidade (em massa) das enzimas a serem avaliadas, separadamente a cada frasco de reação. A concentração das enzimas a serem avaliadas foram selecionadas dos estudos realizados previamente, sendo enzima D (0,5%) e enzima E (2,5%).

Baseado no método descrito por Pastore (1992), a reação foi acompanhada pela determinação da quantidade de ácidos graxos livres, através de titulação com hidróxido de sódio 0,05N e fenolftaleína como indicador. Os tempos de reação estabelecidos para acompanhamento foram 0, 1, 3, 5, 7, 9, e 24 horas.

Os resultados foram expressos em % de ácidos graxos livres utilizando o peso molecular médio do “tall oil” e % de esterificação durante o tempo de reação planejado.

Os dados do porcentual de ácidos graxos livres, tempo e temperatura dos ésteres padrão foram obtidos da esterificação por processo químico, no qual foi utilizado catalisador ácido e temperatura de 140°C para o Éster 1 e 150°C para o Éster 2.

## **2.4- CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS**

Os produtos obtidos da esterificação foram caracterizados através da coloração, espectrometria no infravermelho (FT-IR), perfil cromatográfico em placa de sílica Gel 60 (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os produtos obtidos por biocatálise foram comparados com os respectivos produtos obtidos por processo químico (comerciais).

- Espectrometria no infravermelho (FT-IR)

Amostra final da síntese enzimática de cada éster foi analisada por espectrometria no infravermelho, sem preparação prévia, por adaptação da metodologia descrita por Bayada et al. (1995).

Para a correção de fundo (background) foi utilizado espectro do ar.

Para obtenção dos espectros na região do infravermelho foram acumuladas 10 corridas (scan) na faixa de 4000 - 625 $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4 $\text{cm}^{-1}$ ; ambiente com temperatura controlada entre 20° - 25°C e umidade de 45 - 50%. Os espectros obtidos em transmitância e na segunda derivada foram utilizados para comparação com os padrões de cada éster.

- Cromatografia de camada delgada (CCD)

O método para cromatografia em camada delgada foi adaptado dos métodos

descritos por Pastore (1992), Janssen & Haas (1994) e Monteiro et al. (1996), ajustando a fase móvel visando a melhor separação dos componentes presentes na amostra.

A amostra final da síntese enzimática de cada éster foi diluída em acetona na proporção 1:5.

Utilizando uma pipeta Transfepettor, foi aplicado 2 $\mu$ L da diluição na placa de sílica Gel 60, previamente ativada em estufa a 105°C.

Após cada aplicação, procedeu-se a evaporação do solvente, utilizando um secador.

A placa foi submetida a corrida cromatográfica em cuba de vidro previamente saturada com a fase móvel composta de éter de petróleo: éter etílico: ácido fórmico (150:150:20 v/v/v).

Finalizado a corrida, a placa foi levada a estufa à 105°C para evaporação completa da fase móvel.

A placa foi levada a uma cuba cromatográfica contendo iodo sublimado para a até completa revelação dos ésteres.

- Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)

O perfil cromatográfico utilizando CLAE e detector de UV foi adaptado do método descrito por Ergan & Trani (1991).

Foi pesado analiticamente 0,50g da amostra final de cada éster em balão volumétrico de 50mL e avolumado com acetonitrila:água (60:40 v/v).

As amostras diluídas foram filtradas em filtro de 0,45 $\mu$ m de poro (Millex) e injetadas na coluna cromatográfica

A fase móvel utilizada foi acetonitrila:água (60:40 v/v) sendo o tempo de corrida cromatográfica de 20 minutos, com fluxo de 1,25 mL/minuto.

Os ésteres foram detectados por absorção na região do visível, sendo realizado as determinações a 210nm.

A identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção obtidos com os ésteres comerciais (considerados padrões) injetados nas mesmas condições das amostras. A quantificação foi realizada através de resposta por padronização externa, construídas com 3 concentrações diferentes de cada éster comercial.

As amostras e padrões foram analisados em duplicata.

Os limites de detecção foram obtidos através de diluições sucessivas dos padrões, sendo calculados como sendo correspondente à concentração que produziu um valor do sinal medido três vezes maior que o nível de ruído médio medido com a fase móvel. Os limites de quantificação foram calculados como sendo duas vezes o valor dos limites de detecção.

## **2.5- TESTES APLICATIVOS**

Amostra final da síntese enzimática de cada éster foi avaliada quanto a dispersão em água, formação de espuma e tamanho da partícula das emulsões.

A análise de dispersão (efeito da diluição) foi realizada adaptando-se o método descrito por El-Laithy (2003); sendo 2mL de cada éster adicionado à 100mL de água destilada em uma proveta de 100mL. O conteúdo de cada proveta foi agitado por inversão durante 5 minutos e observado a estabilidade da dispersão após 1 hora.

A capacidade dos ésteres em formar espuma foi avaliada pela inversão vigorosa da proveta durante 5 minutos, determinando a altura da espuma formada em cm. A persistência da espuma formada foi avaliada após 10 minutos de repouso.

O tamanho de partículas foi determinado utilizando a diluição dos produtos à 2% em água destilada, utilizando o analisador de tamanho de partículas Horiba LM 300.

## **2.6- PROCESSO PARA OBTENÇÃO DOS ÉSTERES EM ESCALA INDUSTRIAL**

O processo para a obtenção de ésteres em escala industrial utilizando biocatalisadores, foi proposto baseado nos resultados obtidos nos testes em laboratório e dos dados de obtenção dos ésteres 1 e 2 pelo processo de catálise química.

Para a elaboração do processo, foram levantados os principais aspectos que impactam a manufatura do produto em escala industrial, sendo classificados como crítico e não crítico.

## **3- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 – ACOMPANHAMENTO DA ESTERIFICAÇÃO**

Os resultados do acompanhamento das reações de esterificação, através do percentual de ácidos graxos livres obtidos para as duas enzimas selecionadas, na temperatura de 70°C e tempos de reação determinados, obtidos por titulometria, para o Éster 1 estão apresentados nas tabelas 2 e 3 e para o Éster 2, nas tabelas 4 e 5. A expressão dos resultados, cálculo de desvio-padrão e variância foram baseados nos métodos propostos por Leite (1998).

**Tabela 2:** Éster 1- Padrão e obtido pelo uso da enzima D (0,5%), - Percentual de ácidos graxos livres, 200rpm e na temperatura de 70°C e tempos de reação estabelecidos:

Tempo (h)	Reação 1	Reação 2	Reação 3	Reação 4	Reação 5	Média	Desvio-padrão
0	39,8	42,0	39,2	40,2	41,6	40,6	1,2
1	22,1	25,0	25,0	24,1	26,0	24,4	1,5
3	5,5	4,6	5,0	4,5	5,4	5,0	0,4
6	2,2	3,2	2,5	3,4	3,5	3,0	0,6
10	1,7	2,2	2,0	2,1	2,5	2,1	0,3
24	2,5	3,0	3,1	2,7	3,4	2,9	0,3
Padrão	3,5	1,7	2,4	2,3	2,2	2,4	0,6
Variância (padrão)	0,4			Variância (éster 1;10h)		0,1	

**Tabela 3:** Éster 1- Padrão e obtido pelo uso da enzima E (2,5%), - Percentual de ácidos graxos livres, 200rpm e na temperatura de 70°C e tempos de reação estabelecidos:

Tempo (h)	Reação 1	Reação 2	Reação 3	Reação 4	Reação 5	Média	Desvio-padrão
0	39,8	42,0	39,2	40,2	41,6	40,6	1,2
1	28,8	26,9	27,7	27,4	26,7	27,5	0,8
3	14,6	16,1	18,1	16,5	15,5	16,1	1,3
6	8,9	11,4	7,0	7,3	9,2	8,8	1,8
10	5,3	5,6	6,9	5,4	4,3	5,5	1,0
24	3,5	4,0	4,0	3,7	3,3	3,7	0,3
Padrão	3,5	1,7	2,4	2,3	2,2	2,4	0,7
Variância (padrão)	0,4			Variância (éster 1;24h)	0,1		

**Tabela 4:** Éster 2- Padrão e obtido pelo uso da enzima D (0,5%), - Percentual de ácidos graxos livres, 200rpm e na temperatura de 70°C e tempos de reação estabelecidos:

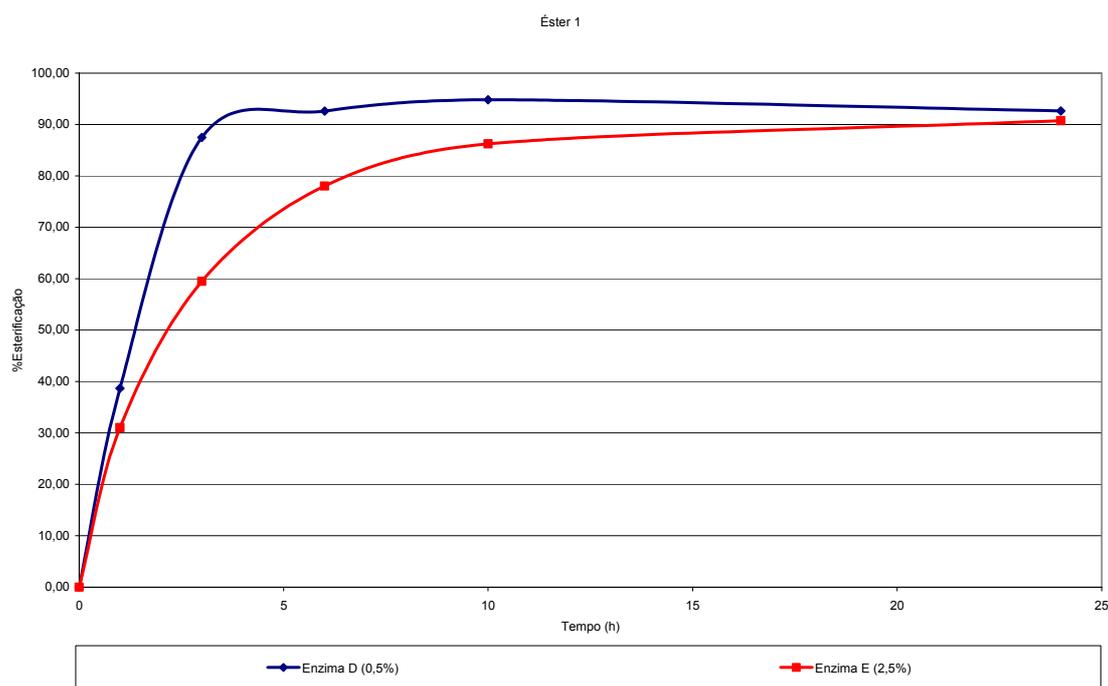
Tempo (h)	Reação 1	Reação 2	Reação 3	Reação 4	Reação 5	Média	Desvio-padrão
0	62,3	60,1	58,7	59,3	58,2	59,7	1,6
1	42,3	38,5	39,2	39,9	36,4	39,3	2,1
3	31,4	25,8	25,0	26,9	21,6	26,1	3,5
6	19,1	16,8	18,2	22,4	21,0	19,5	2,2
10	10,0	9,4	8,8	11,2	10,2	9,9	0,9
24	6,4	8,1	6,8	8,1	6,7	7,2	0,8
Padrão	7,0	5,0	4,8	5,1	7,4	5,9	1,3
Variância (padrão)	2,6			Variância (éster;24h)		0,6	

**Tabela 5:** Éster 2- Padrão e obtido pelo uso da enzima E (2,5%), - Percentual de ácidos graxos livres, 200rpm e na temperatura de 70°C e tempos de reação estabelecidos:

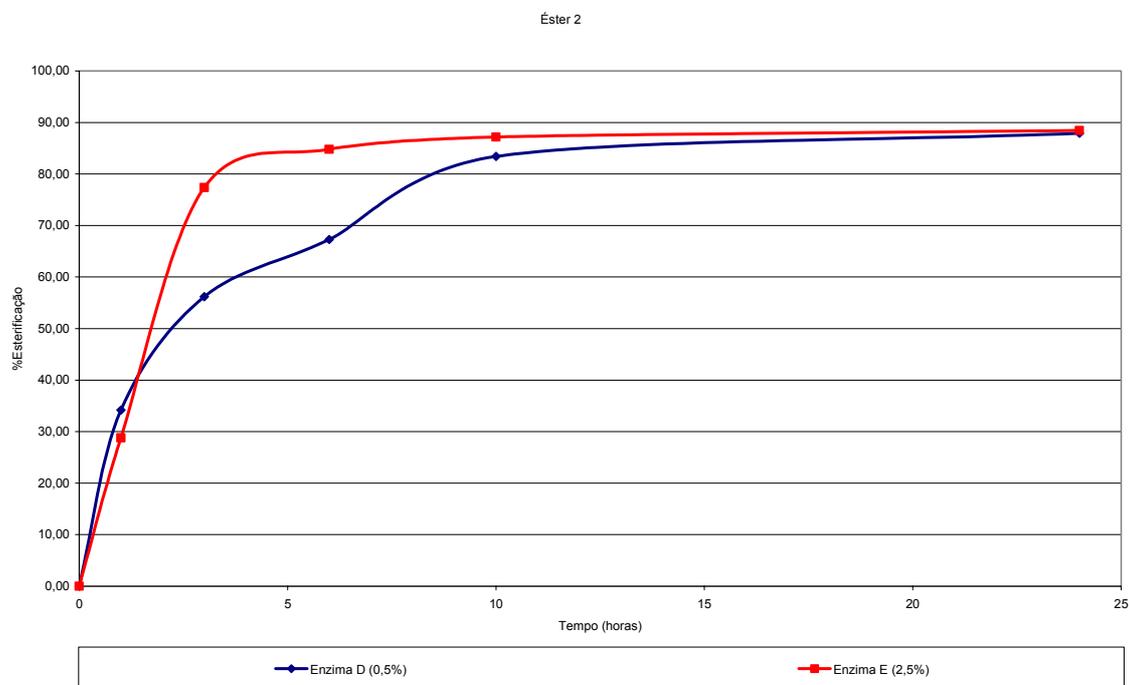
Tempo (h)	Reação 1	Reação 2	Reação 3	Reação 4	Reação 5	Média	Desvio-padrão
0	62,3	60,1	58,7	59,3	58,2	59,7	1,6
1	38,2	39,8	44,5	46,2	43,7	42,5	3,4
3	15,7	11,4	12,8	14,4	13,3	13,5	1,6
6	9,2	9,0	8,7	10,3	8,3	9,1	0,7
10	7,7	8,1	7,4	8,0	7,0	7,6	0,4
24	6,5	7,5	7,0	6,9	6,5	6,9	0,4
Padrão	7,0	5,0	4,8	5,1	7,4	5,9	1,3
Variância (padrão)	2,6			Variância (éster;10h)	0,18		

A concentração de ácido graxo não reagido dentro da faixa especificada, para o éster 1 foi obtida com a enzima D à 0,5% após 10 horas de reação, enquanto que para o éster 2 a enzima que apresentou performance desejada foi a E à 2,5%, após 10 horas.

Comparando a variação dos resultados dos ésteres obtidos por processo químico com o processo enzimático, foi obtido valores inferiores de variância quando utilizado enzima como catalisador e nas condições em que os experimentos foram realizados. O valor de variância para o processo químico foi de 0,42 para o éster 1 e 2,64 para o éster 2, enquanto que para a melhor condição utilizando enzima, este valor foi de 0,10 para o éster 1 e 0,18 para o éster 2.



**Figura 1:** Éster 1, percentual de esterificação das enzimas com melhor performance no que se refere a % de esterificação, obtidos à 70°C e agitação de 200rpm



**Figura 2:** Éster 2, percentual de esterificação das enzimas com melhor performance no que se refere a % de esterificação, obtidos à 70°C e agitação de 200rpm

O rendimento máximo na síntese do éster 1 foi de 94,8% e obtido com a enzima D, na concentração de 0,5% e temperatura de 70°. Para o éster 2, rendimento de 87,2% foi obtido com a enzima E, a 2,5% e 70°C.

O teor de água foi determinado através do processo titulométrico por Karl Fischer e indicou variação para o éster 1 entre 0,50 – 0,90% e 0,55 – 1,00%, respectivamente com a enzima D (0,5%) e E (2,5%) e para o éster 2, variação entre 0,50 – 1,20% e 0,60 – 1,20%, respectivamente para as enzimas D (0,5%) e E (2,5%) na temperatura de 70°C.

### 3.2 – CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS

Os resultados da caracterização dos produtos obtidos com o uso de biocatalisadores comparado com os produtos da síntese com catalisador químico, baseados na aparência, espectrometria no infravermelho, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência estão apresentados a seguir.

#### 3.2.1- APARÊNCIA VISUAL

O resultado da avaliação visual da aparência dos Éster 1 e 2 obtidos por biocatálise comparado com os ésteres obtidos com o uso de catalisador químico estão apresentados nas figuras 3 e 4 deste capítulo.



**Figura 3:** Aparência visual do Éster 1: (A) produto obtido com o uso do catalisador químico, (B) produto obtido com enzima D (0,5% e 70°C) e (C) produto obtido com enzima E (2,5% e 70°C)



**Figura 4:** Aparência visual do Éster 2: (D) produto obtido com o uso do catalisador químico, (E) produto obtido com enzima D (0,5% e 70°C) e (C) produto obtido com enzima F (2,5% e 70°C)

Foi observado que os produtos resultantes das esterificações catalisadas por enzimas, apresentaram coloração significativamente mais clara, indicativo de não oxidação dos produtos. Conforme Maag (1984), os produtos obtidos com o uso de catalisadores químicos utilizam altas temperaturas e atmosfera inertizada com nitrogênio e apresentam coloração mais escura devido à oxidação das ligações duplas.

### 3.2.2 ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO (FT-IR)

O uso do acessório de reflectância atenuada horizontal (HATR) simplificou a preparação das amostras dos ésteres para a obtenção dos espectros no infravermelho.

As comparações qualitativas entre as amostras finais de cada éster obtido por catálise enzimática e o respectivo produto padrão estão apresentadas nas tabelas 6 e 7.

**Tabela 5:** Comparação das amostras de Éster 1 obtidos por catálise enzimática e o produto padrão, obtido por processo químico.

Produto	Correlação
Éster 1 (padrão)	1,0000
Éster 1 (Enzima D - 0,5%)	0,9960
Éster 1 (Enzima E - 2,5%)	0,9942
Éster 1 (branco)	0,8307

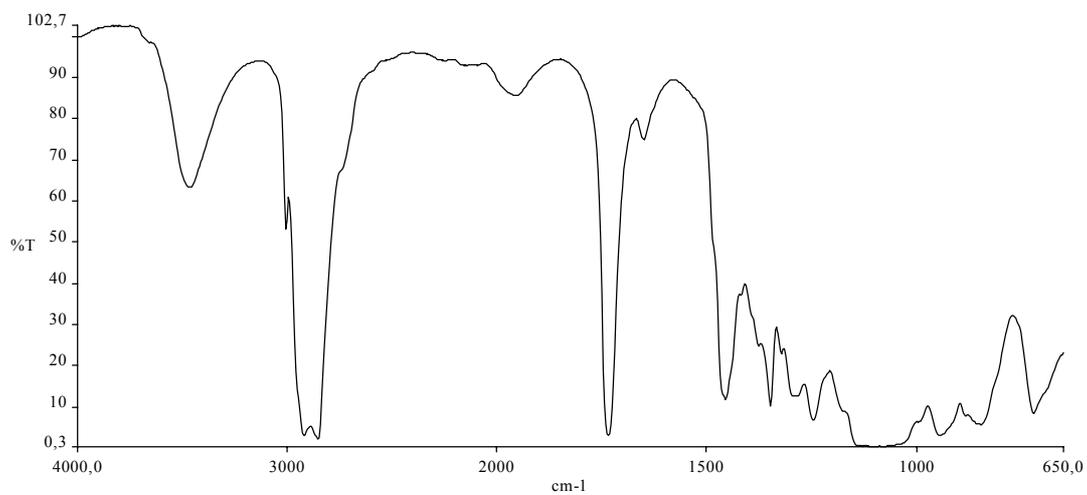
O espectro do Éster 1 (padrão) foi comparado com espectros de amostras do produto obtidas utilizando catalisador enzimático. As correlações dos espectros, obtidas através de software específico permitiram verificar a identidade das mesmas com o éster padrão. Pela comparação dos espectros dos produtos obtidos por via enzimática com o espectro do éster padrão, foi verificado que o Éster 1 obtido com a Enzima D (0,5%) pode ser considerado semelhante ao padrão.

**Tabela 7:** Comparação das amostras de Éster 2 obtidos por catálise enzimática e o produto padrão, obtido por processo químico.

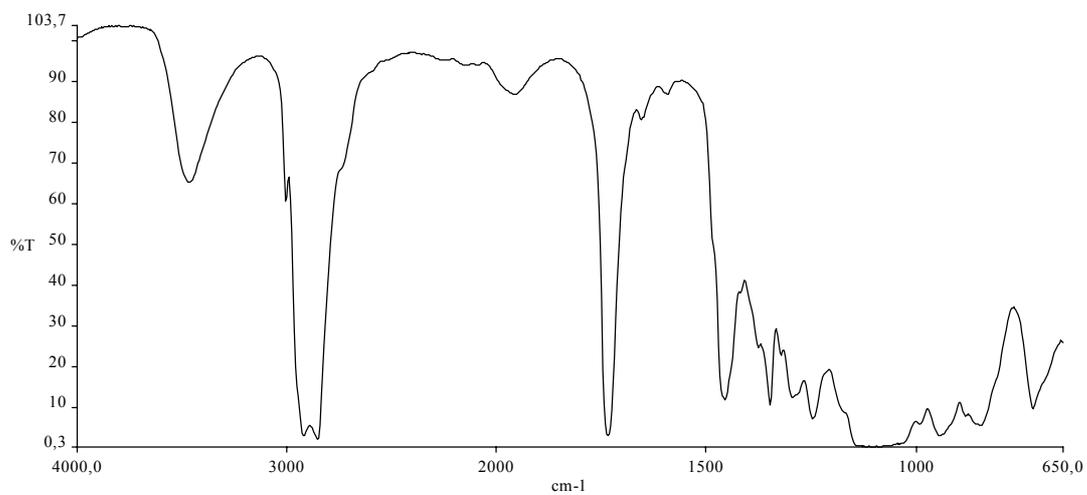
Produto	Correlação
Éster 2 (padrão)	1,0000
Éster 2 (Enzima E - 2,5%)	0,9983
Éster 2 (Enzima D - 0,5%)	0,9958
Éster 2 (branco)	0,7711

O espectro do Éster 2 (padrão) foi comparado com espectros de amostras do produto obtidas por biocatálise. As correlações dos espectros, obtidas através de software específico permitiram verificar a identidade das mesmas com o éster padrão. Pela comparação dos espectros dos produtos obtidos por via enzimática com o espectro do éster padrão, foi verificado que o Éster 2 obtido com a Enzima E (2,5%) pode ser considerado semelhante ao padrão.

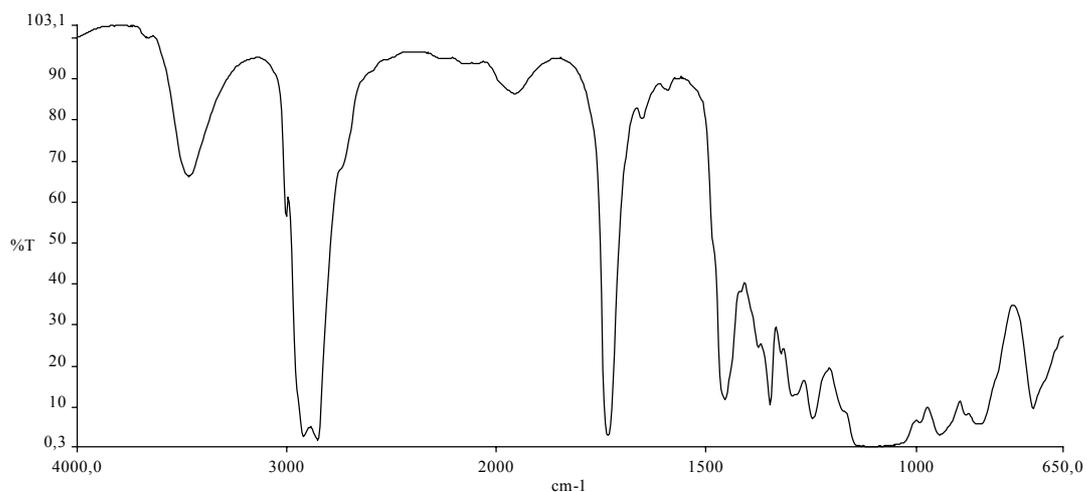
Os espectros no infravermelho em transmitância do Éster 1 padrão, Enzimas D e E estão apresentados, respectivamente nas figuras 5 à 7 e os relacionados ao Éster 2 estão apresentados nas figura 8 à 10.



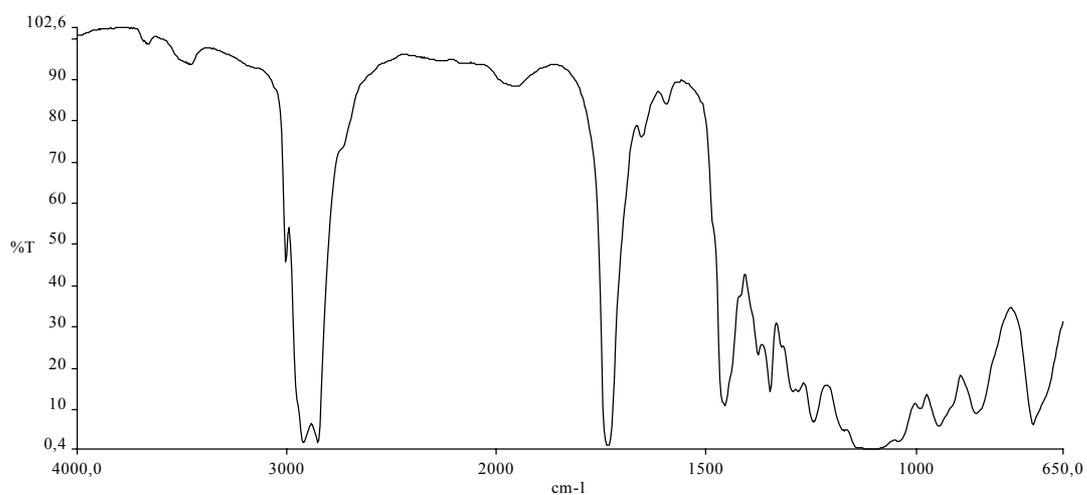
**Figura 5:** Espectro no infravermelho do Éster 1 (padrão), obtido por reflectância (4000 - 625 $\text{cm}^{-1}$ , resolução: 4 $\text{cm}^{-1}$ ).



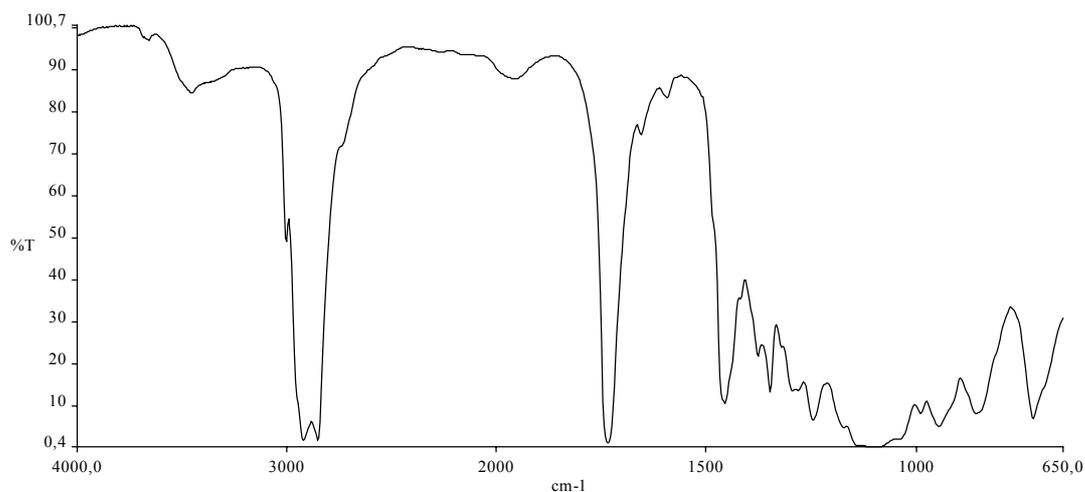
**Figura 6:** Espectro no infravermelho do Éster 1 (enzima D-0,5%), obtido por reflectância (4000 - 625 $\text{cm}^{-1}$ , resolução: 4 $\text{cm}^{-1}$ ).



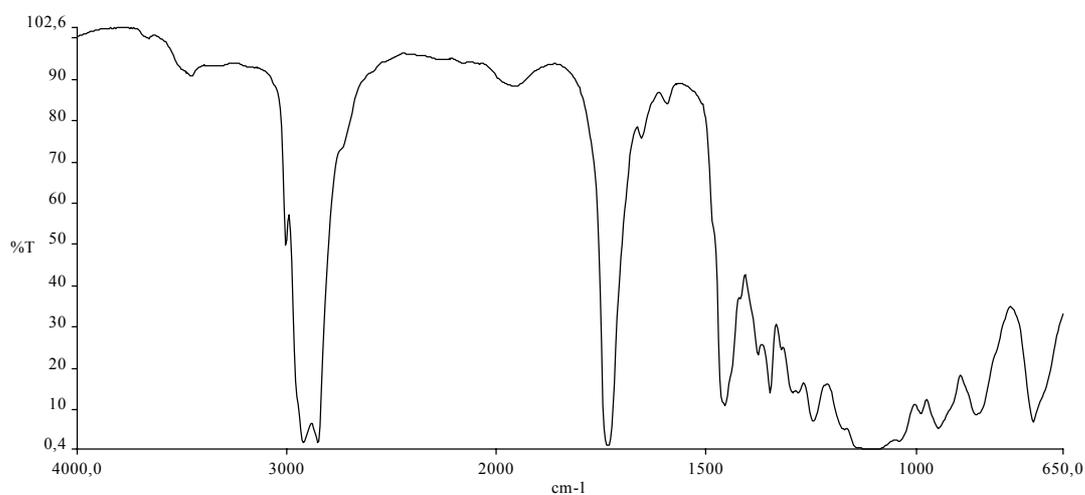
**Figura 7:** Espectro no infravermelho do Éster 1 (enzima E-2,5%), obtido por reflectância ( $4000 - 625\text{cm}^{-1}$ , resolução:  $4\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 8:** Espectro no infravermelho do Éster 2 (padrão), obtido por reflectância ( $4000 - 625\text{cm}^{-1}$ , resolução:  $4\text{cm}^{-1}$ ).

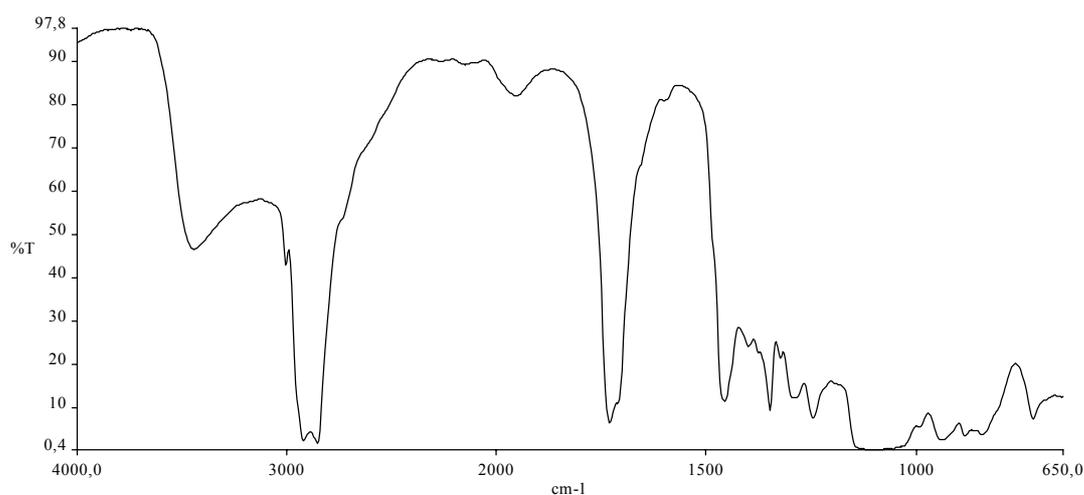


**Figura 9:** Espectro no infravermelho do Éster 2 (enzima D-0,5%), obtido por reflectância (4000 - 625 $\text{cm}^{-1}$ , resolução: 4 $\text{cm}^{-1}$ ).

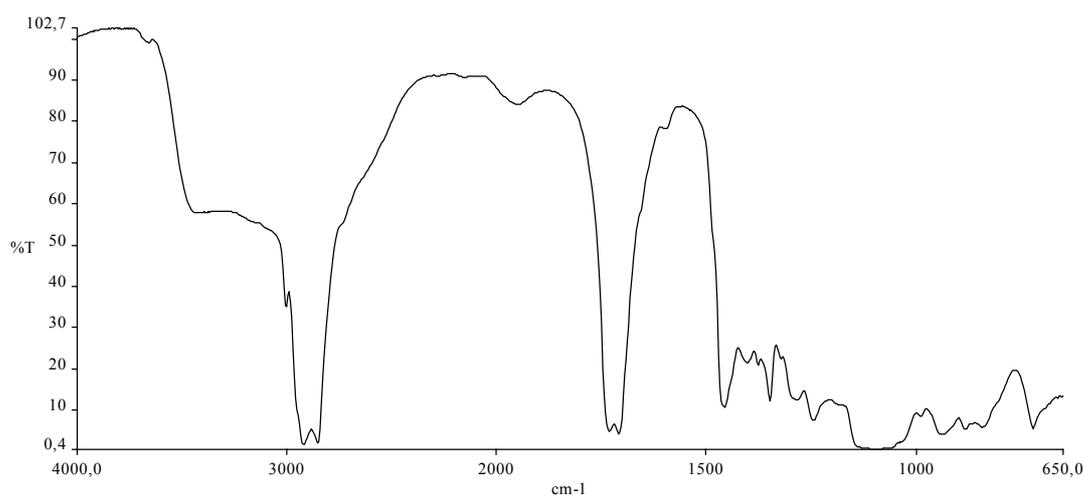


**Figura 10:** Espectro no infravermelho do Éster 2 (enzima E-2,5%), obtido por reflectância (4000 - 625 $\text{cm}^{-1}$ , resolução: 4 $\text{cm}^{-1}$ ).

Nas figuras 11 e 12, estão apresentados, respectivamente, os espectros na região do infravermelho dos ésteres 1 e 2 sem reação (branco).



**Figura 11:** Espectro no infravermelho do Éster 1 (branco), obtido por reflectância (4000 - 625 $\text{cm}^{-1}$ , resolução: 4 $\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 12:** Espectro no infravermelho do Éster 2 (branco), obtido por reflectância (4000 - 625 $\text{cm}^{-1}$ , resolução: 4 $\text{cm}^{-1}$ ).

As bandas de vibração características dos ésteres entre 1750 – 1730 $\text{cm}^{-1}$  relativo a carbonila (-CO-) e a 2800-2750 $\text{cm}^{-1}$  para os -C-H correspondentes ao -CH<sub>3</sub> e -CH<sub>2</sub>-, foram observadas nas amostras finais dos produtos da reação com enzimas e nos catalisados quimicamente, estando de acordo com o apresentado por Monteiro et al.(1996). A banda característica das hidroxilas (-OH) a 3500 $\text{cm}^{-1}$ , foi observada nas amostras do Éster 1, indicando a formação de monoésteres e não

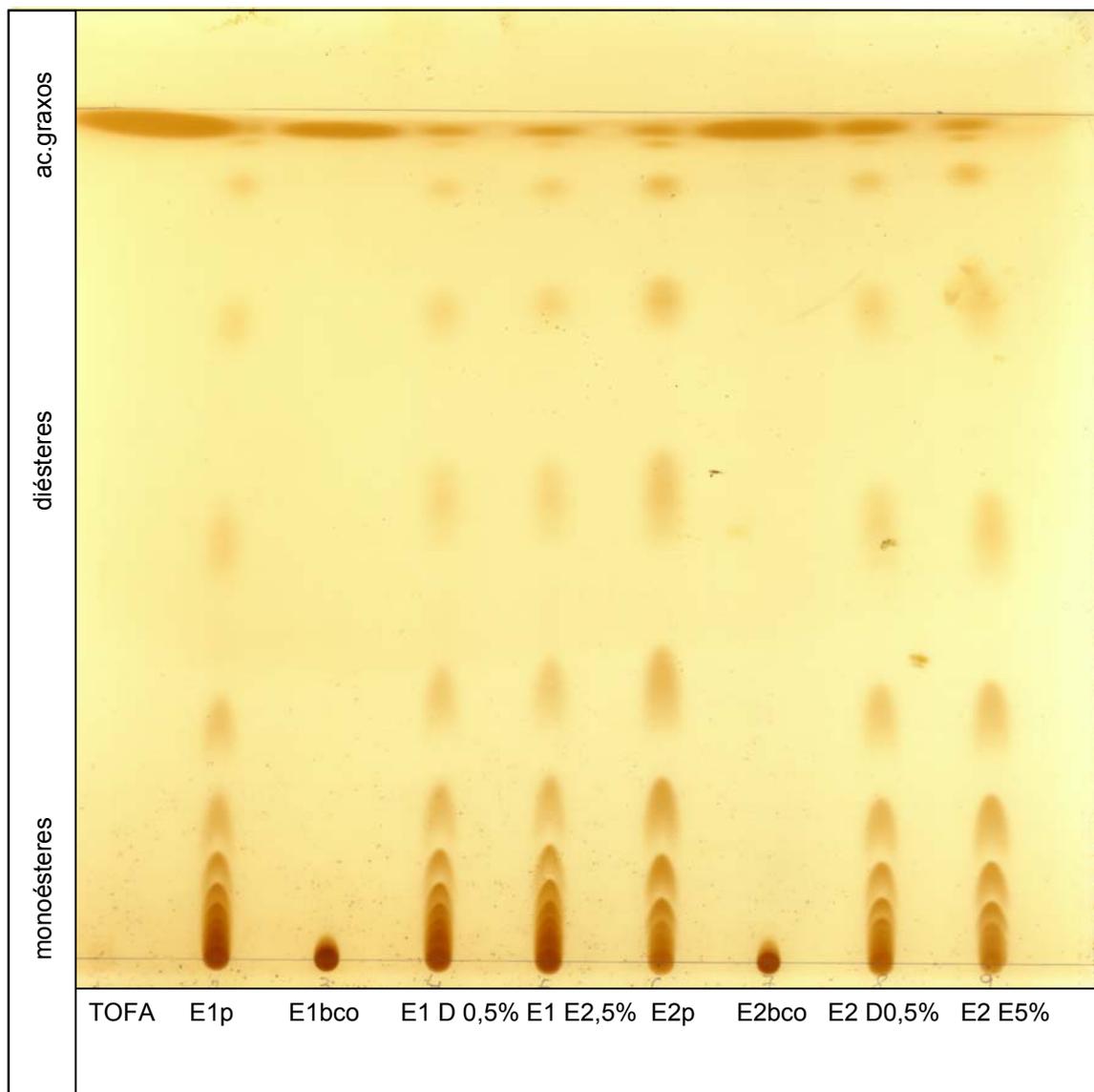
foi observadas nas amostras do Éster 2 obtidos por processo químico e enzimático, indicando a formação preferencial de diésteres

A banda na faixa de  $1715\text{cm}^{-1}$  relativo ao  $-\text{CO}-$  dos ácidos carboxílicos, foi observada nas amostras em branco e desaparece durante a reação de esterificação utilizando as enzimas D e E.

### **3.2.3 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)**

O uso da cromatografia de camada delgada após otimização da fase móvel, permitiu a separação dos ésteres formados nas reações entre ácidos graxos e polietilenoglicóis, permitindo a identificação dos ésteres obtidos por catálise enzimática, como os respectivos padrões dos ésteres obtidos por processo convencional.

Na figura 13 está apresentado a placa de camada delgada do Éster 1 e 2.



**Figura 13:** Éster 1 e 2: Cromatografia em camada delgada, fase móvel éter de petróleo: éter etílico: ácido fórmico (150:150:20), revelação com iodo. (E= éster; p=padrão; bco= branco; D= enzima D; E= enzima E)

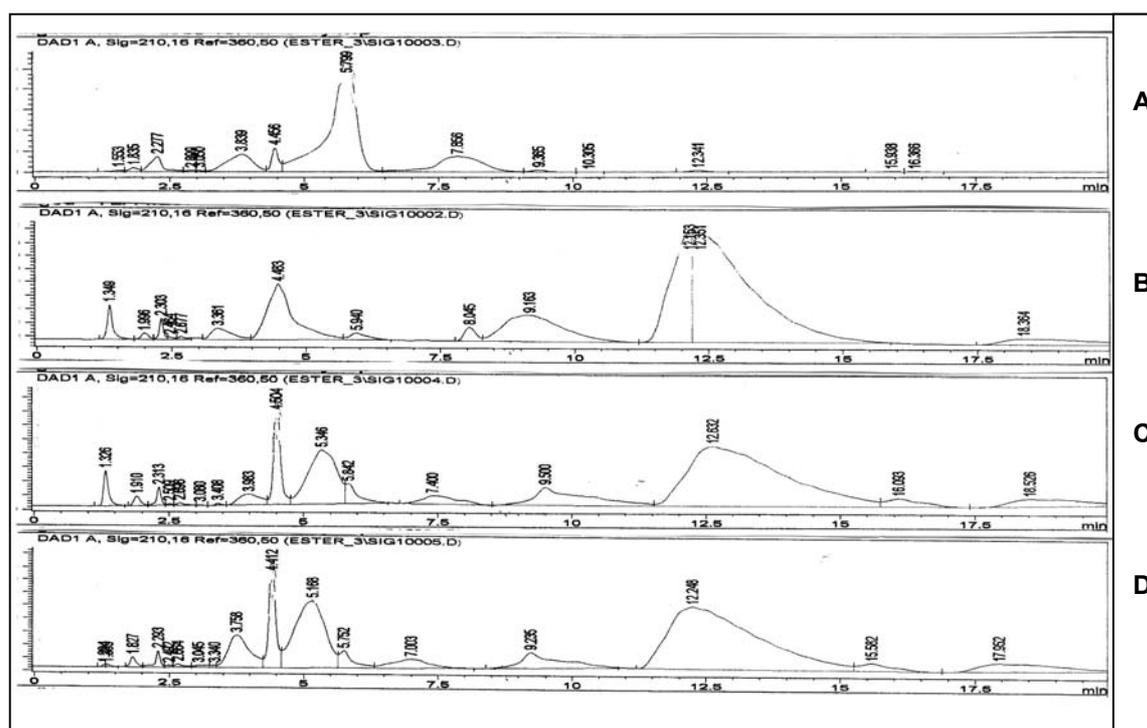
A análise da placa de camada delgada indicou para o éster 1, maior quantidade de ácido graxo na amostra referente ao produto obtido com a enzima E à 2,5% do que com a enzima D (0,5%), fato que se confirma avaliando o resultado de ácido graxo livre das mesmas amostras. A enzima E, nas condições avaliadas, indicou formação de maior quantidade de diésteres.

Quanto ao éster 2, foi observado maior quantidade de ácido graxo na amostra obtida utilizando a enzima D à 0,5%, bem como de ácido graxo na análise titulométrica. A enzima E levou a formação de maior quantidade de diésteres, quando comparado com a enzima D, nas condições dos experimentos realizados.

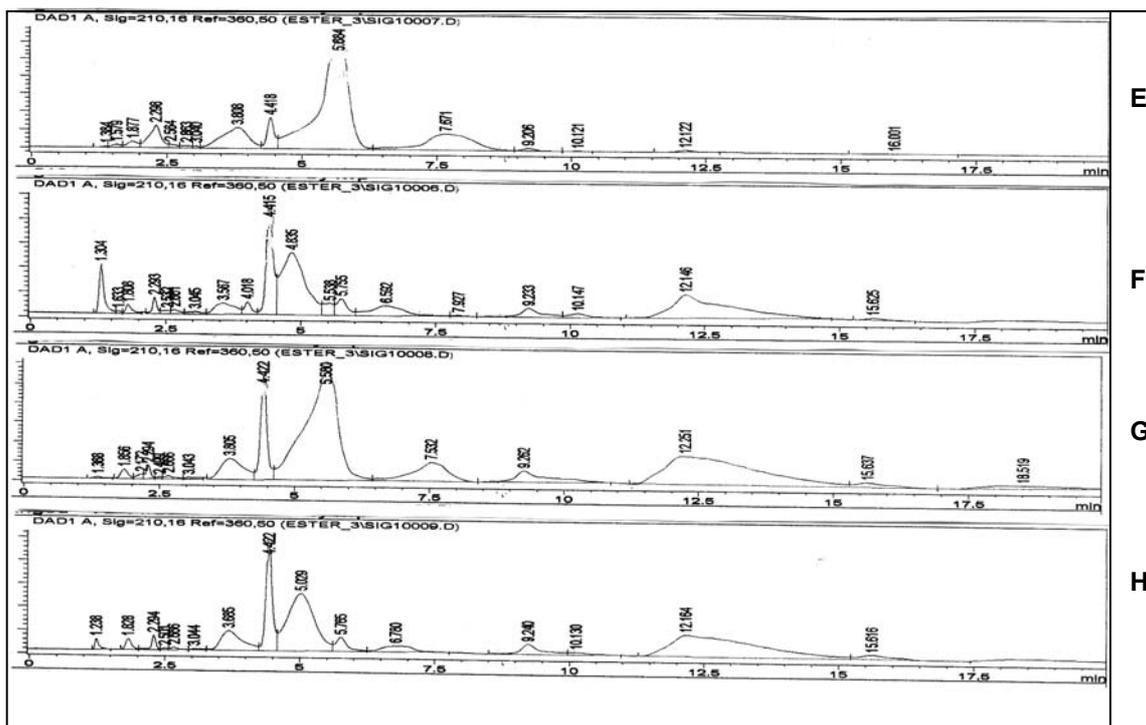
Em condições cromatográficas similares, Monteiro et al. (1996) também observou que os monoésteres apresentaram Rf inferior ao dos diésteres.

### 3.2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Os cromatogramas referente aos ésteres 1 e 2; padrão, reação em branco e com as enzimas D e E, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) estão apresentados, respectivamente, nas figuras 14 e 15.



**Figura 14:** Éster 1; cromatogramas da reação em branco (A), éster padrão - comercial (B) e produtos sintetizados com as enzimas D (C) e E (D), obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, coluna C-8 fase reversa, fase móvel acetonitrila:água (60:40v/v), fluxo 1,25mL/min e detecção 210nm.



**Figura 15:** Éster 2; cromatogramas da reação em branco (E), éster padrão - comercial (F) e produtos sintetizados com as enzimas D (G) e E (H), obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, coluna C-8 fase reversa, fase móvel acetonitrila:água (60:40v/v), fluxo 1,25mL/min e detecção 210nm.

Os percentuais dos componentes cromatografados nas condições descritas neste trabalho, presentes nos ésteres 1 e 2 obtidos por biocatálise, identificados pelo tempo de retenção e quantificado utilizando o respectivo produto comercial (padrão), estão apresentados respectivamente nas tabelas 9 e 10.

**Tabela 9:** Éster 1, percentual dos principais componentes determinados por cromatografia líquida de alta eficiência.

Componente	Padrão	Enzima D (0,5%)	Enzima E (2,5%)
Diéster A	11,05%	6,83%	6,99%
Diéster B	<1,00%	16,93%	20,06%
Monoéster A	56,31%	52,12%	51,61%

**Tabela 10:** Éster 2, percentual dos principais componentes determinados por cromatografia líquida de alta eficiência.

Componente	Padrão	Enzima D (0,5%)	Enzima E (2,5%)
Diéster A	15,07%	9,83%	13,77%
Diéster B	27,26%	<1,00%	29,09%
Monoéster A	25,11%	48,03%	35,37%

A enzima E levou a formação do diéster B, tanto no éster 1 quanto no éster 2, nas condições em que as reações de síntese foram realizadas.

A formação do diéster B com a enzima D, é menor em relação a reação na qual foi utilizado a enzima E para os ésteres 1 e 2.

Foi observado formação de menor quantidade do diéster B no éster 2, com a utilização da enzima D, sendo o percentual inferior ao encontrado no produto considerado padrão (comercial).

Os dados obtidos foram semelhantes ao relatado por Meffert (1984), sendo que os

ésteres de ácidos graxos de polióis não são monoésteres puros, mas geralmente consistem de uma mistura de 40 – 48% de monoéster, 30 – 40% de diéster e 0,2 – 9% de ácido graxo.

### **3.3 – TESTES APLICATIVOS**

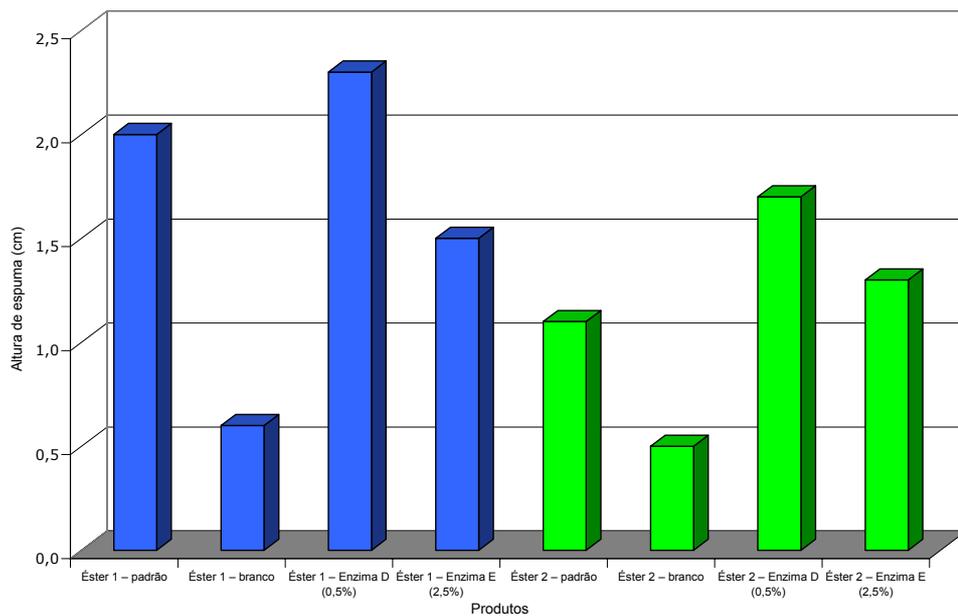
Os resultados dos testes aplicativos dos produtos obtidos com o uso de biocatalisadores comparado com os produtos da síntese com catalisador químico, baseados na dispersão em água, formação de espuma e distribuição do tamanho de partículas da emulsão aquosas dos ésteres estão apresentados a seguir.

#### **3.3.1- DISPERSÃO EM ÁGUA E FORMAÇÃO DE ESPUMA**

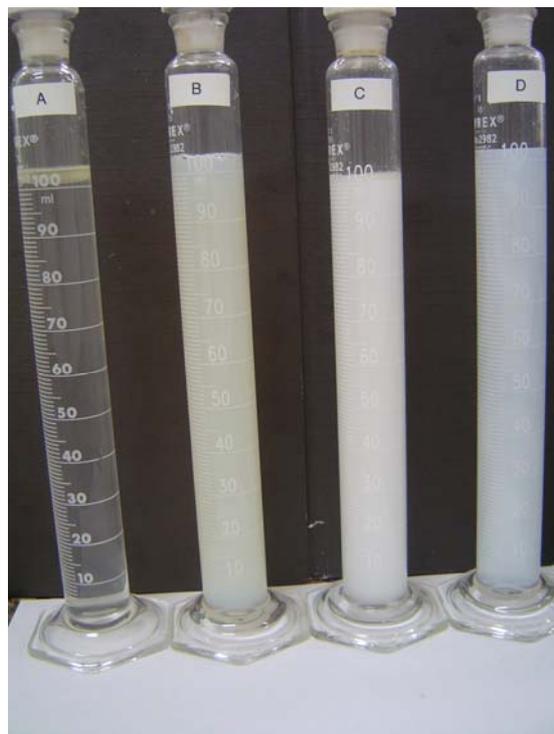
Os resultados da dispersão dos ésteres em água e persistência da espuma estão apresentados na tabela 10 e a capacidade de formação de espuma está apresentada na figura 16.

**Tabela 11:** Dispersão, persistência da espuma e estabilidade da emulsão dos ésteres 1 e 2, em água destilada e temperatura de 25° C.

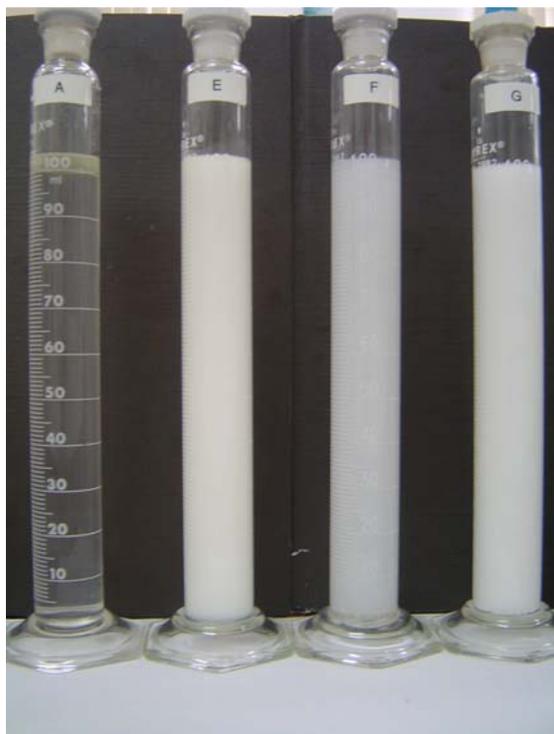
Amostra	Dispersão (2% em água)	Persistência espuma	Estabilidade da emulsão (1h)
Éster 1 – padrão	dispersa	alta	estável
Éster 1 – branco	flota	-	-
Éster 1 – Enzima D (0,5%)	dispersa	alta	estável
Éster 1 – Enzima E (2,5%)	dispersa	alta	estável
Éster 2 – padrão	dispersa	média	leve separação
Éster 2 – branco	flota	-	-
Éster 2 – Enzima D (0,5%)	dispersa	alta	estável
Éster 2 – Enzima E (2,5%)	dispersa	média	estável



**Figura 16:** Capacidade de formação de espuma dos ésteres em água.



**Figura 17:** Avaliação da estabilidade da emulsão do éster 1 em água. (A) TOFA; (B) padrão; (C) enzima D (0,5%); (D) enzima E (2,5%)



**Figura 18:** Avaliação da estabilidade da emulsão do éster 2 em água. (A) TOFA; (E) padrão; (F) enzima D (0,5%); (G) enzima E (2,5%)

Foi observado maior tendência de formação de espuma nos produtos com maior concentração de monoésteres. Os resultados obtidos estão de acordo com o citado por Maag (1984), indicando que os monoésteres possuem capacidade de emulsificação superior aos diésteres.

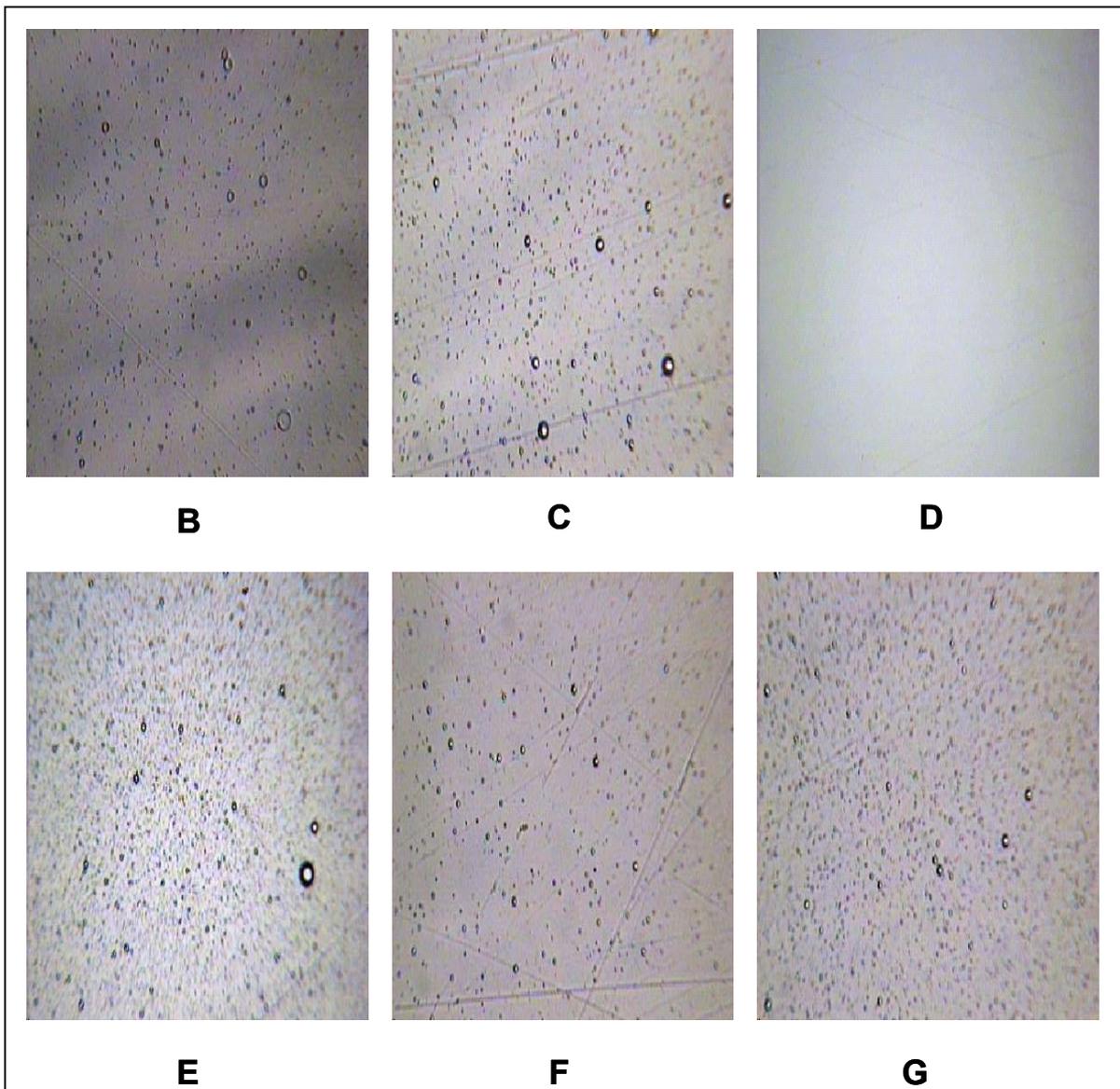
### 3.3.2- DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS

Os resultados da distribuição do tamanho de partículas da dispersão dos ésteres em água, obtidos com o Horiba LA-300 estão apresentados na tabela 11 e as fotomicrografias das dispersões na figura 20:

**Tabela 13:** Distribuição do tamanho de partículas da dispersão dos ésteres em água, obtida no equipamento HORIBA LA-300, “princípio “laser scattering”, valores obtidos da média de duplicata.

Identificação	Amostra	Tamanho médio ( $\mu\text{m}$ )	Desvio-padrão
B	Ester 1-padrão	10,877	4,513
C	Ester 1 Enzima D (0,5%)	10,135	9,825
D	Ester 1 Enzima E (2,5%)	0,348	0,124
E	Ester 2 – padrão	10,868	12,622
F	Ester 2 Enzima D (0,5%)	6,378	4,810
G	Éster 2 Enzima E (2,5%)	7,227	10,185

Foi observado que o tamanho médio de partícula dos ésteres analisados estão próximas, com exceção do éster 1 obtido com o uso da enzima E, na qual foi observado a formação de microemulsão no teste visual (figura 17, amostra D) e o tamanho médio da distribuição de partícula de  $0,348\mu\text{m}$ . Este valor de tamanho de partícula, no que se refere a microemulsão, foi citado por El-Laithy (2003), não havendo a formação de fase turva.



**Figura 20:** Fotomicrografias das dispersões dos ésteres em água, obtidas por microscopia ótica, aumento de 100X. Éster 1 em água (B) padrão; (C) enzima D (0,5%); (D) enzima E (2,5%). Éster 2 em água (E) padrão; (F) enzima D (0,5%); (G) enzima E (2,5%)

A análise microscópica das dispersões dos ésteres em água destilada, permitiu a visualização de micelas, exceto na amostra D, referente ao éster 1, sintetizado com a enzima E (2,5%) à 70°.

### 3.4- PROCESSO PARA OBTENÇÃO DOS ÉSTERES EM ESCALA INDUSTRIAL

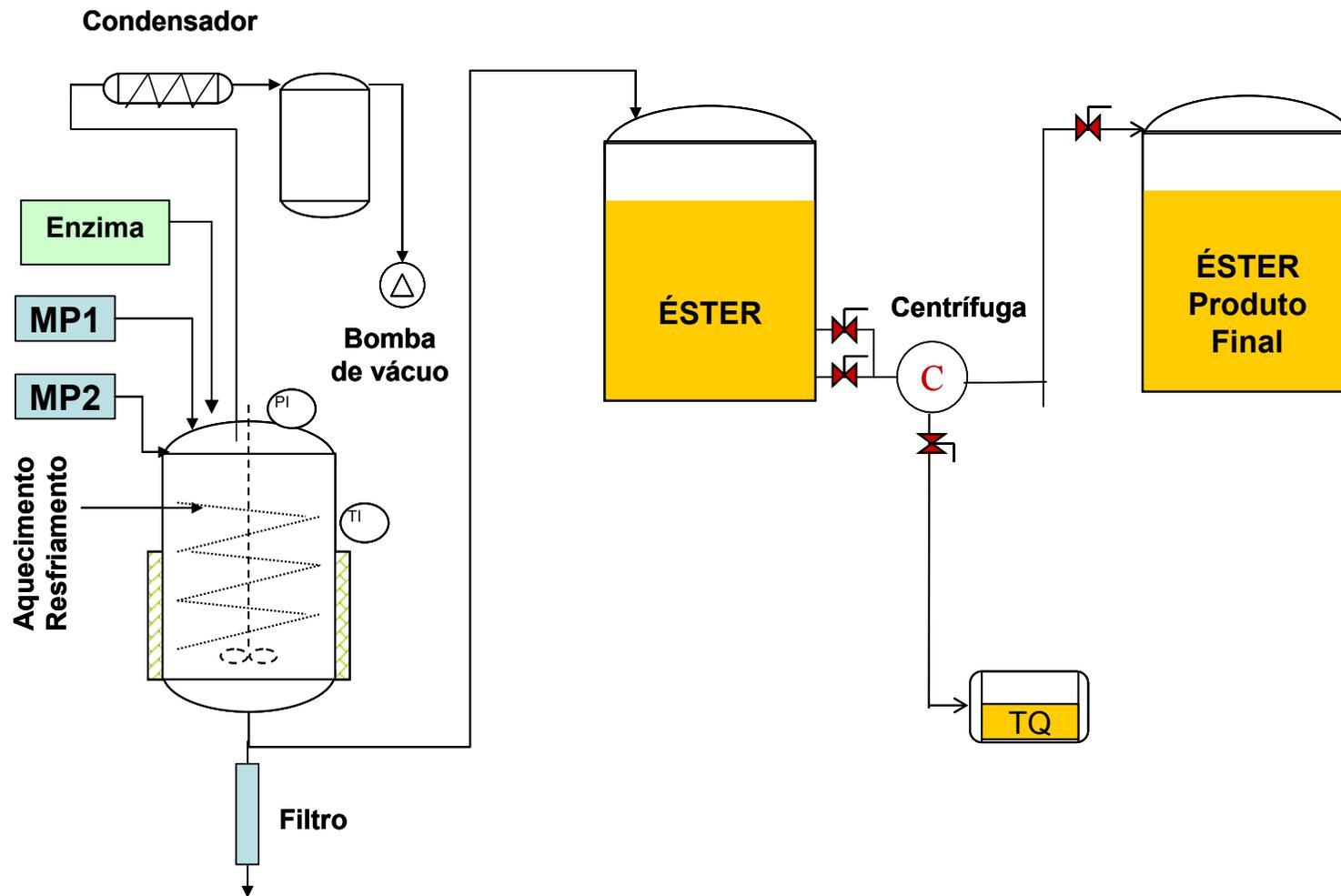
Baseado na avaliação dos principais fatores que podem impactar a manufatura dos ésteres 1 e 2 em escala industrial foi proposto um processo que está apresentado no fluxograma da figura 19.

Os fatores avaliados foram agitação, aquecimento, destilação, filtração ou centrifugação, sendo que o aquecimento foi considerado crítico, devido a alta temperatura necessária a síntese dos ésteres 1 e 2 por processo químico, a qual varia de 140 a 250°C, para estes ésteres, dependendo do catalisador químico utilizado. Geralmente, com o uso de catalisadores ácido, a temperatura fica na faixa de 140 – 150°C, porém a coloração do produto final é bastante escura, devido principalmente ao processo oxidativo.

O processo proposto para a obtenção dos ésteres 1 e 2 utilizando, respectivamente a enzima D (0,5%) e enzima E (2,5%) em escala piloto/industrial, consistiu na adição do polietilenoglicol 400 e o ácido graxo de “tall oil” ao vaso de processo, aquecimento com agitação na faixa de 70-75°C. A enzima foi adicionada e o conteúdo do vaso de processo mantido à 70 – 75°C e pressão atmosférica. A esterificação acompanhada pela determinação de ácidos graxos através de titulação com solução de hidróxido de sódio e fenolftaleína como indicador.

Quando o teor de ácido graxo atingiu o limite especificado, máximo de 4,0% para o éster 1 e máximo de 8,0% para o éster 2, foi aplicado vácuo ao vaso de processo para remoção total da água residual.

Após resfriamento, para o éster 1, o produto foi centrifugado e o resíduo contendo enzima separado para reutilização, para o éster 2, a enzima foi recuperada por filtração.



**Figura 20:** Fluxograma proposto para síntese de ésteres de ácidos graxos utilizando lipase como biocatalisador na temperatura de 70°C, durante 10 horas de reação. (MP1= ácidos graxos de “tall oil “, MP2= PEG400, TQ= tanque)

#### 4- CONCLUSÕES

Os resultados comprovam que as enzimas A (resinase), D e E (lipases), podem ser utilizadas com biocatalisadores para obtenção de ésteres de ácidos graxos e polietilenoglicol de peso molecular 400, como rota alternativa ao processo químico tradicional.

Para cada enzima e para cada éster existe uma temperatura mais indicada para a conversão do ácido graxo.

O controle do tempo de reação é importante, visto que após determinado período de tempo ocorre hidrólise do éster formado, sendo que a hidrólise varia conforme a enzima utilizada.

O Éster 2 necessita de tempo de reação superior ao Éster 1 para atingir o % de ácido graxo livre especificado para o produto obtido por via química.

Nas condições avaliadas a enzima que apresentou maior percentual de esterificação para o éster 1 foi a enzima D a 0,5% e para o Éster 2, a enzima E na concentração de 2,5%. A temperatura melhor temperatura para a esterificação foi de 70°C para ambos os produtos.

Os resultados indicaram que a espectrometria no infravermelho com uso do acessório de reflectância horizontal atenuada (HATR), permite auxiliar na identificação dos ésteres obtidos por catálise enzimática e os respectivos ésteres padrão (comerciais), obtidos por com catalisador químico e temperaturas elevadas.

O uso do HATR possibilitou diferenciar os três ésteres entre si, sendo que no éster 2; a banda na faixa de  $3650 - 3200\text{cm}^{-1}$ , permitiu concluir que houve a formação de diéster na reação de esterificação dos ácidos graxos de "tall oil" com polietilenoglicol, enquanto que no éster 1, a análise dos espectros nesta faixa de

freqüência, evidencia a formação de monoésteres.

Os resultados obtidos nas análises por cromatografia em camada delgada, permitiram concluir a identidade dos ésteres (amostras finais) obtidos por biocatálise comparada com os padrões (amostras comerciais) dos respectivos ésteres obtidos por processo convencional.

O processo desenvolvido para síntese dos ésteres de ácidos graxos utilizando lipases como biocatalisadores apresentou variância inferior ao processo químico, indicando uma maior estabilidade do mesmo. Para o éster 1 a variância foi menor para a enzima D, porém a diferença entre a variância obtida com a enzima E, não foi considerada significativa no que se refere a variação de processo. Para o éster 2 a enzima E apresentou a menor variação.

Através da análise dos resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, das amostras finais dos ésteres 1 e 2 e do percentual de ácidos graxos durante as reações de esterificação utilizando biocatalisador, podemos concluir que as enzimas mais adequadas para a obtenção dos ésteres 1 e 2, nas condições avaliadas no presente trabalho, são respectivamente, a enzima D (0,5%) e enzima E (2,5%).

Baseado nos resultados dos testes de dispersão em água, foi verificado que as características da emulsão formada são muito similares para o éster 2 obtido com a enzima D (0,5%) e o éster 1, produzido por processo químico (padrão); sendo observado boa correlação com o perfil cromatográfico obtido por CCD e CLAE. Isto permite afirmar que a enzima D, nas condições utilizadas no estudo, foi mais específica para a formação de monoéster do que diéster, sendo que o monoéster possui melhor capacidade de emulsificação.

A dispersão do éster 1 obtido com o uso da enzima E (2,5%), nas condições dos experimentos realizados, levou a formação de microemulsão; sendo esta uma característica interessante para aplicações industriais e farmacêuticas.

Os resultados indicam que o éster 1 obtido com a enzima D e o éster 2 obtido com

a enzima E, apresentaram resultados semelhantes aos respectivos padrões, nos aspectos de dispersão de água, formação e persistência da espuma.

Os dados obtidos das sínteses realizadas em laboratório permitiram a elaboração do fluxograma para a manufatura em escala piloto/industrial dos ésteres de ácidos graxos catalisado por enzimas, sendo observado a redução no consumo de energia, uma vez que foi obtido alto rendimento utilizando enzima como biocatalisador e temperatura de 70°C.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTRO, H.F.. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, 18 (6):544 - 554, 1995.

CASTRO, H.F., MENDES, A.A., SANTOS, J.C., AGUIAR, C.L.. Modificação de oleos e gorduras por biotransformação. **Química nova**, 27(1):146-156, 2004.

BAYADA, A., LAWRENCE, G., MAEDER, M., MOLLOY, K.. ATR-IR spectroscopy for the investigation of solution reaction kinetics. *Applied spectroscopy*. 40 (12), 1789-1792, 1995.

ERGAN, F., TRANI, M.. Effect of lipase specificity on triglyceride synthesis. **Biotechnol. Letters**, 13(1):19-24, 1991.

EL-LAITHY, H.M.. Preparation and physicochemical characterization of dioctyl sodium sulfosuccinate (Aerosol OT) microemulsion for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech.**, 4(1):1-10, 2003.

GIOIELLI, L.A., PITOMBO, R.N.M., VITOLO, M., BARUFALDI, R., OLIVERIA, M.N., MORENO, P.C.. Acidolysis of babassu fat catalysed by immobilized lipase. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, 71 (6):579-582, 1994.

GANDHI, N.N., PATIL, N.S., SAWANT, S.B., JOSHI, J.B.. Lipase-catalyzed

esterification. **CATAL. REV.-SCI. ENG.**,42(4):439-480, 2000.

GORMAN, L.A.S., DORDICK, J.S.. Organic solvents strip water off enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, 39:392-397, 1992.

JANSSEN, G.G., HAAS, M.J.. Lipase-catalyzed synthesis of oleic acid esters of polyethylene glycol 400. **Biotechnol. Letters**, 16(2):163-168, 1994.

LEITE, F.. Desvio de uma medida **In: Validação em análise química**. Ed. Átomo. 3.ed.. 1998

LEITE, F.. Precisão e Exatidão **In: Validação em análise química**. Ed. Átomo. 3.ed.. 1998

MAAG,H.. Fatty acid derivatives: important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 61(2):259-267, 1984.

MERFFERT,A.. Technical uses of fatty acid esters. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 61(2):255-258, 1984

MONTEIRO, J.B., NINOW, J.L., NASCIMENTO, M.G.. Obtenção de glicerídeos parciais via esterificação do ácido láurico com o glicerol catalisada por lipase, **Seminar on enzymatic hydrolysis of biomass proceedings**, 1996.

PASTORE, G. M., PARK, Y. K. Produção e caracterização bioquímica de monoacilglicerol lipase microbiana e aplicação de lipases na hidrólise e esterificação enzimática. **Tese de doutorado em Ciência de Alimentos**, FEA, UNICAMP, Campinas, 1992.

ROBERTS,S.M., TURNER, N.J., WILLETS, A.J., TURNER, M.K.. Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms, **Cambridge University Press**, 1995.



## CAPÍTULO 6

### PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE ÉSTERES DE ÁCIDO ESTEÁRICO COM POLIGLICÓIS UTILIZANDO LIPASES E ESTERASES COMO BIOCATALISADORES E AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIESPUMANTE DOS PRODUTOS OBTIDOS

Luiz W. B. PACE; Gláucia M. PASTORE

#### RESUMO

A formação de espuma é uma característica de alguns processos, sendo que seu controle é importante para evitar problemas no processo e perda de qualidade no produto final.

O estearato de poliglicol é um ativo que apresenta boa performance no controle da espuma, seja sozinho ou formulado com outros ativos.

Baseado na necessidade de produtos de excelente qualidade e com processo de obtenção seguro e tecnicamente viável, foi realizado um estudo para desenvolver um processo reacional para a obtenção do estearato de poliglicol utilizando enzimas (lipases e esterases) como biocatalisadores.

Neste estudo foi observado que a enzima (I), à 75° C apresentou rendimento quanto a esterificação superior a 74% com 10 horas de reação.

A performance no controle de espuma do produto obtido enzimaticamente comparado, com o produto obtido por processo químico (catalisador ácido e alta temperatura), foi avaliada em laboratório utilizando o Fermenteste.

O produto obtido com a enzima (I) apresentou performance superior ao produto obtido pelo processo químico.

**Palavras-chaves:** éster de ácido esteárico, enzimas, antiespumante.

## **SUMMARY**

Foam formation is characteristic of some processes, and its control is important in order to avoid problems during the process and loss of quality in the final product.

Polyglycol estearate is an active, which presents good performance in controlling foam, alone or formulated with other actives.

Based on the need to obtain excellent quality products using a safe and technically viable obtainment process, a study was carried out to develop a reaction process to obtain polyglycol estearate using enzymes (lipases and esterases) as biocatalysts.

It was observed that enzyme (I) at 75° C presented an esterification efficiency higher than 74% after 10 hours of reaction.

Foam control performance of the product obtained using enzymes in comparison to the product obtained using the chemical process (acid catalyst and high temperature) was evaluated at the laboratory using Fermenteste.

The product obtained using enzyme (I) had a better performance if compared to the product obtained by chemical process.

**Key Words:** estearic acid ester, enzymes, defoamer.

## 1- INTRODUÇÃO

Os estearatos são os ésteres mais importantes do etilenoglicol, sendo de grande utilização em cosméticos. Outras áreas de aplicação incluem lubrificantes e formulação de antiespumantes (Garret, 1993).

Antiespumante é um produto que possui uma combinação de partículas sólidas hidrófobas (sílica, cera, etc) e óleo de silicone. A esta mistura são adicionados outros componentes, para facilitar o processamento e controlar qualquer efeito colateral indesejável. A eficácia dos compostos antiespumantes se deve ao fato da sua tensão superficial ser sempre menor que a da parede das bolhas de espuma (Mudaly, 2004)

As gotículas de antiespumante atravessam um ciclo de 5 fases. Uma gotícula de antiespumante que rompe a parede de uma bolha de espuma fica disponível novamente para o ciclo seguinte. Contudo, como uma pequena quantidade das gotículas do antiespumante é perdida durante cada ciclo, o produto irá gradualmente perdendo sua eficácia (Mudaly, 2004)

Espuma é uma das oito classes dos sistemas coloidais, é um gás disperso em um líquido, sendo que o gás é normalmente o ar ou CO<sub>2</sub> liberado e o líquido é a água.

Como um gás presente em um líquido puro não espuma, é necessário para se ter espuma um terceiro componente: um surfactante ou proteínas.

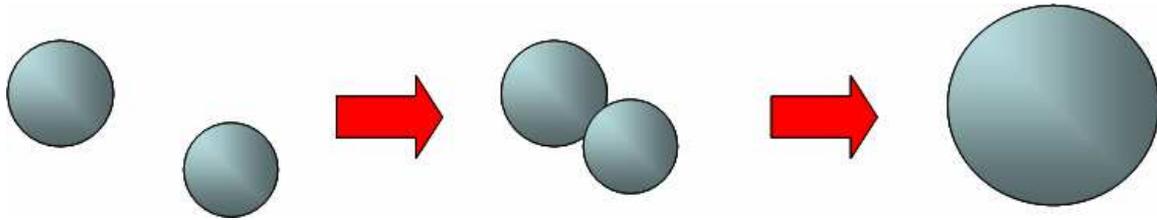
Os surfactantes são compostos por moléculas que possuem duas polaridades: solúvel e não solúvel em água.

Essas moléculas se organizam na interface ar-água para satisfazer as duas polaridades da molécula.

Os antiespumantes ou desespumantes agem sobre as microbolhas formando bolhas maiores. Essas bolhas ascendem à superfície mais rapidamente retirando

o ar da massa (Mudaly, 2004).

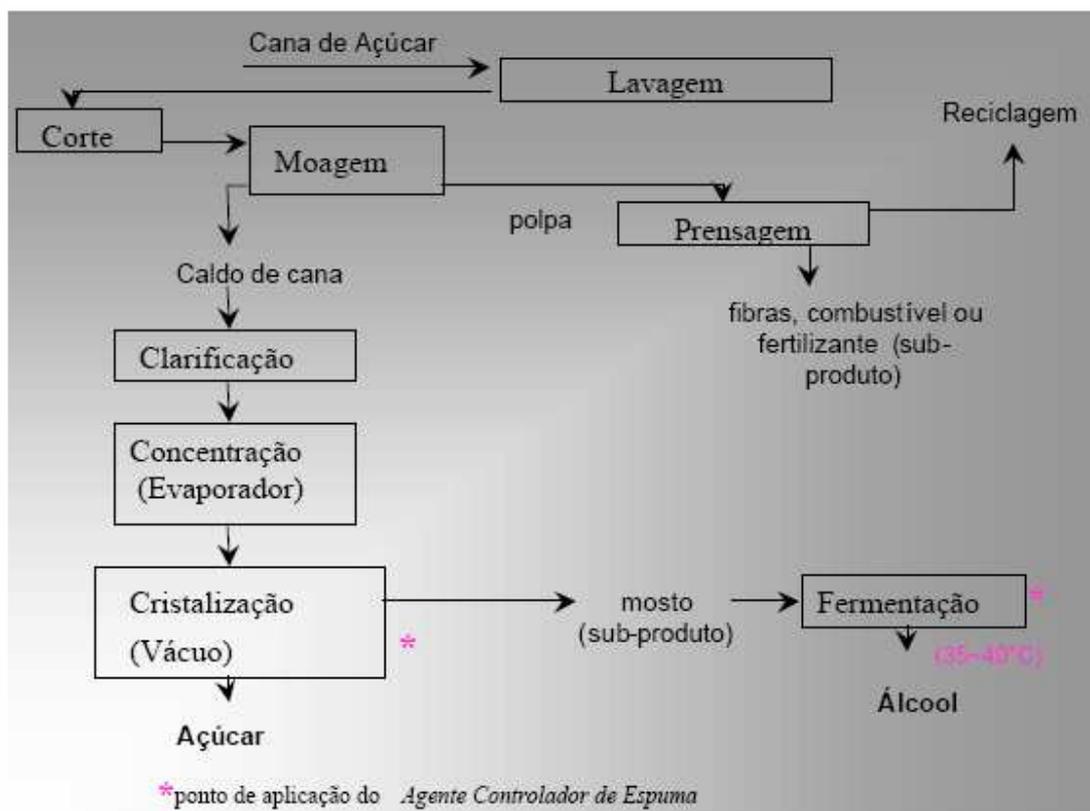
A seguir apresentamos um esquema a ação dos antiespumantes, no qual bolhas menores são agrupadas, formando bolhas maiores que são eliminadas.



Os ésteres de ácido esteárico com polietilenoglicol são excelentes compostos com ação antiespumantes e podem ser sintetizados quimicamente à altas temperaturas e com uso catalisadores ácidos, porém pode haver a formação de subprodutos indesejáveis decorrentes principalmente de oxidação, levando a obtenção de produtos com coloração escura e turva. Ésteres de ácido graxo, incluindo monoglicerídeo e diglicerídeos de ácidos graxos são obtidos por glicerínólise dos triglicerídeos. Esta reação ocorre com excesso de glicerol e temperaturas de 200 – 250°C, sendo esta reação geralmente realizada em atmosfera de um gás inerte, principalmente na presença de óleos insaturados (Maag, 1984).

Os ésteres obtidos da reação de ácidos graxos e poliglicóis de alto peso molecular podem ser utilizados como antiespumantes nas indústrias de alimentos, usinas de açúcar e álcool e demais indústrias especialidades químicas.

No processo de produção de álcool e açúcar, estes produtos à base de poliglicóis são aplicados respectivamente na dorna de fermentação e na cristalização, conforme esquema abaixo:



Fonte: Catálogo – Poliglicóis e agentes controladores de espuma - Dow (2002).

A esterificação de ácidos graxos com glicerol, em diferentes sistemas reacionais e com diversas enzimas, tem sido estudada por vários autores (Hayes, 1992). Neste trabalho estudamos a esterificação do ácido esteárico com poliglicóis de alto peso molecular.

Atualmente existem lipases que são termoestáveis e ativas na faixa de 30 a 70°C, sendo encontradas na forma livres e imobilizadas (Monteiro, 1996). As enzimas capazes de realizar este tipo de reação são as lipases pertencentes à classe das hidrolases (EC 3.1.1.3), atuando nas transformações na qual o substrato não é solúvel em água, uma característica marcante desta enzima, diferenciando-as das esterases na qual o substrato é solúvel em água. A ativação interfacial distingue as esterases das lipases, visto que somente foi observado este fenômeno para as lipases (Prazeres, 2006).

Para que o processo biocatalítico inicie, é necessário um grau de hidratação de 10 a 12%, variando de acordo com a hidrofobicidade dos reagentes, dos produtos e do solvente utilizados. Geralmente, na síntese de ésteres, não é necessário o ajuste prévio da quantidade de água, visto que ocorre formação de água na reação de esterificação (Monteiro et al. 1996).

As lipases catalisam a reação de hidrólise de triacilgliceróis na interface óleo-água e são amplamente encontradas na natureza. Estas enzimas possuem grande versatilidade de propriedades tais como resistência a variação de pH, estabilidade térmica, resistência a diferentes solventes orgânicos, especificidade, regioseletividade e estereosseletividades (Taipa, 1992)

As lipases possuem a capacidade de permanecerem ativas em meios com baixa concentração de água ou anidros, sendo que estas condições permitem a reação reversa, possibilitando o uso das lipases como catalisador das reações de esterificação e transesterificação (Roberts, 1995) Podem também catalisar reações de interesterificação de óleos e gorduras, obtendo-se produtos que não são formados pelos métodos químicos convencionais (Gioielli et al., 1994).

## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1-MATERIAL**

Como substrato foi utilizado mistura de ácido esteárico destilado adquirido da Ceralit S/A e poliglicóis, identificados como A e B e com as características apresentadas na tabela 1 (adquiridos da Dow Química):

**Tabela 1:** Características dos poliglicóis utilizados na síntese dos ésteres.

Poliglicol	Descrição
A	poliglicol de peso molecular médio de 2350, copolímero de bloco, contendo 30% de EO, completamente miscível em água, formando gel.
B	poliglicol de peso molecular médio de 2000, insolúvel em água.

Como biocatalisadores foram utilizadas preparações comerciais das enzimas apresentadas na tabela 2, com o valor de atividade fornecida pelo fabricante. A medida da atividade lipolítica foi medida em Kilograma de unidades de lipase, sendo que um KLU é a quantidade de enzima capaz de liberar um milimol de ácido butírico por minuto de uma emulsão de tributirina a 30°C e pH de 7,0.

U= unidades

LU= unidades de lipase

IUN = unidades de interesterificação.

**Tabela 2:** Preparações enzimáticas comerciais utilizadas na síntese dos ésteres

Enzimas	Descrição	Atividade enzimática
A	Lipase - <i>Aspergillus</i> (organismo de produção)	100KLU/g
B	Lipase – <i>Aspergillus oryzae</i> (organismo de produção)	100KLU/g
C	Lipase – <i>Aspergillus oryzae</i> (organismo de produção); <i>Thermomyces lanuginosus</i> (organismo doador)	100KLU/g
D	Lipase – <i>Aspergillus niger</i> (organismo de produção); <i>Candida antarctica</i> (organismo doador)	5000LU/g
E	Lipase imobilizada – <i>Aspergillus oryzae</i> (organismo de produção); <i>Rhizomucor miehei</i> (organismo doador)	150IUN/g
F	Lipase alcalina, líquida, <i>Aspergillus</i> geneticamente modificado	100KLU/g
G	Lipase líquida, <i>Candida rugosa</i> .	20000U/g
H	Resinase termoestável, líquida <i>Aspergillus</i> geneticamente modificado	50KLU/g
I	Esterase, líquida – <i>Aspergillus oryzae</i> (organismo de produção)	15KLU/g

Reagentes para análises químicas: hidróxido de sódio 0,05N, acetona, etanol, éter de petróleo, éter etílico, ácido fórmico, acetonitrila grau cromatográfico e indicador de fenolftaleína em solução etanólica a 1% e iodo sublimado.

Frascos para reação: flacker capacidade de 300mL

Cuba cromatográfica

Placas de sílica gel.

Transfepettor 0 – 10 $\mu$ L

## **2.2- EQUIPAMENTOS**

Para a obtenção os ésteres foi utilizado um agitador orbital (tipo “Shaker”) da empresa Tecnal Ltda, com temperatura e velocidade controladas.

Para as titulações foi utilizado bureta digital e titulador Karl Fisher, Mettler modelo D-18, para a deteminação de água.

Para a obtenção dos espectros das amostras na região do infravermelho médio foi utilizado um espectrofotômetro com transformada de Fourier da Perkin Elmer, modelo Spectrum One e acessório de reflectância horizontal atenuada (HATR) com célula de ZnSe. A comparação entre os espectros foi realizada através do “software Spectrum” da Perkin Elmer, sendo obtido os valores de correlação e comparação das bandas espectrais.

Para a separação/identificação dos componentes das amostras dos ésteres foram obtidos cromatogramas em placas de sílica Gel 60 da marca Merck, sendo a corrida cromatográfica feita em cubas de vidro, sendo utilizado pipeta tipo Transfepettor de volume variável, para aplicação das soluções dos ésteres.

A avaliação da eficiência dos produtos quanto a ação antiespumante foi realizada através do equipamento Fermenteste da empresa Tecnal Ltda.

## 2.3- CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Foi preparado quantidade suficiente de substrato para as reações, fundindo ácido esteárico comercial com poliglicol A na proporção de 11:89 (em massa), a temperatura de 80°C, visando a obtenção do Éster 3 e fundindo ácido esteárico comercial com poliglicol B na proporção de 12:88 (em massa), visando a obtenção do Éster 4.

A obtenção dos ésteres foi baseada no método descrito por Janssen & Hass (1994), sendo alíquotas de 100g de cada substrato transferidas, separadamente para os frascos de reação e adicionando as enzimas a serem avaliadas a cada um. A concentração das enzimas a serem avaliadas foi de 5,0% sobre o total do substrato.

Os frascos foram colocados no “Saker” com agitação orbital, temperatura controlada em 75°C e agitação a 200rpm. A reação foi acompanhada, através da determinação da quantidade de ácidos graxos livres com o decorrer do tempo, através de titulação com hidróxido de sódio 0,05N e fenolftaleína como indicador, baseado no método descrito por Pastore (1992).

Os resultados foram expressos em % de ácidos graxos livres utilizando o peso molecular do ácido esteárico e % de esterificação durante o tempo de reação planejado.

Para o cálculo da percentagem de esterificação foi utilizado a seguinte fórmula:

$$\% \text{esterificação} = \frac{(\% \text{ácido graxo inicial} - \% \text{ácido graxo final})}{\% \text{ácido graxo inicial}} \times 100$$

Com o procedimento descrito acima, foi realizado a seleção das enzimas.

Baseado na enzima que apresentou melhor performance foi avaliado a esterificação com:

- diferentes concentração da enzima.
- modo de adição da enzima
- uso de peneira molecular de 4 angstrom
- enzima imobilizada em Celite. Para a imobilização a preparação enzimática I, pois depositada sobre o agente imobilizante, e submetida a evaporação sob vácuo.
- adição da quantidade do ácido esteárico dividida em três frações
- validação do processo, realizando a reação em triplicata.

## 2.4- CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS

Os produtos obtidos da esterificação foram caracterizados através da coloração, espectrometria no infravermelho (FT-IR) e perfil cromatográfico em placa de sílica Gel 60 (CCD). Os produtos obtidos por biocatálise foram comparados com os respectivos produtos obtidos por processo químico (comerciais).

- Espectrometria no infravermelho (FT-IR)

Amostra final da síntese enzimática de cada éster foi analisada por espectrometria no infravermelho, sem preparação prévia, através de uma metodologia baseada no método descrito por Bayada et al. (1995).

Para a correção de fundo (background) foi utilizado espectro do ar.

Para obtenção dos espectros na região do infravermelho foram acumuladas 10 corridas (scan) na faixa de  $4000 - 625\text{cm}^{-1}$  e resolução de  $4\text{cm}^{-1}$ ; ambiente com temperatura controlada entre  $20^\circ - 25^\circ\text{C}$  e umidade de 45 - 50%. Os espectros obtidos em transmitância e na segunda derivada foram utilizados para comparação com os padrões de cada éster.

- Cromatografia de camada delgada (CCD)

O método para cromatografia em camada delgada (CCD) foi adaptado dos métodos descritos por Pastore (1992), Janssen & Haas (1994) e Monteiro et al. (1996).

Amostra final da síntese enzimática de cada éster foi diluída em acetona na proporção 1:5.

Utilizando uma pipeta Transfepettor, foi aplicado 2 $\mu$ L da diluição na placa de sílica Gel 60, previamente ativada em estufa a 105°C.

Após cada aplicação, procedeu-se a evaporação do solvente, utilizando um secador.

A placa foi submetida a corrida cromatográfica em cuba de vidro previamente saturada com a fase móvel composta de éter de petróleo: éter etílico: ácido fórmico (150:150:20).

Finalizado a corrida, a placa foi levada a estufa à 105°C para evaporação completa da fase móvel.

A placa foi levada a uma cuba cromatográfica contendo iodo sublimado para a revelação dos ésteres.

## **2.5- TESTES APLICATIVOS**

A eficiência dos produtos obtidos em relação a ação como antiespumante para processo fermentativo, foi avaliada em comparação com o éster obtido pro processo químico.

Foi preparado quantidade suficiente de caldo com mel para a avaliação dos antiespumantes.

Uma quantidade do material foi adicionado a célula do Fermenteste e iniciado o borbulhamento de ar, na vazão de 10L/minuto.

Quando o nível da espuma atingiu a marca de 100 na célula foi adicionado 20 $\mu$ L do produto a ser avaliado.

O tempo foi cronometrado com cronômetro digital até 20 minutos, sendo que quando a espuma atingiu a marca de 100, nova dosagem de produto foi realizada.

A eficiência do produto foi avaliada com base na quantidade de produto necessário para controlar a espuma e na quebra da mesma, durante o tempo de 20 minutos



**Foto:** Sistema avaliação da eficiência de antiespumantes para fermentação (Fermenteste).

## **2.6- PROCESSO PARA OBTENÇÃO DOS ÉSTERES EM ESCALA INDUSTRIAL**

O processo para a obtenção de ésteres em escala industrial utilizando biocatalisadores, foi proposto baseado nos resultados obtidos nos testes em laboratório e em planta piloto e dos dados de obtenção dos ésteres pelo processo químico.

Para a elaboração do processo, foram levantados os principais aspectos que impactam a manufatura do produto em escala industrial e classificados como crítico e não crítico.

## **3- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 – ACOMPANHAMENTO DAS ESTERIFICAÇÕES**

Os resultados do acompanhamento das reações de esterificação, através do percentual de ácidos graxos livres obtidos para as enzimas selecionadas, na temperatura de 75°C e tempos de reação determinados, obtidos por titulometria, para o ésteres 3 e 4 estão apresentadas a seguir.

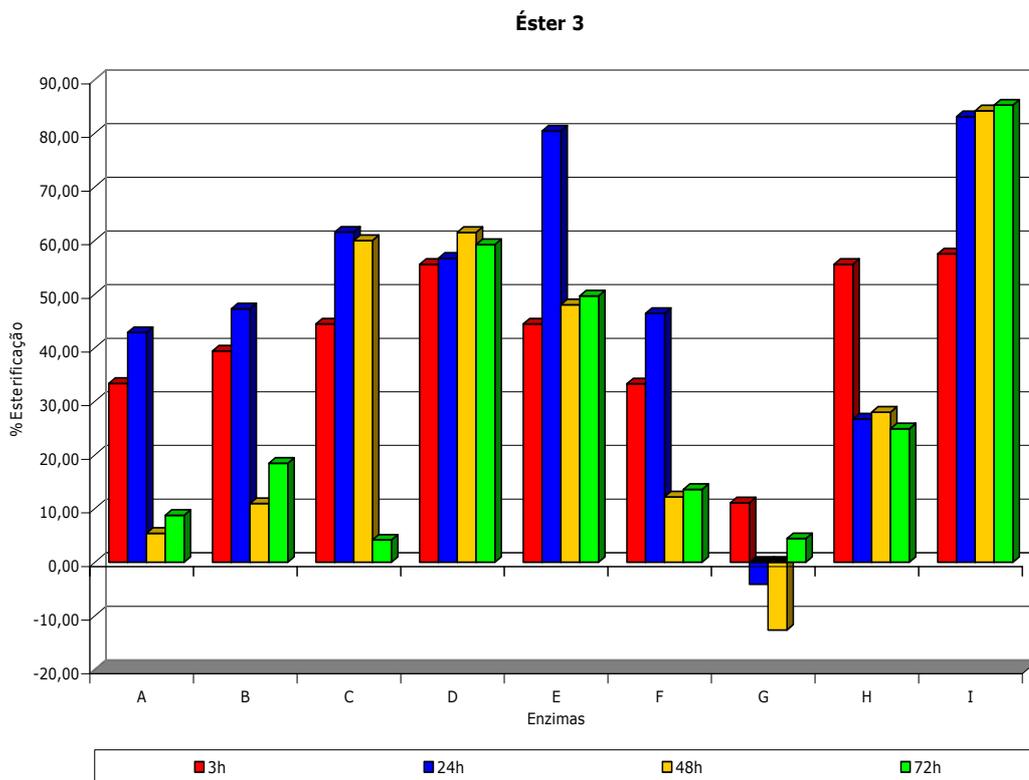
#### **3.1.1- SELEÇÃO DAS ENZIMAS PARA O ÉSTER 3**

Os resultados do percentual de ácidos graxos livres obtidos para a enzimas avaliadas, na temperatura de 75°C e tempos de reação de 3, 24, 48 e 72 horas, para o Éster 3, estão apresentados na tabela 3.

**Tabela 3:** Éster 3 - Percentual de ácidos graxos livres, 200 rpm, temperatura de 75°C e tempos de reação estabelecidos.

Enzimas	3h	24h	48h	72h
Branco	12,8%	12,7%	13,8%	17,4%
A	8,5%	7,2%	13,1%	15,9%
B	7,8%	6,7%	12,3%	14,2%
C	7,1%	4,9%	5,5%	15,0%
D	5,7%	5,5%	5,3%	7,1%
E	7,1%	2,5%	7,2%	8,8%
F	8,5%	6,8%	12,2%	15,1%
G	11,4%	13,2%	15,6%	16,8%
H	5,7%	9,3%	10,0%	13,1%
I	5,4%	2,1%	2,2%	2,6%

Os resultados do percentual de esterificação obtidos para a enzimas avaliadas, na temperatura de 75°C e tempos de reação de 3, 24, 48 e 72 horas, referente ao Éster 3, estão apresentados na figura 1.



**Figura 1:** Éster 3, percentual de esterificação obtidos para a enzimas avaliadas, na temperatura de 75°C nos tempos de reação selecionados e agitação de 200rpm.

A enzima I apresentou melhor eficiência para a esterificação do Éster 3 baseado nos testes realizados, não sendo observado reversão significativa com o decorrer do tempo de reação.

A enzima G apresentou ser menos efetiva para a esterificação nas condições do experimento.

A temperatura da reação foi selecionada baseada na temperatura de fusão do ácido esteárico.

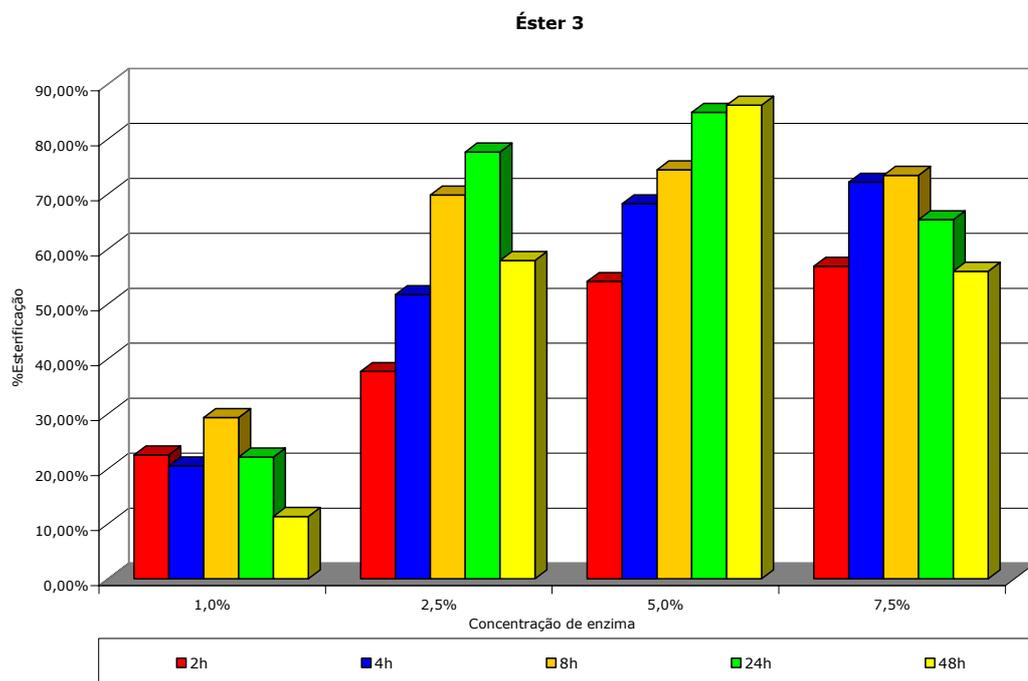
### 3.1.2- AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS

Os resultados do percentual de ácidos graxos livres obtidos para a enzimas I em diferentes concentrações, na temperatura de 75°C e tempos de reação de 2, 4, 8, 24 e 48 horas, para o Éster 3, estão apresentados na tabela 4.

**Tabela 4:** Percentual de ácidos graxos livres na síntese do éster 3, com diferentes concentração da enzima I, na temperatura de 75°C, 200 rpm e tempos de reação estabelecidos.

Enzima I Concentração	2h	4h	8h	24h	48h
Branco	11,8%	11,8%	12,0%	14,1%	15,8%
1,0%	9,2%	9,4%	8,5%	11,0%	14,1%
2,5%	7,4%	5,7%	3,6%	3,2%	6,7%
5,0%	5,4%	3,7%	3,1%	2,1%	2,2%
7,5%	5,1%	3,3%	3,2%	4,9%	7,0%

Os resultados do percentual de esterificação obtidos para as diferentes concentrações enzimas avaliadas, na temperatura de 75°C, 200 rpm e tempos de reação de 2, 4, 8, 24, e 48 horas, referente ao Éster 3, estão apresentados na figura 2.



**Figura 2:** Percentual de esterificação obtidos na síntese do éster 3 com a enzima I em diferentes concentrações, na temperatura de 75°C, 200 rpm nos tempos de reação selecionados .

A enzima I na concentração de 5% apresentou melhor performance para a esterificação do Éster 3 baseado nos testes realizados, não sendo observado reversão significativa com o decorrer do tempo de reação.

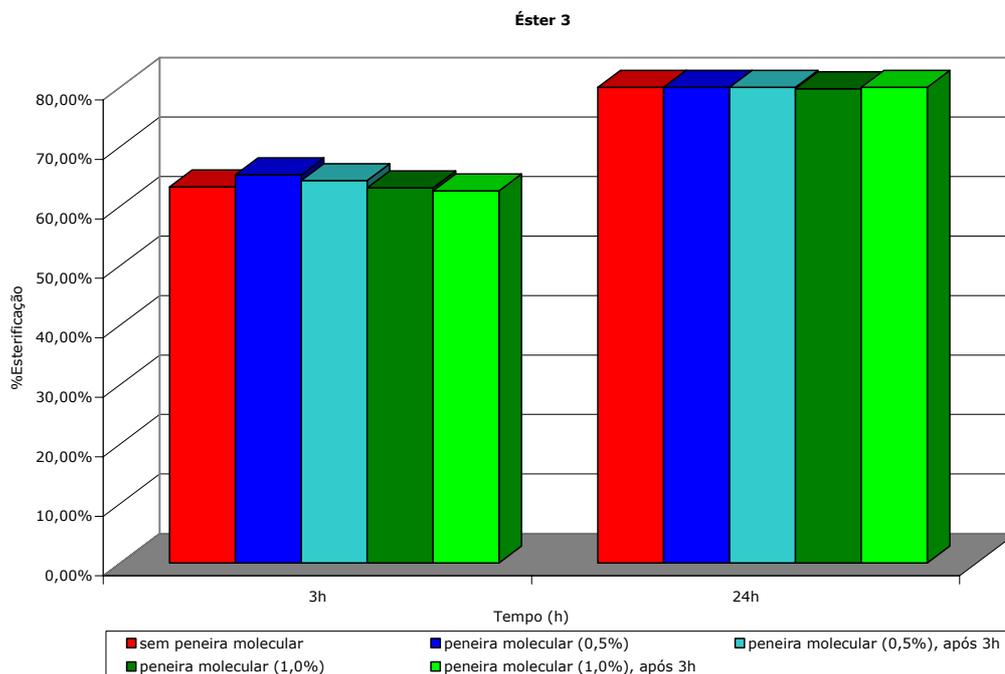
### 3.1.3- AVALIAÇÃO DO USO DE PENEIRA MOLECULAR.

Os resultados do percentual de ácidos graxos livres obtidos para a enzima I na concentração de 5% e adição de 0,5 e 1,0% de peneira molecular de 4 A ° sobre o total do substrato, na temperatura de 75°C e tempos de reação de 3 e 24 horas, para o Éster 3, estão apresentados na tabela 5.

**Tabela 5:** Percentual de ácidos graxos livres na síntese do éster 3, com 5% da enzima I, na temperatura de 75°C, 200 rpm e adição de peneira molecular.

Enzima I (5,0%)	3h	24h
Sem peneira molecular	4,5%	2,6%
Com peneira molecular (0,5%)	4,3%	2,6%
Com peneira molecular (0,5%) adicionada após 3 horas do início da reação	4,4%	2,5%
Com peneira molecular (1,0%)	4,5%	2,8%
Com peneira molecular (1,0%) adicionada após 3 horas do início da reação	4,6%	2,6%
Sem enzima (branco)	12,3%	13,7%

Os resultados do percentual de esterificação obtidos para a enzima I, na concentração de 5% sobre o substrato, na temperatura de 75°C, 200 rpm e tempos de reação de 3 e 24 horas, com e sem adição de peneira molecular em diferentes tempo de reação, estão apresentados na figura 3.



**Figura 3:** Percentual de esterificação obtidos na síntese do éster 3 com a enzima I na concentração de 5%, na temperatura de 75°C, 200 rpm nos tempos de reação selecionados, com e sem adição de peneira molecular em diferentes tempos.

Nas condições avaliadas, não foi observado diferença no percentual de esterificação com o uso de peneira molecular, sendo a peneira molecular adicionada ao iniciar a reação ou decorrido 3 horas.

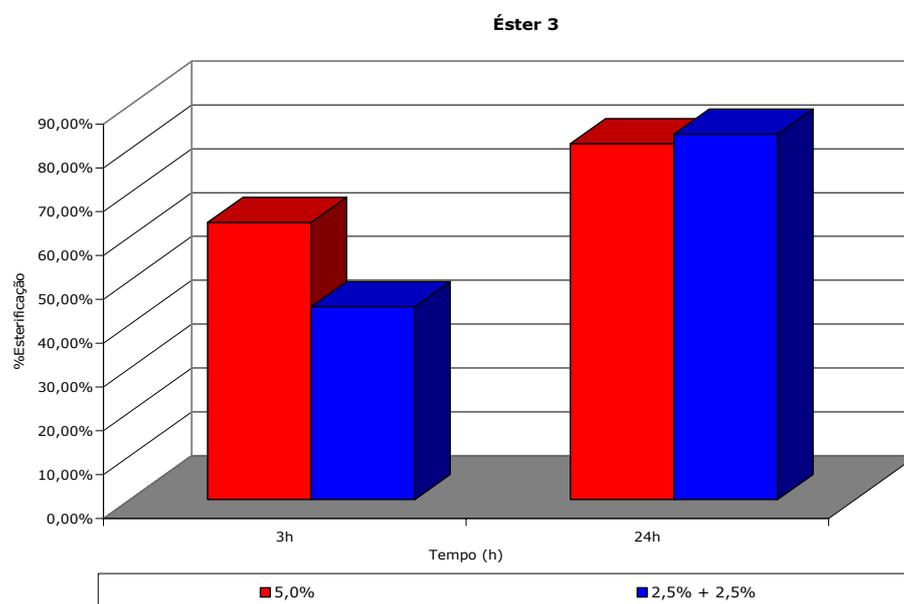
### 3.1.4-AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DA QUANTIDADE DE ENZIMA EM DUAS FRAÇÕES

Os resultados do percentual de ácidos graxos livres obtidos para a enzima I na concentração de 5%, adicionada em duas frações de 2,5% cada, sendo uma fração adicionada no início da reação e a fração restante adicionada após 3 horas, na temperatura de 75°C e tempos de reação de 3 e 24 horas, estão apresentados na tabela 6.

**Tabela 6:** Percentual de ácidos graxos livres na síntese do éster 3, com 5% da enzima I, adicionada em duas frações de 2,5% cada, na temperatura de 75°C, 200 rpm.

Enzima I	3h	24h
5,0%	4,5%	2,6%
2,5% + 2,5%	6,9%	2,3%
Sem enzima (branco)	12,3%	13,7%

Os resultados do percentual de esterificação obtidos para a enzima I, na concentração de 5%, adicionada em duas frações de 2,5% cada, sendo uma fração adicionada no início da reação e a fração restante após 3 horas, na temperatura de 75°C e tempos de reação de 3 e 24 horas, estão apresentados figura 4.



**Figura 4:** Percentual de esterificação obtidos na síntese do éster 3 com a enzima I na concentração de 5%, adicionada em duas frações, na temperatura de 75°C, 200 rpm nos tempos de reação selecionados

Nas condições avaliadas, não foi observado diferença significativa no percentual de esterificação após 24 horas de reação, quando a enzima foi adicionada em duas frações ao sistema reacional. O valor inferior do percentual de esterificação após 3 horas de reação, foi devido a menor quantidade de enzima adicionada nesta etapa da reação.

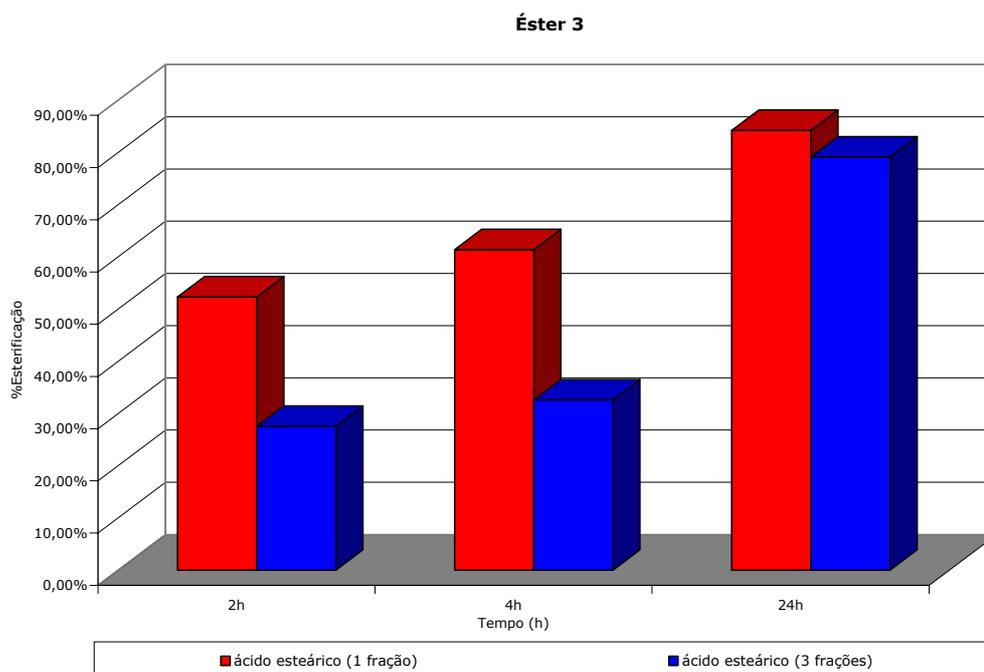
### 3.1.5- AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DO ÁCIDO ESTEÁRICO EM TRÊS FRAÇÕES

Os resultados do percentual de ácidos graxos livres obtidos para a enzima I na concentração de 5%, quando o ácido esteárico foi adicionado em três frações de 3,7% cada, sendo uma fração adicionada no início da reação e as demais frações adicionadas após 2 e 3 horas do início da reação, na temperatura de reação foi de 75°C e tempos de reação de 2, 4 e 24 horas, estão apresentados na tabela 7.

**Tabela 7:** Percentual de ácidos graxos livres na síntese do éster 3, com 5% da enzima I, ácido esteárico adicionado em três frações, na temperatura de 75°C, 200 rpm.

Ácido esteárico	2h	4h	24h
1 fração	5,5%	4,8%	2,1%
Sem enzima (branco, 1 fração)	11,5%	12,5%	13,6%
3 frações	2,8%	8,7%	3,1%
Sem enzima (branco, 3 frações)	3,8%	12,9%	14,8%

Os resultados do percentual de esterificação com 5% da enzima I, e ácido esteárico adicionado em três frações, na temperatura de 75°C, 200 rpm de agitação, estão apresentados na figura 5.



**Figura 5:** Éster 3, percentual de esterificação obtidos para a enzima I na concentração de 5%, com ácido esteárico adicionado em três frações, na temperatura de 75°C, 200 rpm e nos tempos de reação pré-definidos.

Nas condições avaliadas, foi observado pequena redução no percentual de esterificação, após 24 horas, quando o ácido esteárico foi adicionado em três frações no sistema reacional.

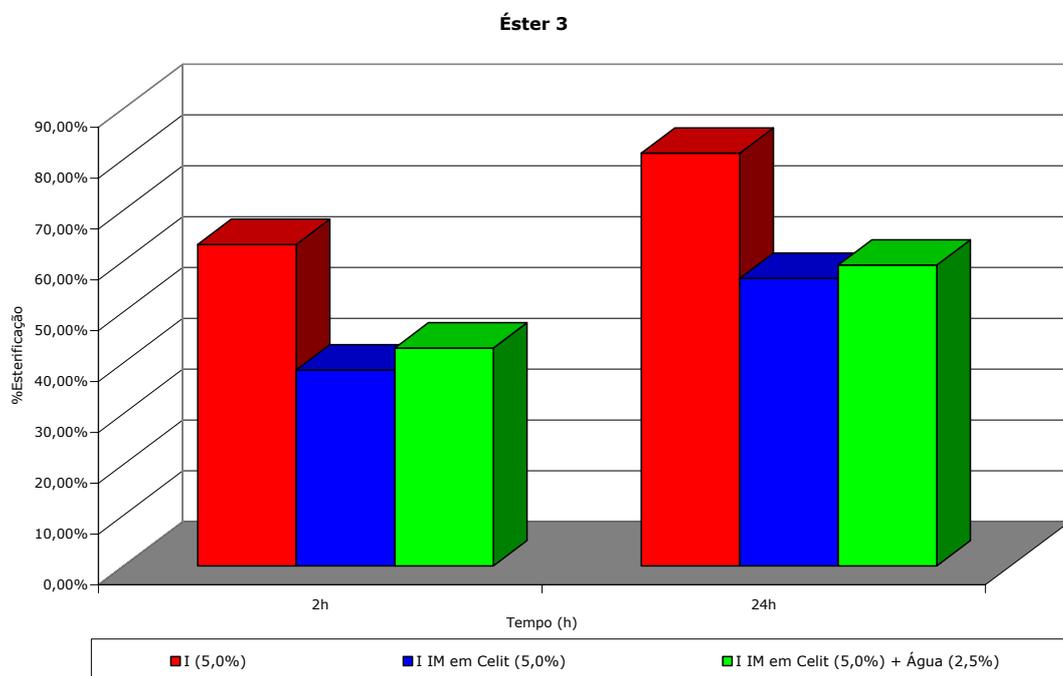
### 3.1.6- AVALIAÇÃO DA ENZIMA I IMOBILIZADA EM CELITE.

Os resultados do percentual de ácidos graxos livres obtidos durante a esterificação do Éster 3 utilizando a Enzima I immobilizada em Celite, com e sem adição de água estão apresentados na tabela 8.

**Tabela 8:** Percentual de ácidos graxos livres na síntese do éster 3, com 5% da enzima I, com e sem imobilização em Celite, com e sem adição de água, temperatura de 75°C, 200 rpm.

Enzima	3h	24h
Branco	12,3%	13,7%
I (5,0%)	4,5%	2,6%
I immobilizada em Celite (5,0%)	7,5%	6,0%
I immobilizada em Celite (5,0%) + Água (2,5%)	7,0%	5,6%

Os resultados do percentual de esterificação utilizando a Enzima I immobilizada em Celite, com e sem adição de água estão apresentados na figura 6



**Figura 6:** Éster 3 - Percentual de esterificação com 5% da enzima I, com e sem imobilização em Celite, com e sem adição de água, temperatura de 75°C, 200 rpm.

A enzima I imobilizada em Celite apresentou menor performance, com e sem adição de água ao sistema reacional. A esterificação com a enzima I imobilizada em Celite, na presença de água foi superior ao sistema reacional sem adição de água. Isto comprova a necessidade de uma determinada quantidade de água no sistema, para uma maior eficiência na reação de esterificação.

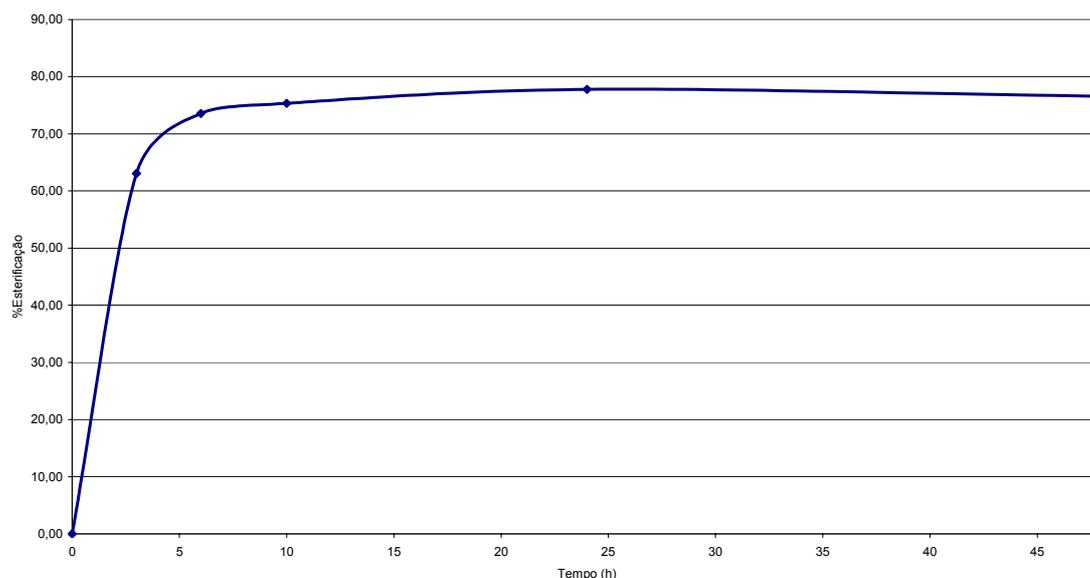
### 3.1.7- VALIDAÇÃO DO SISTEMA REACIONAL UTILIZANDO ESTERASE PARA OBTENÇÃO DE ÉSTERES GLICÓLICOS DE ÁCIDO ESTEÁRICO.

Os resultados de %de ácidos graxos livres obtidos durante a esterificação do Éster 3 utilizando a Enzima I (5,0%), a 70°C e agitação em agitador orbital a 200 rpm, estão apresentados na tabela 9.

**Tabela 9:** Percentual de ácidos graxos livres na síntese do éster 3, com enzima I (5,0%), na temperatura de 75°C, 200 rpm e tempos de reação estabelecidos.

Tempo (h)	Reação 1	Reação 2	Reação 3	Reação 4	Reação 5	Média	Desvio-padrão
0	11,8	11,5	12,1	12,1	12,3	12,0	0,3
3	4,8	4,5	4,7	4,2	3,8	4,4	0,4
6	3,1	3,4	3,3	3,0	3,2	3,2	0,2
10	3,0	2,8	3,1	2,9	3,0	3,0	0,1
24	2,8	2,8	2,4	2,7	2,6	2,7	0,2
48	2,5	3,1	2,8	2,7	3,0	2,8	0,2
Padrão	2,9	2,6	1,3	2,9	1,2	2,2	0,9
Variância do processo químico		0,8		Variância com a enzima I (10h)		0,1	

Os resultados do percentual médio de esterificação obtidos para as reações realizadas para validação do processo de esterificação, com a enzima I, a 5,0%, na temperatura de 75°C, 200 rpm e tempos de reação de 3, 6, 10, 24, e 48 horas, referente ao Éster 3, estão apresentados na figura 7.



**Figura 7:** Percentual médio de esterificação para o éster 3, obtido com a enzima I (5,0%), na temperatura de 75°C, 200 rpm, nos tempos de reação estabelecidos, obtidos em triplicata.

### 3.1.8- DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DURANTE A ESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO A ENZIMA I.

O teor de água, determinado através do Karl Fischer indicou variação entre 0,50 – 1,10% durante a esterificação do éster 3 utilizando a enzima I (5,0%) e temperatura de 75°C.

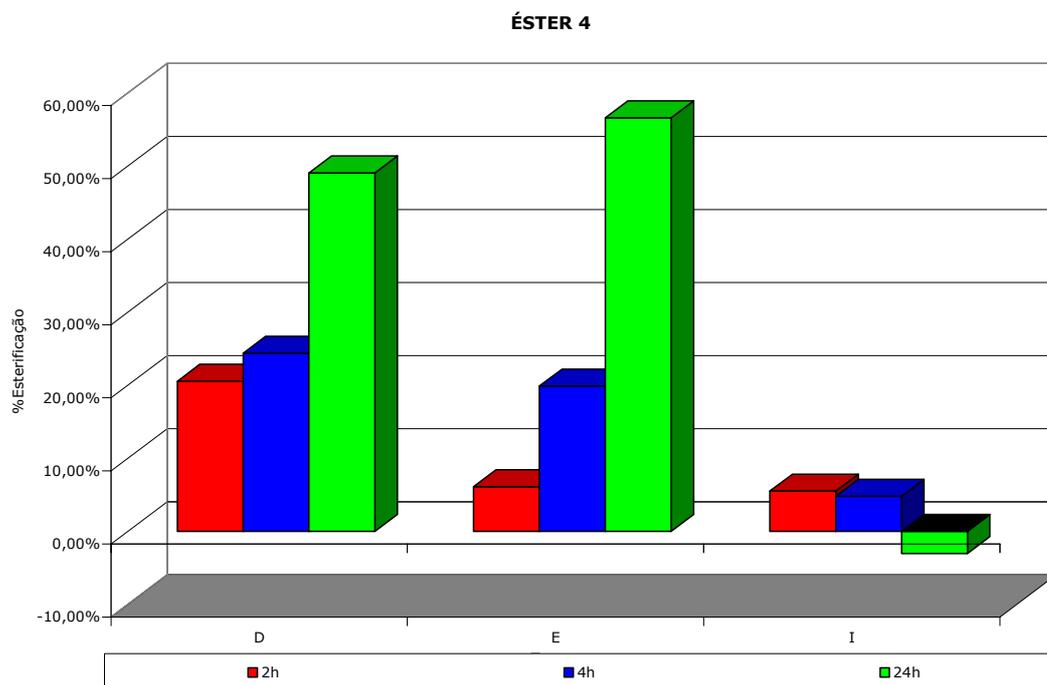
### 3.1.9- SELEÇÃO DAS ENZIMAS PARA O ÉSTER 4

Os resultados do percentual de ácidos graxos livres obtidos para a enzimas avaliadas, na temperatura de 75°C e tempos de reação de 2, 4 e 24 horas, para o Éster 4, estão apresentados na tabela 10.

**Tabela 10:** Percentual de ácidos graxos livres na síntese do éster 4, 200 rpm, temperatura de 75°C e tempos de reação estabelecidos.

Enzimas	2h	4h	24h
Branco	13,1%	13,6%	13,1%
D	10,4%	10,3%	6,7%
E	12,3%	10,9%	5,7%
I	12,4%	12,9%	13,5%

Os resultados do percentual de esterificação obtidos para a enzimas avaliadas, na temperatura de 75°C e tempos de reação de 2, 4 e 24 horas, referente ao Éster 4, estão apresentados na figura 8.



**Figura 8:** Éster 4, percentual de esterificação obtidos para a enzimas avaliadas, na temperatura de 75°C nos tempos de reação selecionados e agitação de 200rpm.

A enzima I apresentou eficiência extremamente baixa para a esterificação do Éster 4 baseado nos testes realizados.

As enzimas D e E apresentaram ser mais efetiva para a esterificação nas condições do experimento; porém com baixo rendimento e tempo de reação longo.

Como nosso objetivo era utilizar a mesma enzima para a produção dos ésteres 3 e 4, e o baixo rendimento obtido com a enzima I para o éster 4, foi dado ênfase na continuidade de estudo do éster 3 neste trabalho.

### 3.2 – CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS

Os resultados da caracterização dos produtos obtidos com o uso de biocatalisadores comparado com os produtos da síntese com catalisador químico, baseados na aparência, espectrometria no infravermelho, cromatografia em camada estão apresentados a seguir.

### 3.2.1- APARÊNCIA VISUAL

O resultado da avaliação visual da aparência dos Éster 3 e 4 obtidos por biocatálise comparado com os ésteres obtidos com o uso de catalisador químico estão apresentados na figura 9.



**Figura 9:** Aparência visual dos ésteres 3 e 4: (G) éster 3 obtido por processo químico; (H) éster 3 obtido por biocatálise com enzima I (5% e 75°C); (I) éster 4 obtido por processo químico e (J) éster 4 obtido por biocatálise com enzima I (5% e 75°C)

### 3.2.2 ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO (FT-IR)

O uso do acessório de reflectância horizontal atenuada (HATR) simplificou a preparação das amostras dos ésteres para a obtenção dos espectros no infravermelho.

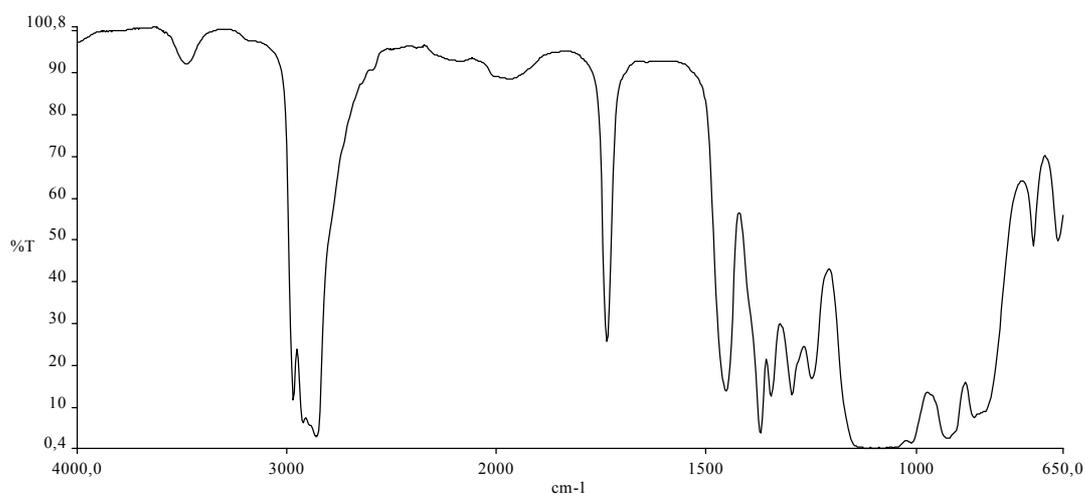
As comparações qualitativas entre as amostra final do éster 3 obtido por catálise enzimática e o respectivo produto padrão está apresentado na tabela 11.

**Tabela 11:** Comparação das amostras de Éster 3 obtidos por catálise enzimática e o produto padrão, obtido por processo químico.

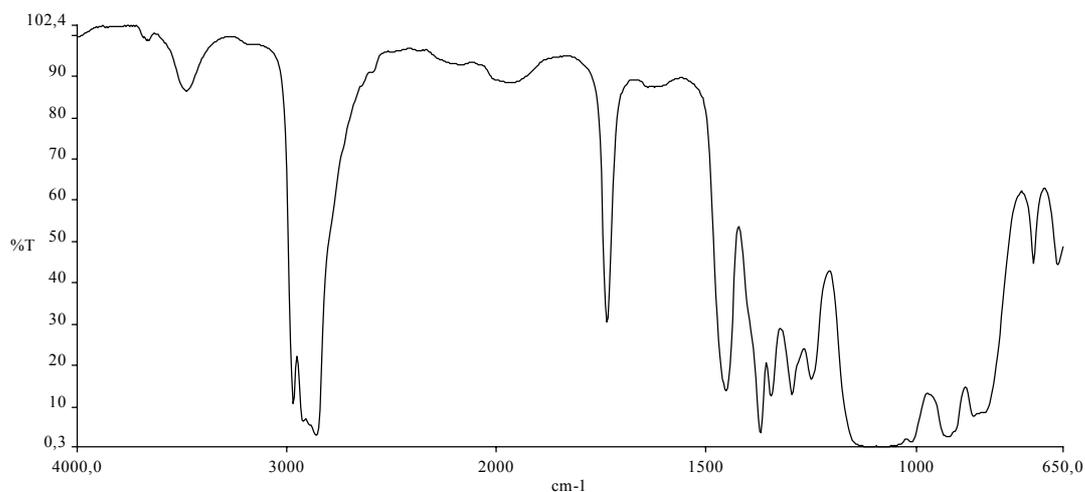
Produto	Correlação
Éster 3 (padrão)	1,0000
Ester 3 (Enzima I – 5%)	0,9937
Éster 3 (Enzima C - 5%)	0,7472
Éster 3 (Enzima H - 5%)	0,7338
Éster 3 (Enzima D - 5%)	0,7277
Éster 3 (branco)	0,6527

O espectro do Éster 3 (padrão) foi comparado com espectros de amostras do produto obtidas por biocatálise. As correlações dos espectros, obtidas através de software específico “compare” permitiram verificar a identidade das mesmas com o éster padrão. Pela comparação dos espectros dos produtos obtidos por via enzimática com o espectro do éster padrão, foi verificado que o Éster 3 obtido com a Enzima I (5%) pode ser considerado muito semelhante ao produto padrão.

Os espectros no infravermelho em transmitância do Éster 3 padrão e o obtido com a enzima I (5,0%, 75°C ), apresentados, respectivamente nas figuras 10 e 11. O espectro do produto sem uso de catalisadores (branco) está apresentado na figura 12.

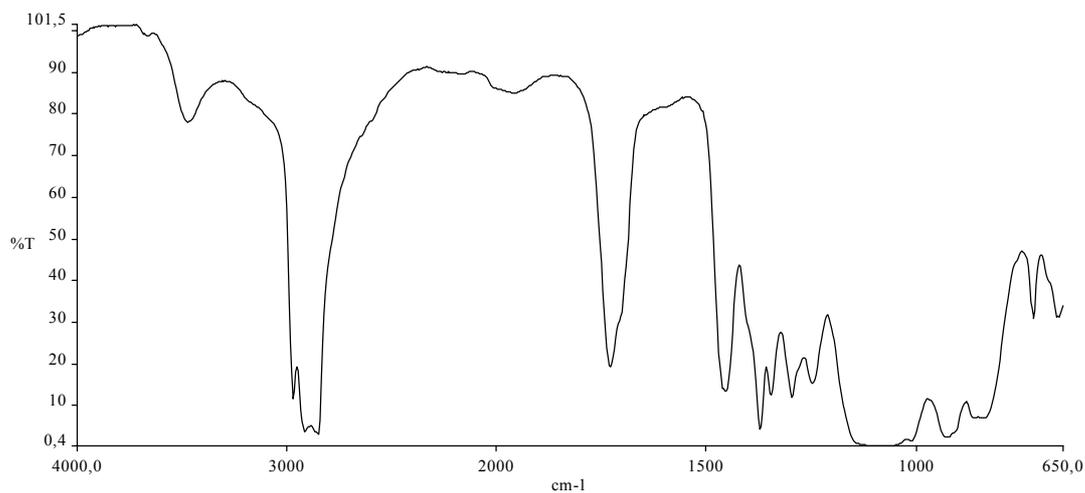


**Figura 10:** Espectro no infravermelho do Éster 3 (padrão), obtido por reflectância (4000 - 625 $\text{cm}^{-1}$ , resolução: 4 $\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura 11:** Espectro no infravermelho do Éster 3 (enzima I- 5%), obtido por reflectância (4000 - 625 $\text{cm}^{-1}$ , resolução: 4 $\text{cm}^{-1}$ ).

A presença da banda C=O na região de 1750 – 1730  $\text{cm}^{-1}$ , permitiu a verificação da formação dos ésteres.

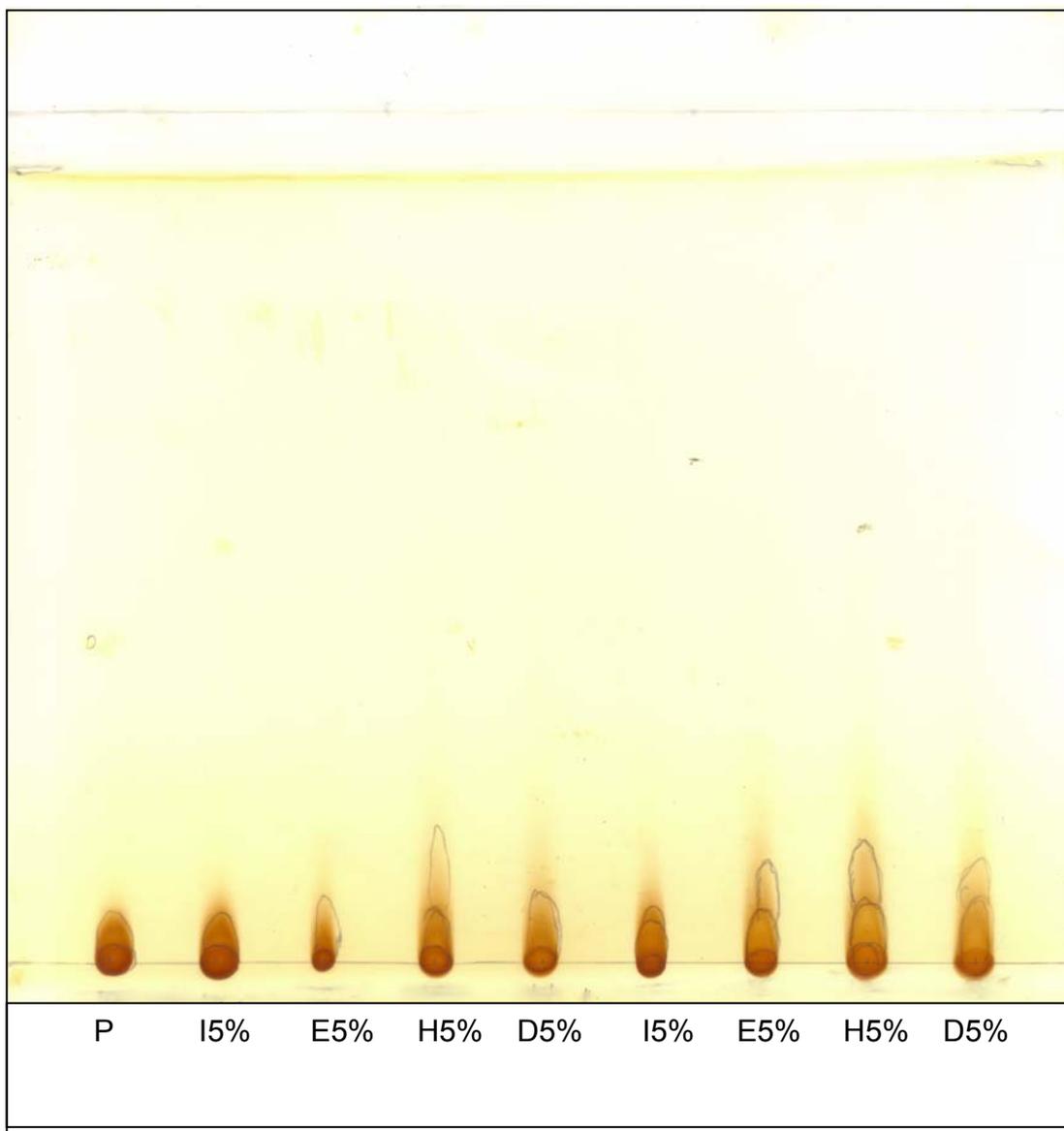


**Figura 12:** Espectro no infravermelho do Éster 3 (branco), obtido por reflectância (4000 - 625 $\text{cm}^{-1}$ , resolução: 4 $\text{cm}^{-1}$ ).

As bandas de vibração características dos ésteres entre  $1750 - 1730\text{cm}^{-1}$  relativo a carbonila (-CO-) e a  $2800-2750\text{cm}^{-1}$  para os -C-H correspondentes ao -CH<sub>3</sub> e -CH<sub>2</sub>-, foram observadas nas amostras finais dos produtos da reação com enzimas e nos catalisados quimicamente, estando de acordo com o apresentado por Monteiro et al. (1996). A banda característica às hidroxilas (-OH) a  $3500\text{cm}^{-1}$ , foi observada nas amostras do éster 3, sugerindo a formação de monoéster. A banda na faixa de  $1715\text{cm}^{-1}$  relativo ao -CO- dos ácidos carboxílicos, foi observada nas amostras em branco e desaparece durante a reação de esterificação utilizando processo enzimático ou químico.

### **3.2.3 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)**

O uso da cromatografia de camada delgada após otimização da fase móvel, permitiu a comparação do éster obtido por biocatálise com o produto obtido por processo químico (padrão). Na figura 13 está apresentado a placa de camada delgada para o éster 3.



**Figura 13:** Éster 3: Cromatografia em camada delgada, fase móvel éter de petróleo: éter etílico: ácido fórmico (150:150:20), revelação com iodo. (P= éster 3 padrão, I5%= enzima I; E= enzima E; H= enzima H; D= enzima D).

A análise da placa de camada delgada indicou que o éster 3 obtido com a enzima I à 5% e 75°C, apresentou-se com perfil muito semelhante ao produto obtido por processo químico .

### 3.3 – TESTES APLICATIVOS

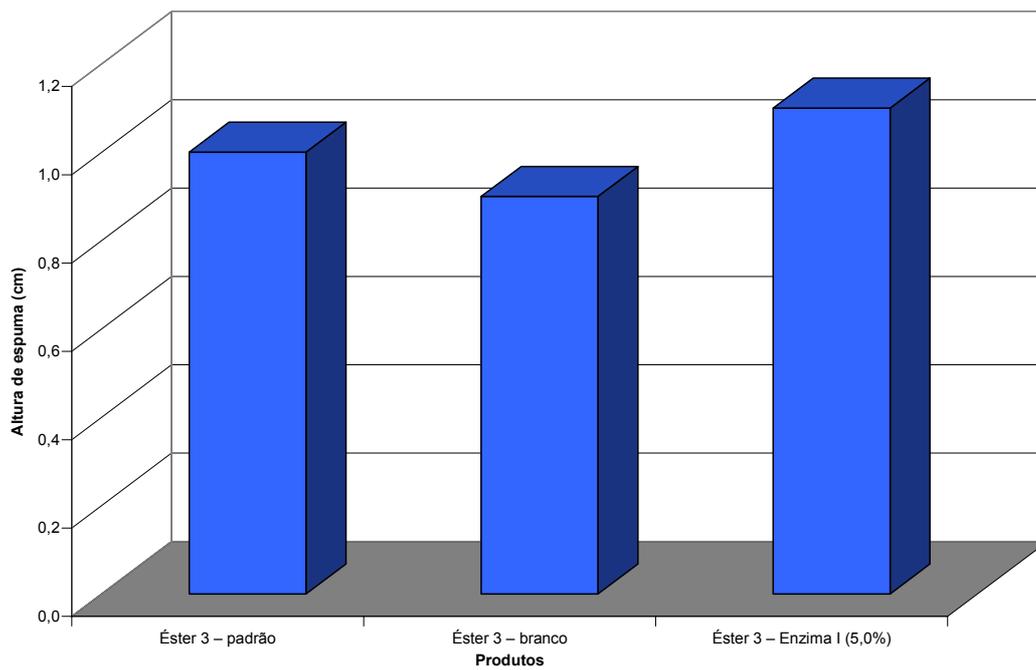
Os resultados dos testes aplicativos dos produtos obtidos com o uso de biocatalisadores comparado com os produtos da síntese com catalisador químico, baseados na dispersão em água, formação de espuma e distribuição do tamanho de partículas da emulsão aquosas dos ésteres estão apresentados a seguir.

#### 3.3.1- DISPERSÃO EM ÁGUA E FORMAÇÃO DE ESPUMA

Os resultados da dispersão dos ésteres em água e persistência da espuma estão apresentados na tabela 12 e na figura 15 e a capacidade de formação de espuma está apresentada na figura 14.

**Tabela 12:** Dispersão, persistência da espuma e estabilidade da emulsão dos ésteres 1 e 2, em água destilada e temperatura de 25° C.

Amostra	Dispersão (2% em água)	Persistência espuma	Estabilidade da dispersão (24h)
Éster 3 – padrão	dispersa	baixa	instável
Éster 3 – branco	flota	-	-
Éster 3 – enzima I (5%)	dispersa	baixa	instável



**Figura 14:** Capacidade de formação de espuma dos ésteres em água.

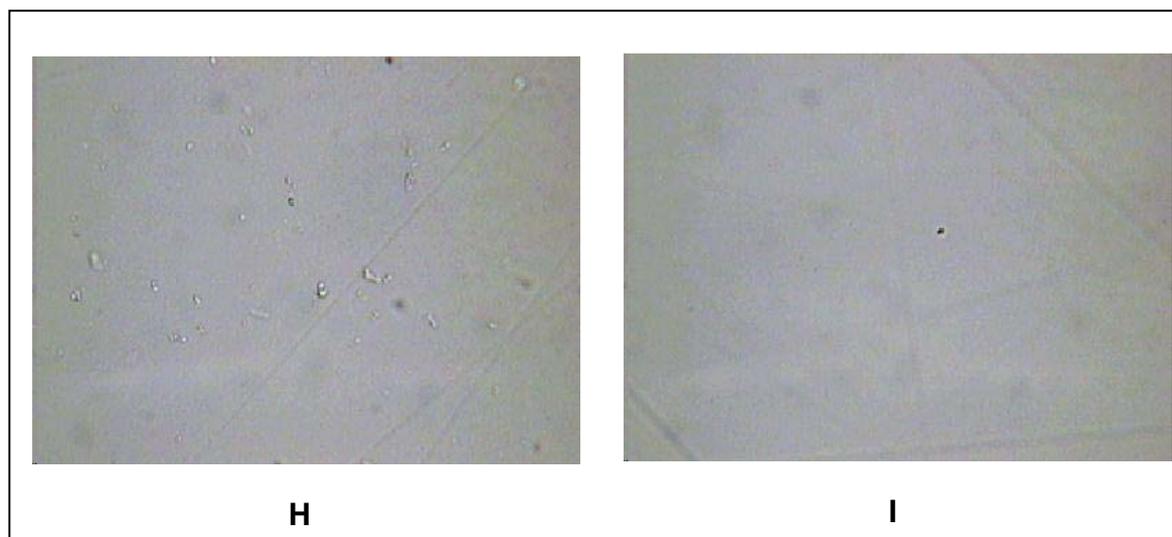


**Figura 15:** Avaliação da estabilidade da emulsão do éster 3 em água. (H) padrão; (I) enzima I (5%).

Foi observado a mesma tendência de dispersão e formação de espuma em água nos produtos com o éster 3 obtido por processo químico e por biocatálise com a enzima I. Não há muito material sobre este tipo de éster na literatura para comparação dos resultados, porém é esperado que o mesmo apresente dispersão em água, necessário a aplicação como antiespumante para processos fermentativos, mas não se trata de um agente surfactante, justificando a separação de fases da dispersão à 2% em água após 24 horas.

### 3.3.2- FOTOMICROGRAFIA DAS DISPERSÕES DO ÉSTER EM ÁGUA

A análise microscópica das dispersões do éster 3 em água destilada está apresentada na figura 16.



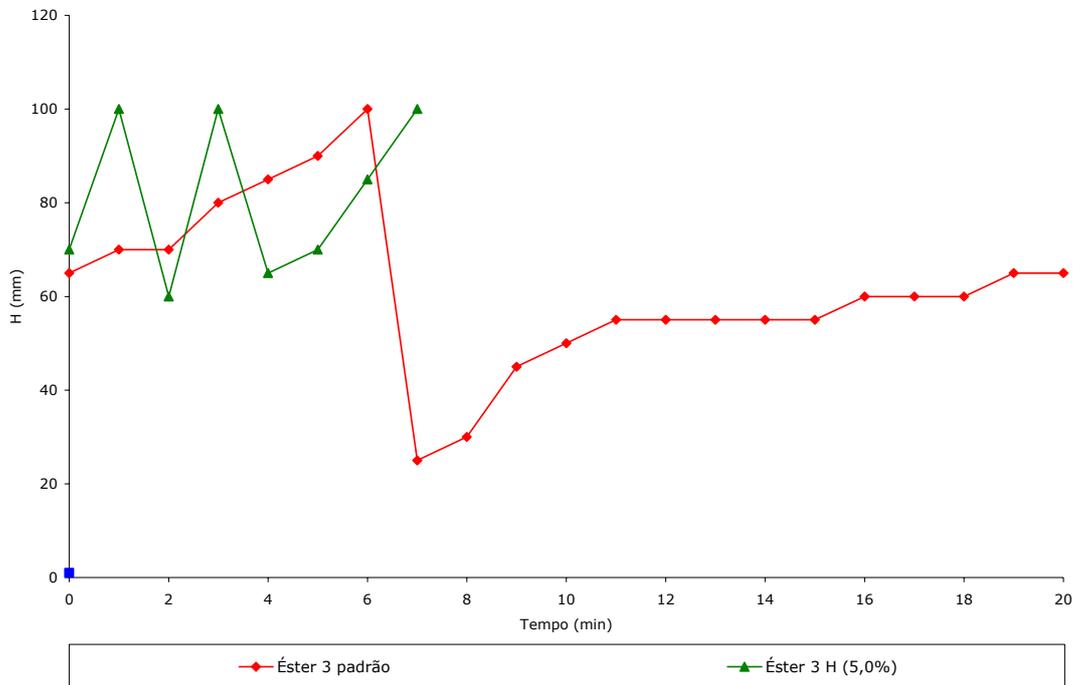
**Figura 16:** Fotomicrografias das dispersões do éster 3 em água, obtidas por microscopia ótica, aumento de 100X. (H) padrão; (I) enzima I (5%).

A análise microscópica das dispersões dos ésteres em água destilada, não indicou a formação de miscelas.

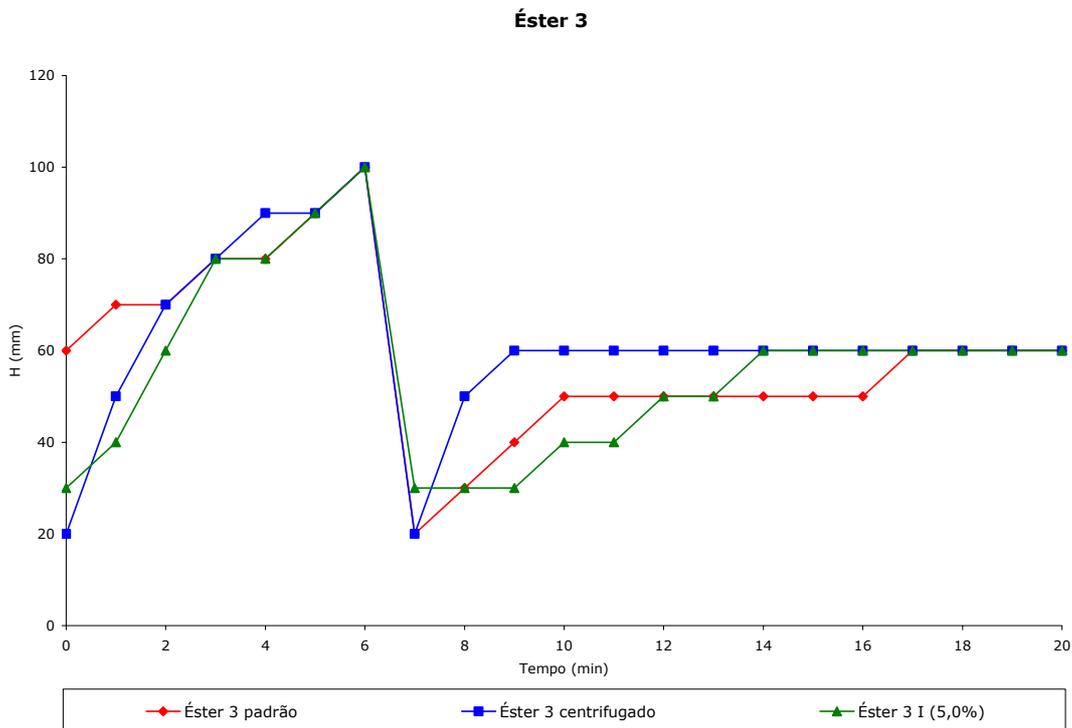
### 3.3.3-AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA COMO ANTIESPUMANTE PARA PROCESSO FERMENTATIVO

Os resultados da eficiência como antiespumante do produto obtido por biocatálise utilizando a enzima H (5,0%), comparado com o produto convencional, está apresentado na figura 17 e utilizando a enzima I (5,0%), na figura 18.

### ÉSTER 3



**Figura 17:** Comparação da eficiência do Éster 3 obtido por biocatálise (enzima H) e processo químico, para controle de espuma em processos fermentativos utilizando Fermenteste.



**Figura 18:** Comparação da eficiência do Éster 3 obtido por biocatálise (enzima I) e processo químico, para controle de espuma em processos fermentativos utilizando Fermenteste.

A avaliação em laboratório indicou eficiência superior do produto obtido utilizando a enzima I, no que se refere ao controle de espuma, devido a maior quebra inicial e necessidade da mesma quantidade de produto para controlar a formação de espuma, quando comparado com o éster obtido pelo processo químico (catalisador ácido e alta temperatura).

O produto obtido com a enzima H, apresentou teor de ácido graxo livre de 5,7%, valor superior ao encontrado com o uso da enzima I, que foi de 2,1% e foi utilizado para demonstrar que a característica do produto final reflete na eficiência do teste, bem como o procedimento é adequado para avaliar estas variações no produto.

O produto obtido por processo químico e posterior centrifugação, para remoção de impurezas suspensas, também foi avaliado. A avaliação no Fermenteste indicou performance levemente superior ao produto sem centrifugação, porém inferior ao produto obtido por processo biocatalítico.

O éster obtido com enzima I, apresentou incolor límpido; sendo que a maior pureza do mesmo, impacta na eficiência do produto como antiespumante.

### **3.4- PROCESSO PARA OBTENÇÃO DOS ÉSTERES EM ESCALA INDUSTRIAL**

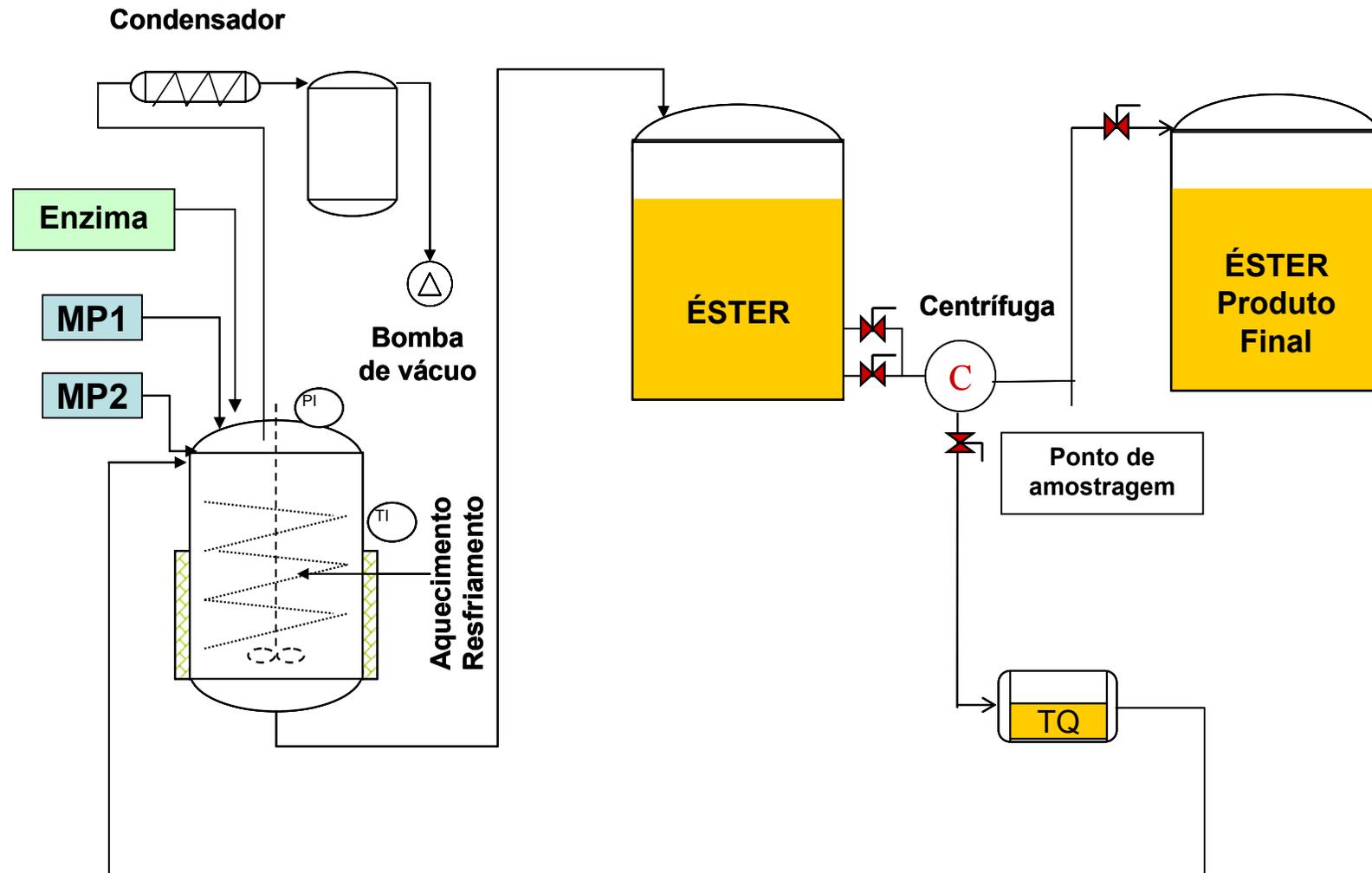
Baseado na avaliação dos principais fatores que podem impactar a manufatura do éster 3 em escala industrial foi proposta um processo que está apresentado no fluxograma da figura 19.

Os fatores avaliados foram agitação, aquecimento, destilação filtração ou centrifugação, sendo que o aquecimento foi considerado crítico, devido a alta temperatura necessária a síntese do éster 3 por processo químico.

O processo proposto para a obtenção do éster 3 utilizando a enzima I em escala piloto/industrial, consistiu na adição do poliglicol A com o ácido esteárico destilado ao vaso de processo, aquecimento com agitação na faixa de 75-80° C, para a completa fusão do ácido esteárico. A enzima foi adicionada e o conteúdo do vaso de processo mantido à 70 – 80°C e pressão atmosférica, sendo a esterificação acompanhada pela determinação de ácidos graxos através de titulação com solução de hidróxido de sódio e fenolftaleína como indicador.

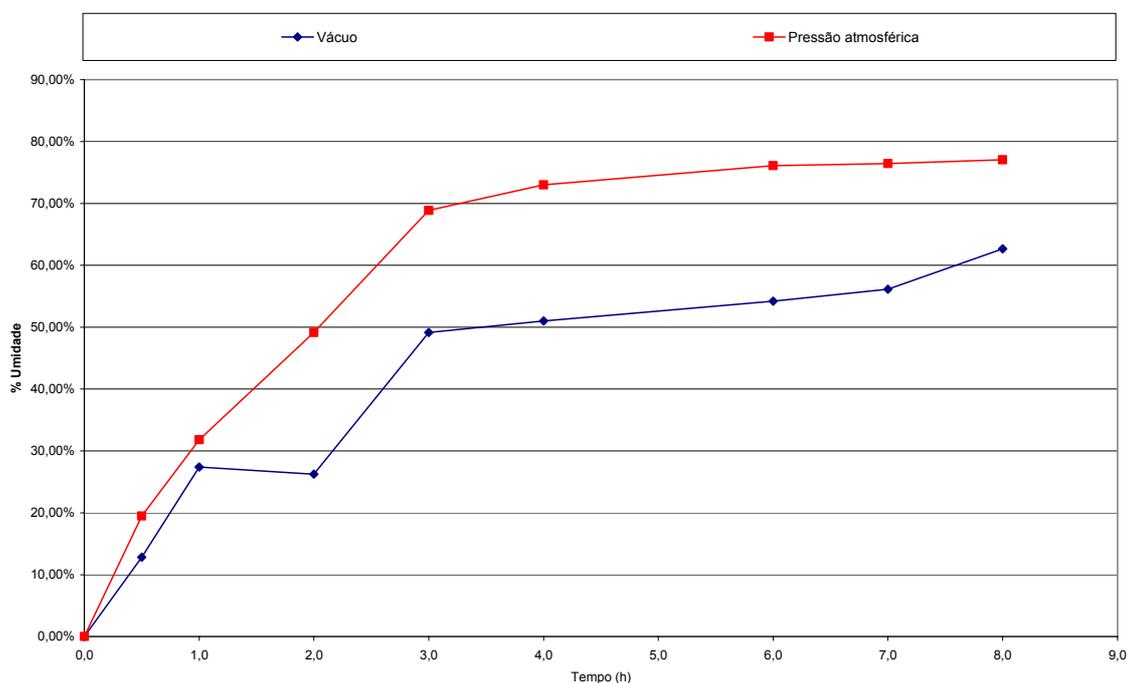
Quando o teor de ácido graxo atingiu o limite especificado, foi aplicado vácuo ao vaso de processo para remoção de água residual.

Após resfriamento, o conteúdo foi centrifugado e o resíduo contendo enzima separado para reutilização.



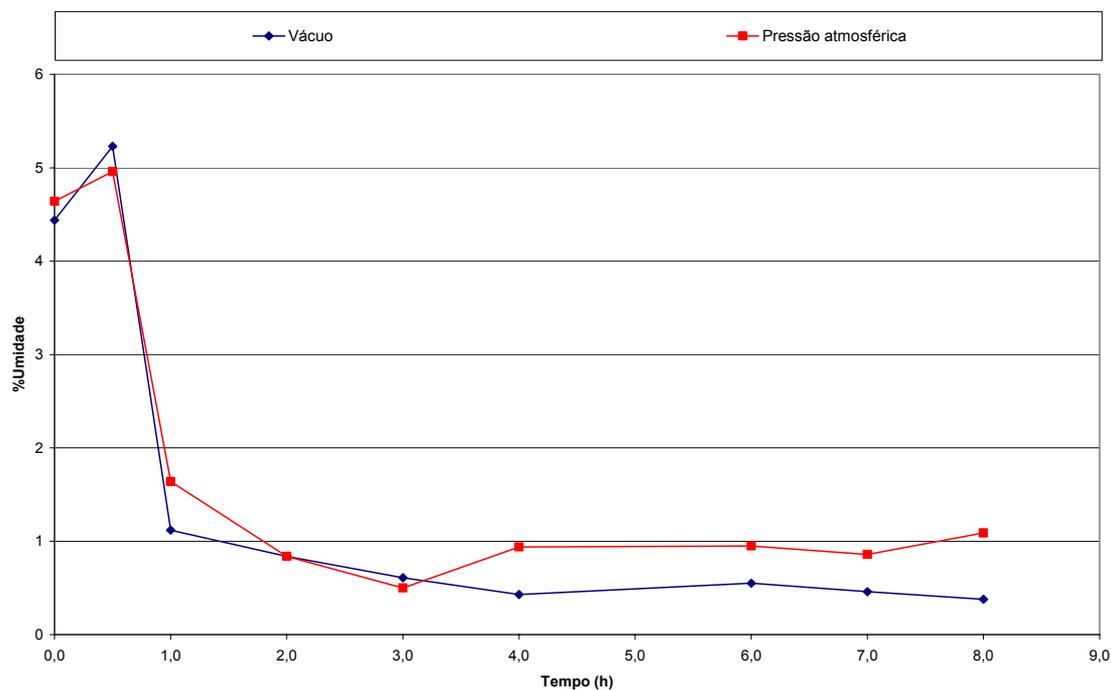
**Figura 19:** Fluxograma proposto para síntese de ésteres de ácidos graxos utilizando esterase como biocatalisador e temperatura de 75°C (MP1 = poliglicol; MP2 = ácido esteárico; TQ=tanque)

Foram produzidos dois lotes do éster 3, em escala O lote A, foi sintetizado sob vácuo constante e o lote B, a pressão atmosférica e aplicação de vácuo no final do processo, visando a remoção de água residual. Os resultados do percentual de esterificação, obtidos para os dois lotes estão apresentados no gráfico da Figura 20.



**Figura 20:** Percentual de esterificação obtido na síntese em escala piloto para o éster 3, sob vácuo e pressão atmosférica.

Os valores de umidade determinado através do Karl Fischer durante os dois lotes, com e sem vácuo, estão apresentados na Figura 21:



**Figura 21:** Percentual de água determinado durante a síntese em escala piloto para o éster 3, sob vácuo e pressão atmosférica.

A variação de temperatura durante a síntese sob vácuo foi de 70 – 79°C, e em na pressão atmosférica a variação foi de 72 – 76°C.

Pelos resultados obtidos, foi verificado percentual de esterificação maior na síntese realizada em pressão atmosférica e vácuo aplicado somente no final do processo para remoção de água. Este fato pode ser explicado pela necessidade de um teor mínimo no sistema reacional, para que a enzima I (esterase) apresente maior atividade como biocatalisador da esterificação.

A variação da temperatura durante o processo, foi menor no processo realizado em pressão atmosférica.

#### 4- CONCLUSÕES

Na literatura não foi encontrado muitas referências sobre a síntese de ésteres de ácido esteárico com poliglicóis de peso molecular elevado (2000 – 2350), utilizando enzimas como biocatalisadores.

Os resultados indicaram que a enzima I (esterase) podem ser utilizada como biocatalisadores para obtenção de ésteres de ácido esteárico e poliglicol de peso molecular elevado, como rota alternativa ao processo químico tradicional, porém sua atividade depende principalmente do tipo de poliglicol utilizado.

A esterase I não foi efetiva na esterificação do éster 4 que possui poliglicol com baixíssima solubilidade em água, porém apresentou boa performance na obtenção do éster 3, o qual utilizou poliglicol que apresenta solubilidade em água.

Outro fator que pode influenciar no menor rendimento na reação do éster 3 e 4, é a capacidade da molécula de ácido esteárico de se enrolar na forma de uma bola compacta.

Visando obter o éster 3, podemos concluir que das enzimas avaliadas, a enzima identificada como I apresentou a melhor taxa de esterificação (70%).

A enzima I imobilizada em Celite apresentou resultado inferior de esterificação quando comparado com a enzima livre, embora os dados obtidos por Janssen & Haas (1994) indicaram que as enzimas imobilizadas apresentam boa eficiência para monoleato e diololeato de polietilenoglicol.

Entretanto os dados obtidos quando a enzima I foi imobilizada com Celite está de acordo com os relatos de Gandhi (2000), que diz que as enzimas imobilizadas tem preferência pelos ácidos graxos de cadeia curta.

O uso de peneira molecular, nos resultados obtidos nos trabalhos de Janssen & Haas, não indicaram aumento da esterificação, inclusive houve aumento no tempo de reação para obter o mesmo percentual de esterificação, de 50 horas sem o uso da peneira molecular para 75 horas de reação com o uso da peneira molecular, e

conseqüente maior redução de água no sistema reacional; esta observação foi comprovada nos estudos realizados no presente trabalho.

Também foi observado, que o controle de água é importante para um alto rendimento nas reações de esterificações; sendo necessário uma quantidade mínima de água para que a reação ocorra.

A enzima I apresenta boa atividade catalítica quando utilizada na temperatura de 75°C, necessária para manter o ácido esteárico na forma líquida (fundida).

O sistema reacional proposto neste trabalho apresentou variância de 0,1.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAYADA, A., LAWRENCE, G., MAEDER, M., MOLLOY, K..ATR-IR spectroscopy for the investigation of solution reaction kinetics. *Applied spectroscopy*. 40 (12), 1789-1792, 1995.

GANDHI, N.N., PATIL, N.S., SAWANT, S.B., JOSHI, J.B.. Lipase-catalyzed esterification. **CATAL. REV.-SCI. ENG.**,42(4):439-480, 2000.

GARRET, P.R. Defoaming: theory and industrial applications. Surfactant science series. Vol. 45, **Marcel Dekker Inc.**, 1993.

GIOIELLI, L.A., PITOMBO, R.N.M., VITOLO, M., BARUFFALDI, R., OLIVEIRA, M.N., AUGUSTO, M.S.. Acidolysis of babassu fat catalysed by immobilized lipase. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 71 (6): 579-582, 1994.

HAYES, D.G., GULARI, E.. Formation of polyol-fatty acid esters by lipases in reverse micellar media. **Biotechnology and Bioengineering**, 40:110-118, 1992.

JANSSEN, G.G., HAAS, M.J.. Lipase-catalyzed synthesis of oleic acid esters of polyethylene glycol 400. **Biotechnol. Letters**, 16(2):163-168, 1994

MAAG, H.. Fatty acid derivatives: important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61(2):259-267, 1984.

MUDALY, G.. Defoamer technology: the key to profitable pulping. *Buckman Laboratories Pty Ltd.*, 2004.

MONTEIRO, J.B., NINOW, J.L., NASCIMENTO, M.G.. Obtenção de glicerídeos parciais via esterificação do ácido láurico com o glicerol catalisada por lipase, *Seminar on enzymatic hydrolysis of biomass proceedings*, 1996.

PASTORE, G.M.. Produção e caracterização bioquímica de monoacilglicerol lipase microbiana e aplicação de lipases na hidrólise e esterificação enzimática. *Tese de doutorado*, 1992.

PRAZERES, J.N.. Produção, purificação e caracterização da lipase alcalina de *Fusarium oxysporum*. *Tese de doutorado*, 2006.

ROBERTS, S.M., TURNER, N.J., WILLETS, A.J., TURNER, M.K.. Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms. *Cambridge University Pres.*, 1995.

TAIPA, M.A., AIRES-BARROS, M.R., CABRAL, J.M.S.. Enzymatic interesterification of fats: factors influencing the choice of support for immobilized lipase. *J. Biotechnol.*, 26:111-142, 1992.

Dow Chemical Company . *Catálogo: Poliglicóis e agentes controladores de espuma na indústria sucro alcooleira*, 2001.

## CONCLUSÕES GERAIS

Baseado nos resultados obtidos das 227 reações realizadas durante o projeto, os estudos realizados indicaram que é possível obter ésteres de poliglicóis de alto peso molecular, utilizando as lipases D e E e a esterase I como bicatalisadores.

O processo desenvolvido no presente trabalho para a obtenção dos ésteres 1 e 2, é mais eficaz do que os obtidos nos trabalhos da literatura consultada, visto que uma alta percentual de esterificação foi obtido para ambos ésteres em tempo de no máximo 10 horas, enquanto que os resultados dos trabalhos para ésteres similares indicaram variação do tempo de reação entre 50 a 100 horas.

O uso de peneira molecular não aumentou o rendimento dos ésteres nas condições em que foram avaliados neste trabalho.

O tempo de reação dos ésteres que utilizam poliglicóis de peso molecular (2000 – 2350), foi superior ao de ésteres com poliglicóis de peso molecular inferior (400). A reação também é facilitada, ou seja, o rendimento é maior ou ocorre em menor tempo, quando há aumento na quantidade de poliglicol no sistema reacional.

Variando a estequiometria entre ácido graxo e polietilenoglicol, é possível modular a reação de esterificação para obter preferencialmente monoésteres ao ser utilizado maior proporção de polietilenoglicol, ou diésteres quando a proporção de ácidos graxos é maior. Entretanto, as enzimas D e E, tende a levar a maior formação de monoésteres, mesmo quando a proporção de ácidos graxos é maior em relação ao polietilenoglicol 400.

Os rendimentos obtidos no processo dos ésteres 1 e 2, com as enzimas D e E foram superiores a 90%, enquanto que para o éster 3 variou na faixa de 70 – 80%.

O efeito da diminuição no rendimento da reação causado por um poliglicol de cadeia maior, contendo mais de 5 átomos de carbono, pode estar relacionada ao impedimento estérico do substrato, dificultando o alojamento adequado no centro

ativo da enzima para que possa ocorrer a catálise.

A dispersão do éster 1 obtido com o uso da enzima E (2,5%), nas condições dos experimentos realizados, levou a formação de microemulsão; sendo esta uma característica interessante para aplicações industriais e farmacêuticas. Este fato despertou bastante interesse, abrindo perspectivas para novos estudos em relação a composição do éster 1, quando biocatalisado pela lipase E, bem como a avaliação da possibilidade de novas aplicações deste éster em diferentes mercados.

Os processos desenvolvidos permitiram a obtenção dos ésteres sem a utilização de solventes, o que facilita o processo industrial, visto que não há necessidade de remoção do solvente, reduzindo o custo do produto.

A qualidade dos ésteres obtidos enzimaticamente é superior ao obtidos por processo químico convencional, sendo observado produtos mais claros e límpidos e sem formação de subprodutos, principalmente decorrentes de oxidação, devido a temperaturas elevadas, necessária no processo em que se utiliza catalisador químico.

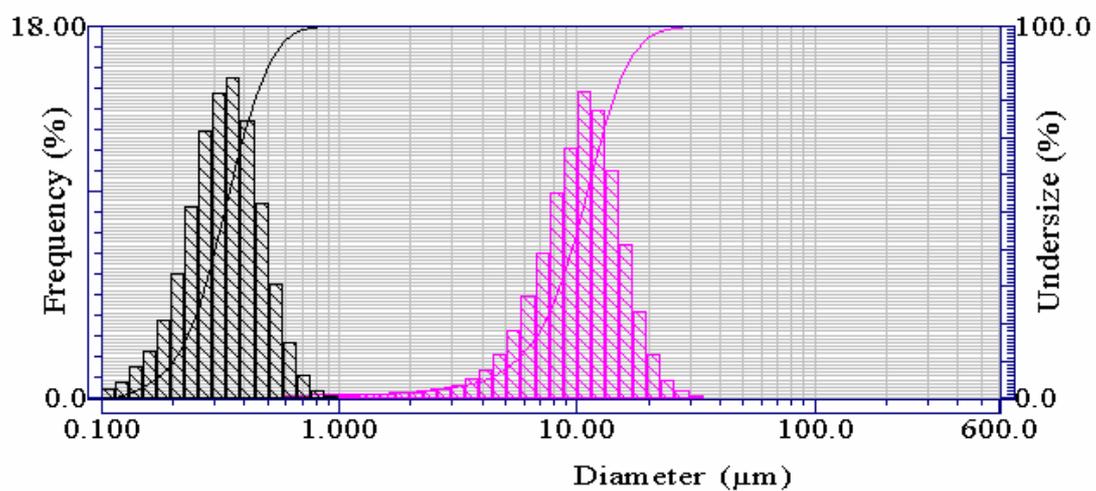
Os estudos realizados permitiram a elaboração da proposta de produção destes ésteres em escala piloto, contribuindo para uma área onde há necessidade de estudos.

Os processos biocatalisados permitem a obtenção de produtos específicos, com maior grau de pureza, não necessitando de catalisadores considerados tóxicos ou perigosos; sendo portanto processos considerados “limpos”.

Baseado na estimativa de custo, principalmente em relação a redução do custo com energia, os processos utilizando biocatalisadores, podem ser considerados economicamente viáveis para a continuidade dos estudos de produção em escala industrial.

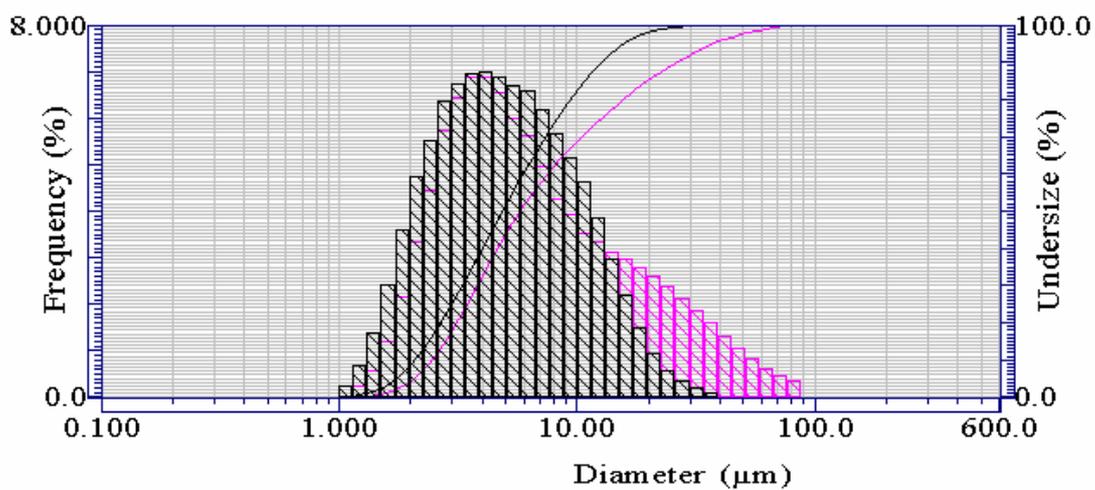
## **ANEXO I**

Gráficos da distribuição do tamanho de partículas das dispersões 2% em água destilada, obtidas no equipamento Horiba – Laser scattering particle size distribution analyzer LA-300.



**Gráfico 1:** Distribuição do tamanho de partículas da dispersão do éster 1 em água: produto padrão, obtido por processo químico (rosa), produto obtido por biocatálise com enzima E (2,5%, 70° C) (preto)

## ANEXO II

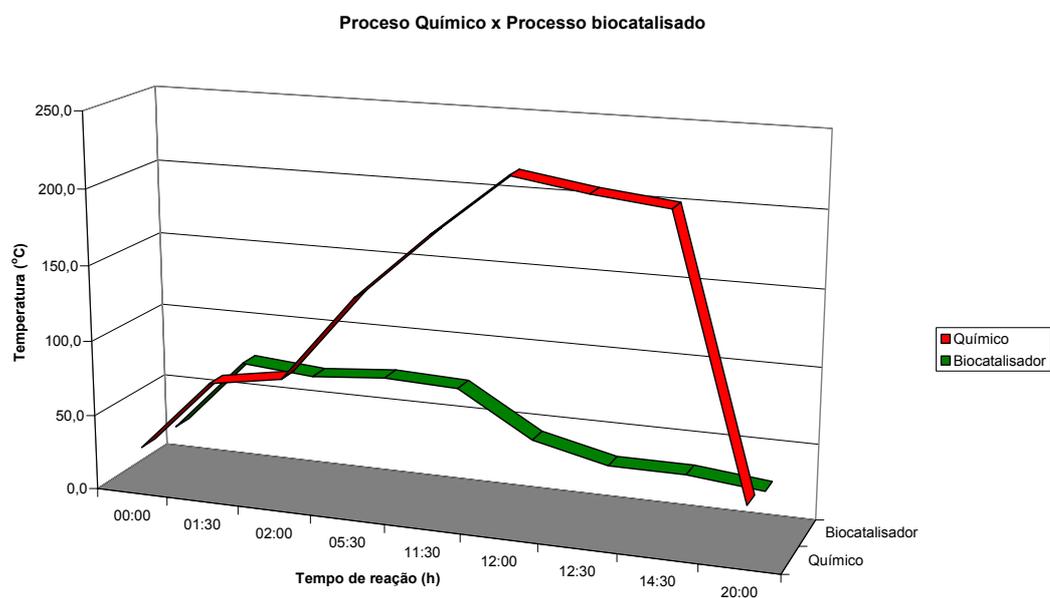


**Gráfico 2:** Distribuição do tamanho de partículas da dispersão do éster 2 em água: produto padrão, obtido por processo químico (rosa), produto obtido por biocatálise com enzima D (0,5%, 70° C) (preto)

Avaliação dos fatores mais significativos para a estimativa de custo do processo químico e com biocatalisadores para obtenção de ésteres de poliglicóis.

Aspecto	Processo Químico	Processo com biocatalisador	Significância para o custo
Consumo de óleo térmico	sim	não	média
Consumo de água	não	sim	baixa
Consumo de água de resfriamento	sim	sim	baixa
Consumo de energia elétrica	sim	não	alta
Consumo de vapor	não	sim	média
Consumo de catalisador químico	sim	não	baixa
Consumo de biocatalisador	não	sim	média

Simulação para comparação do tempo e temperatura para síntese do éster 3 por processo químico e processo por biocatalisador.



**Dados:**

### 1) Aquecimento utilizando vapor

Para aquecer 1 m<sup>3</sup> de água de 25 °C para 80°C utilizando-se vapor, o custo é de R\$ 12. O aquecimento de água é feito com vapor direto, ou seja, não existe recuperação de condensado. Caso haja um sistema com recuperação de condensado, é possível considerar uma recuperação de energia em torno de 10%.

### 2) Aquecimento utilizando óleo térmico

Para aquecer esse mesmo m<sup>3</sup> de água de 25°C para 80°C utilizando-se óleo térmico, temos um custo de R\$ 19. Ou seja, o custo do aquecimento com vapor é 37% menor que o custo do óleo térmico.

### 3) Investimento em equipamentos

3.1) Central térmica indutiva para utilização num vaso de processo de 4m<sup>3</sup>, totaliza um valor de R\$ 232.00,00, sendo:

- Central térmica = R\$ 180.000
- Linhas = R\$ 40.000
- Instalações elétricas = R\$ 5.000
- Custo do óleo Térmico = R\$ 7.000 para 1.200 litros

3.2) Caldeira para geração de vapor, muito maior que a necessidade de potência para aquecimento de um vaso de 4.000 litros, custa aproximadamente R\$ 250.000,00.

**Conclusão:** Considerando o custo com energia para o aquecimento, o processo com o uso de biocatalisadores pode levar a redução de até 40% nos gastos com energia.