



ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO PARA PRODUÇÃO DE AROMA

Carolynne G. S. Santos¹; Geovanna S. L. Reis¹; Izis R. A. S. Vieira¹; Nadia Krieger², Marcelo Franco¹

¹ Grupo de Pesquisa em Biotransformação e Biocatálise Orgânica, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brasil.

² Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Departamento de Química. ACF Centro Politécnico Jardim das Américas 81531980 - Curitiba, PR - Brasil.

@gslreis.bqi@uesc.br

Palavras-Chave: Lipase B de *Candida antarctica*, Oleato de isoamila, Biocatálise.

Introdução

O crescimento das atividades industriais tem aumentado o consumo de recursos naturais e a geração de resíduos e poluentes, evidenciando a necessidade de processos mais sustentáveis. Nesse contexto, a Química Verde consolidou-se como uma estratégia para o desenvolvimento de tecnologias que minimizem impactos ambientais por meio da prevenção da poluição, da redução do consumo energético e da substituição de substâncias perigosas por alternativas mais seguras (ANASTAS e WARNER, 1998; SHELDON, 2016).

Entre as abordagens alinhadas a esses princípios, destaca-se a biocatálise enzimática, que permite a realização de reações sob condições brandas de temperatura, pressão e pH, apresentando elevada quimiosseletividade, regioseletividade e enantiosseletividade, além de menor formação de subprodutos quando comparada aos processos químicos convencionais. A imobilização enzimática contribui ainda para aumentar a estabilidade operacional e possibilitar a reutilização do biocatalisador, reduzindo custos e resíduos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; RODRIGUES; FERNANDEZ-LUFUENTE, 2010; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Entre as enzimas de maior interesse industrial, as lipases (EC 3.1.1.3) destacam-se pela capacidade de catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação e interesterificação em meios aquosos e não aquosos. A lipase B de *Candida antarctica* (CALB), comercializada como Novozym® 435, é amplamente empregada devido à elevada estabilidade, resistência a diferentes meios reacionais e possibilidade de reutilização, sendo utilizada na síntese de compostos de interesse para as indústrias de alimentos, cosméticos, fármacos e biocombustíveis (SHELDON e VAN PELT, 2013).

Entre os produtos obtidos por essa rota, o oleato de isoamila apresenta elevado interesse industrial por suas propriedades emolientes, estabilidade oxidativa e aplicações em formulações cosméticas e farmacêuticas. Sua produção por esterificação enzimática oferece



vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior seletividade, menor consumo energético e redução da geração de resíduos (YANG et al., 2022).

Entretanto, a eficiência dessas reações depende fortemente do meio reacional. Solventes orgânicos convencionais, como hexano, heptano e tolueno, favorecem a solubilização de substratos hidrofóbicos, porém apresentam elevada volatilidade, inflamabilidade e toxicidade, além de contribuírem para a emissão de compostos orgânicos voláteis (VOCs), contrariando os princípios da Química Verde (SHELDON, 2016).

Como alternativa, os Solventes Eutéticos Profundos (Deep Eutectic Solvents – DES) têm recebido crescente atenção por apresentarem baixa pressão de vapor, facilidade de preparo, elevada estabilidade química e potencial para substituir solventes orgânicos convencionais. Esses sistemas são formados pela combinação de um aceptor (HBA) e um doador de ligações de hidrogênio (HBD), sendo os sistemas à base de cloreto de colina os mais investigados em processos biocatalíticos (ABBOTT et al., 2003; SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014). Os Solventes Eutéticos Profundos Naturais (NADES) também têm despertado interesse por serem constituídos por metabólitos naturais e por apresentarem potencial para preservar a atividade enzimática. Contudo, propriedades como viscosidade, polaridade, teor de água e composição química influenciam diretamente a transferência de massa, a difusão dos substratos e o desempenho catalítico das lipases (CHOI et al., 2011; DAI et al., 2015; DURAND et al., 2020).

Apesar do avanço das pesquisas, ainda há elevada heterogeneidade quanto às formulações dos DES/NADES, às condições operacionais e aos métodos empregados para avaliação da conversão reacional, dificultando comparações entre os estudos. Além disso, permanecem escassas as investigações comparativas envolvendo diferentes sistemas eutéticos à base de cloreto de colina aplicados à síntese enzimática do oleato de isoamila sob condições experimentais padronizadas.

Diante desse cenário, esta dissertação tem como objetivo avaliar comparativamente a influência de solventes eutéticos profundos hidrofílicos constituídos por cloreto de colina:glicerol (1:2), cloreto de colina: etilenoglicol (1:2) e cloreto de colina: ureia (1:2), em comparação ao hexano, sobre a síntese enzimática do oleato de isoamila catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* imobilizada (Novozym® 435), investigando os efeitos do meio reacional sobre a conversão, a cinética da reação e o desempenho catalítico do biocatalisador, contribuindo para o desenvolvimento de processos mais eficientes e alinhados aos princípios da Química Verde.

Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biocatálise do Programa de Pós-Graduação em Química utilizando reagentes de grau analítico. A reação de esterificação entre ácido oleico e álcool isoamílico foi conduzida para obtenção de oleato de isoamila, empregando a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada (Novozym® 435) como biocatalisador. Como solvente convencional utilizou-se n-hexano (grau HPLC), enquanto os



solventes eutéticos profundos (DES) foram preparados a partir de cloreto de colina combinado com glicerol, etilenoglicol ou ureia na razão molar 1:2.

Inicialmente, o sistema cloreto de colina:glicerol (1:2) foi comparado ao n-hexano nas razões molares ácido oleico:álcool isoamílico de 1:1, 1:2 e 1:3. Após a definição da condição de melhor desempenho, os ensaios foram repetidos na razão 1:5. Posteriormente, os sistemas cloreto de colina:etilenoglicol (1:2) e cloreto de colina:ureia (1:2) foram avaliados nas mesmas condições para comparação entre os diferentes meios reacionais.

Os DES foram preparados por aquecimento convencional a 80 °C sob agitação por três horas, sendo o sistema cloreto de colina:glicerol também obtido por aquecimento assistido por micro-ondas. A formação dos solventes foi confirmada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

As reações foram conduzidas com 42 mg de Novozym® 435 e monitoradas por coletas nos tempos de 0, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 min. A conversão foi determinada pela quantificação do ácido oleico residual por titulação ácido-base com NaOH 0,03 mol L⁻¹. A partir dos resultados foram obtidas as curvas de conversão, a velocidade inicial e a atividade específica da enzima.

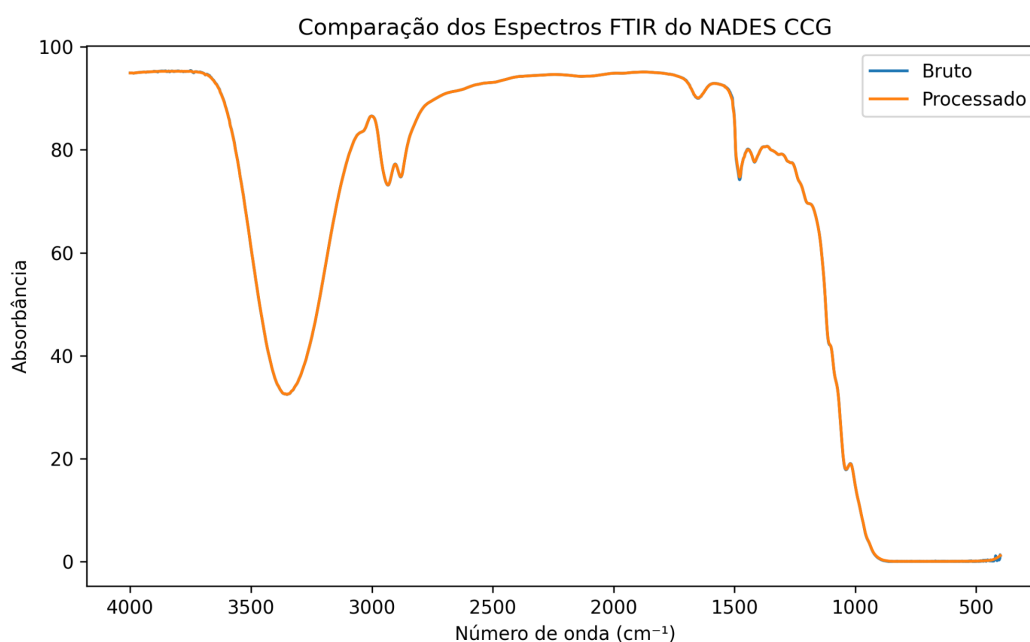
Após a definição da condição otimizada, a Novozym® 435 foi recuperada, lavada com tert-butanol, seca e reutilizada em ciclos consecutivos para avaliação da estabilidade operacional, sendo determinados a atividade residual, a recuperação mássica e a perda de atividade. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão e submetidos à ANOVA seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados e Discussões

A Figura 1 apresenta os espectros de infravermelho do sistema ChCl:Glicerol preparado pelos métodos convencional e assistido por micro-ondas. Observa-se elevada sobreposição entre os espectros, indicando que ambos os métodos produziram o mesmo sistema eutético profundo. Em ambos os casos, verificou-se o alargamento da banda entre 3200 e 3500 cm⁻¹, atribuída aos estiramentos O–H, evidenciando o estabelecimento de uma extensa rede de ligações de hidrogênio entre o cloreto de colina e o glicerol. Também foram observadas alterações nas bandas associadas às ligações C–O, confirmando a reorganização estrutural característica da formação do DES. Esses resultados demonstram que o aquecimento assistido por micro-ondas representa uma alternativa eficiente ao método convencional, reduzindo significativamente o tempo de preparo sem alterar a estrutura química do solvente.

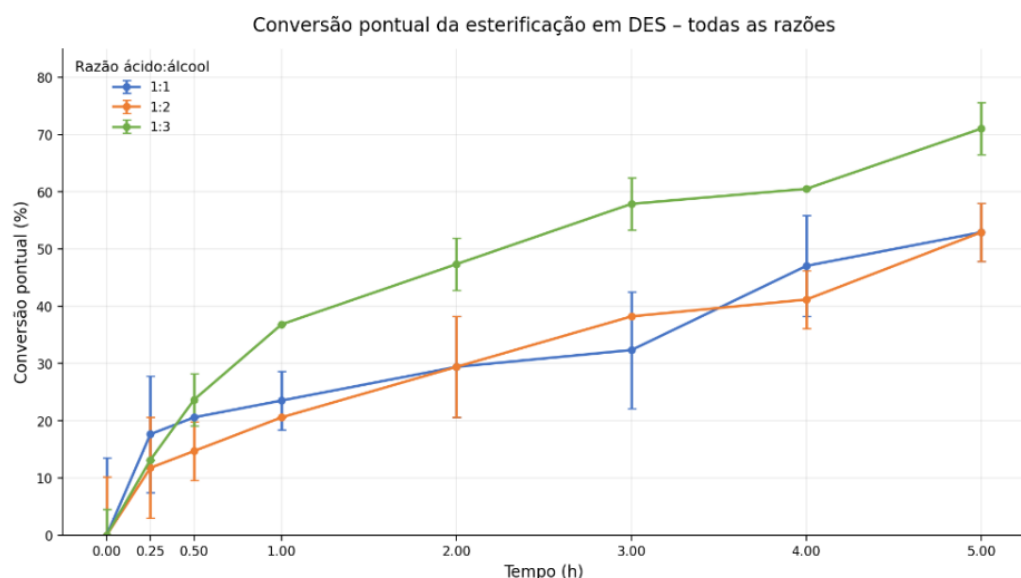


Figura 1 – Comparação dos espectros de FTIR do sistema ChCl:Glicerol obtido por aquecimento convencional e assistido por micro-ondas.



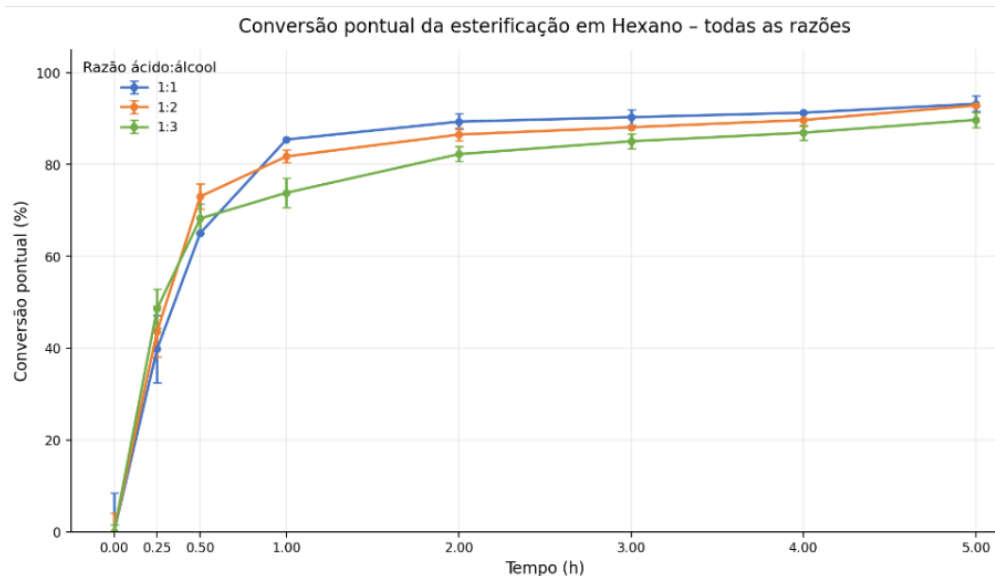
A Figura 2 mostra que o aumento da razão molar promoveu incremento gradual da conversão da reação no sistema eutético. Após cinco horas, a razão 1:3 atingiu aproximadamente 71% de conversão, enquanto as razões 1:1 e 1:2 apresentaram valores próximos de 53%. O efeito positivo do excesso de álcool está relacionado ao deslocamento do equilíbrio químico em direção à formação do éster, aumentando a disponibilidade do substrato alcoólico para a formação do intermediário acil-enzima. Apesar do aumento da conversão, observa-se que a velocidade inicial permaneceu inferior àquela normalmente observada em solventes orgânicos, comportamento atribuído à elevada viscosidade do DES, que reduz a difusão dos reagentes até o sítio ativo da enzima.

Figura 2 – Conversão da esterificação utilizando ChCl :Glicerol nas razões molares ácido oleico:álcool isoamílico de 1:1, 1:2 e 1:3.



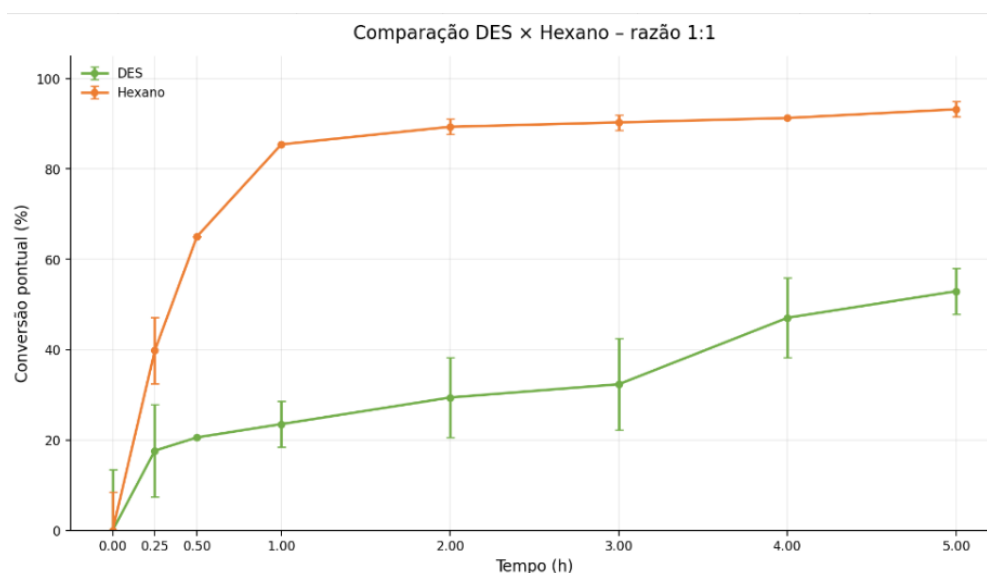
Em n-hexano (Figura 3), todas as razões molares apresentaram conversões superiores a 80% já nas primeiras horas de reação, alcançando valores finais entre aproximadamente 90 e 93%. Diferentemente do observado no DES, o aumento da razão molar exerceu influência menos pronunciada sobre a conversão final, indicando que, nesse meio, a transferência de massa não constitui um fator limitante. A baixa viscosidade do n-hexano favorece a rápida difusão dos substratos, proporcionando maior velocidade de formação do oleato de isoamila.

Figura 3 – Conversão da esterificação utilizando n-hexano nas razões molares ácido oleico:álcool isoamílico de 1:1, 1:2 e 1:3.

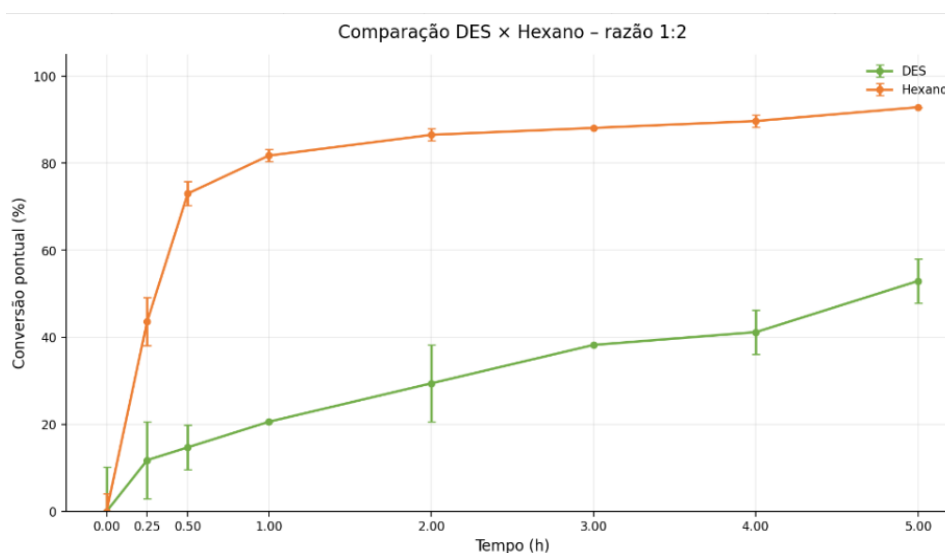


As Figuras 4-6 evidenciam que o n-hexano apresentou desempenho superior ao DES em todas as razões molares avaliadas. Na razão 1:1, a conversão final foi de aproximadamente 93% em n-hexano e 53% no DES. Resultado semelhante foi observado para a razão 1:2, enquanto na razão 1:3 a diferença foi reduzida, sendo obtidas conversões de aproximadamente 90% para o n-hexano e 71% para o DES.

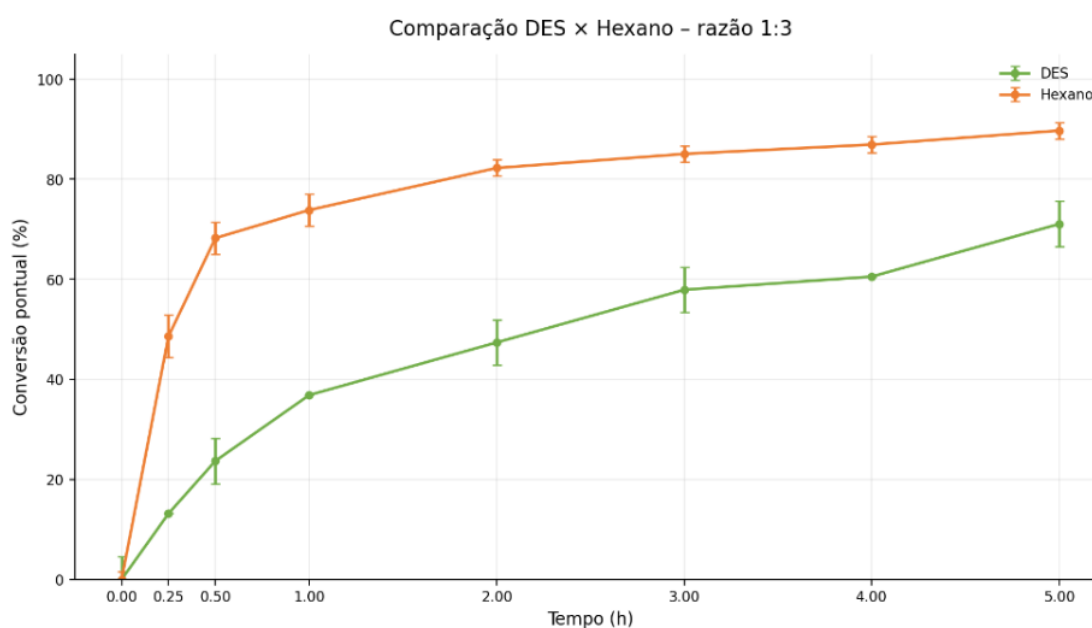
Figuras 4 – Comparação da conversão da esterificação em DES e n-hexano na razão molares 1:1



Figuras 5 – Comparação da conversão da esterificação em DES e n-hexano na razão molares 1:2



Figuras 6 – Comparação da conversão da esterificação em DES e n-hexano na razão molares 1:3

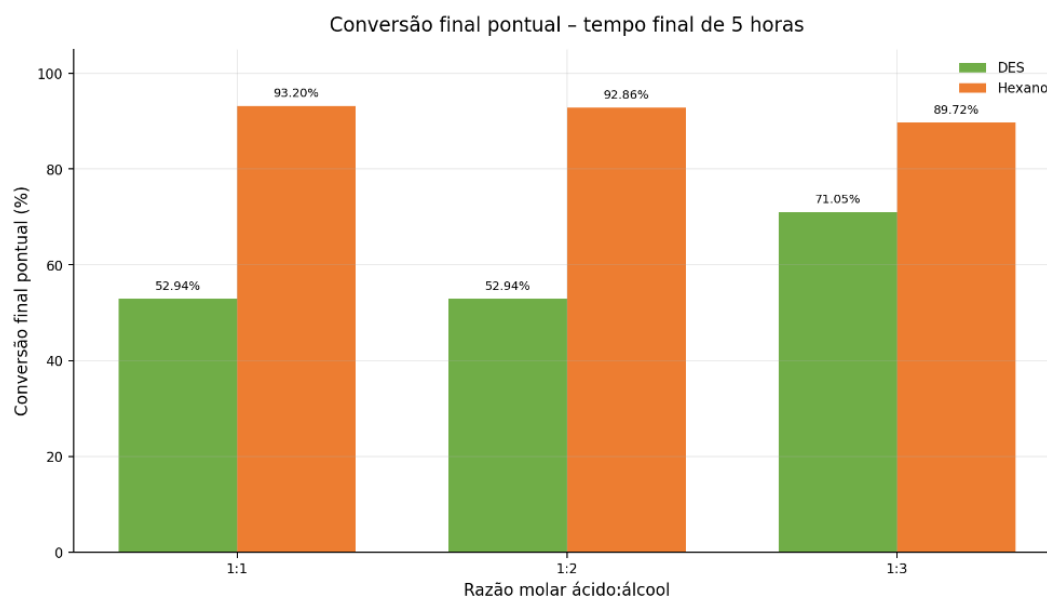


Embora o solvente convencional tenha promovido maior velocidade e maior conversão final, observa-se que o aumento da concentração de álcool favoreceu significativamente o desempenho do DES, reduzindo parcialmente a diferença entre os sistemas. Esse comportamento sugere que o excesso de álcool contribui para minimizar as limitações difusionais impostas pela maior viscosidade do solvente eutético.

A Figura 7 resume o desempenho final dos sistemas avaliados. Independentemente da razão molar utilizada, o n-hexano apresentou as maiores conversões finais. Entretanto, o DES apresentou aumento expressivo de rendimento quando utilizada a razão molar 1:3, alcançando aproximadamente 71%, resultado cerca de 34% superior ao observado nas razões 1:1 e 1:2. Esse comportamento confirma que a otimização da razão molar constitui uma estratégia eficiente para compensar parcialmente as limitações cinéticas associadas aos solventes eutéticos profundos.

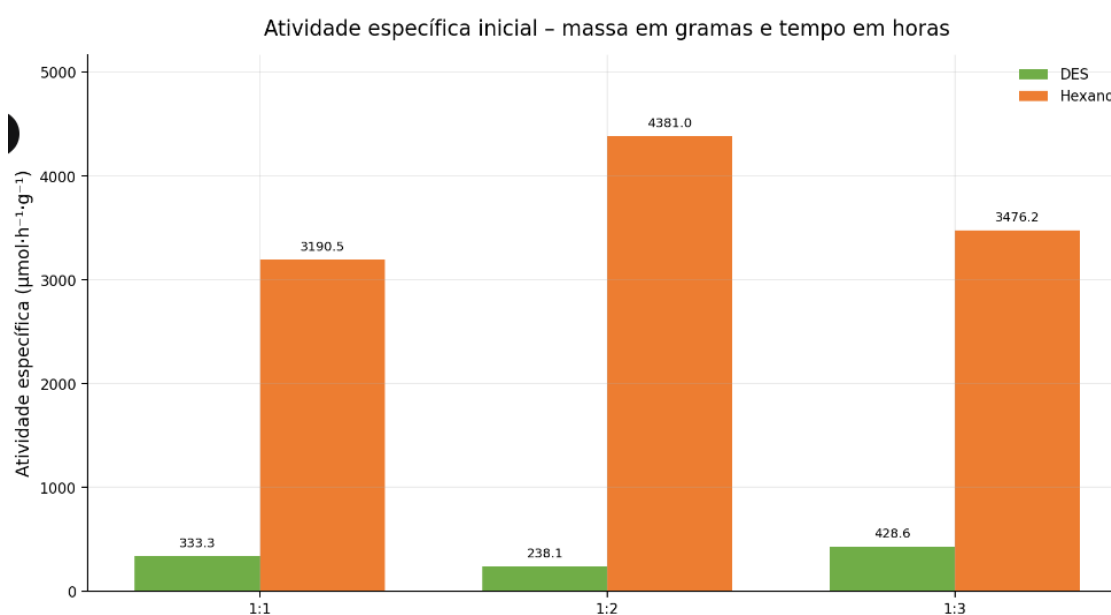


Figura 7 – Conversão final da esterificação após cinco horas utilizando DES e n-hexano.



A atividade específica inicial apresentou comportamento semelhante ao observado para a conversão da reação. Em todas as razões molares, o n-hexano proporcionou valores significativamente superiores aos obtidos no DES, atingindo aproximadamente $4381 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ na razão 1:2, enquanto o maior valor obtido no DES foi de aproximadamente $429 \mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ na razão 1:3.

Figura 8 – Atividade específica inicial da Novozym® 435 em DES e n-hexano





Esses resultados indicam que a menor viscosidade do n-hexano favorece a transferência de massa e aumenta a velocidade inicial da reação. Por outro lado, apesar da menor atividade inicial, o desempenho do DES melhorou com o aumento da concentração de álcool, sugerindo que parte das limitações impostas pelo meio reacional pode ser minimizada mediante a otimização das condições operacionais. Além disso, a literatura relata que solventes eutéticos profundos tendem a preservar melhor a estrutura tridimensional das lipases, favorecendo sua estabilidade operacional e potencial reutilização, características desejáveis para processos alinhados aos princípios da Química Verde.

Conclusões

Os resultados demonstraram que a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada (Novozym® 435) foi capaz de catalisar a síntese de oleato de isoamila tanto em n-hexano quanto em solventes eutéticos profundos (DES) à base de cloreto de colina e glicerol. A caracterização por FTIR confirmou a formação do sistema eutético e evidenciou que o preparo assistido por micro-ondas produziu um solvente estruturalmente equivalente ao obtido pelo método convencional, reduzindo significativamente o tempo de síntese.

O aumento da razão molar de álcool favoreceu a conversão da reação em ambos os meios, sendo a razão 1:3 a condição de melhor desempenho para o DES, com conversão aproximada de 71%. Embora o n-hexano tenha apresentado maior conversão e atividade específica inicial, atribuídas à menor viscosidade e maior eficiência na transferência de massa, a otimização da razão molar reduziu parcialmente essa diferença, indicando que as limitações cinéticas dos DES podem ser minimizadas por ajustes nas condições reacionais.

A atividade específica confirmou a influência do meio reacional sobre o desempenho catalítico da Novozym® 435, evidenciando a importância das propriedades físico-químicas do solvente na difusão dos substratos e na interação enzima-solvente. Apesar da menor velocidade inicial, os DES apresentam vantagens ambientais, como baixa pressão de vapor, reduzida inflamabilidade e menor toxicidade.

Assim, os resultados reforçam o potencial dos solventes eutéticos profundos como alternativas sustentáveis aos solventes orgânicos convencionais, demonstrando sua aplicabilidade em processos de biocatálise e indicando que futuras otimizações de sua composição e das condições operacionais poderão ampliar sua eficiência e viabilidade industrial.



Agradecimentos

Agradecemos à UESC e ao LaBioCat pelo apoio, infraestrutura e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências

- ABBOTT, A. P.; BOOTHBY, D.; CAPPELINI, D.; McKENZIE, K.; RYDER, K. S. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. **Journal of the Chemical Society**, Dalton Transactions, Cambridge, n. 1, p. 70–71, 2003.
- CHOI, Y. H.; VAN SPRONSEN, J.; DAI, Y.; VERBERNE, M.; HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; VERPOORTE, R. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? **Plant Physiology**, Rockville, v. 156, n. 4, p. 1701–1705, 2011.
- DAI, Y.; WITKAMP, G. J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chemistry, London**, v. 187, p. 14–19, 2015.
- DURAND, E.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Deep eutectic solvents: synthesis, application and focus on lipase-catalyzed reactions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 122, n. 10, e1900356, 2020.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.
- RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Candida antarctica* B: an ideal biocatalyst for the preparation of fine chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 66, n. 1–2, p. 15–32, 2010.
- SHELDON, R. A. Green chemistry and resource efficiency: towards a green economy. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 18, n. 11, p. 3180–3183, 2016.
- SHELDON, R. A.; PELT, S. VAN. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.
- SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. **Chemical Reviews**, Washington, v. 114, n. 21, p. 11060–11082, 2014.
- YANG, T.; ZHANG, H.; WANG, Y.; LI, X. Advances in enzymatic synthesis of fatty acid esters using deep eutectic solvents. **Catalysts**, Basel, v. 12, n. 4, 2022.