

Uso de solvente eutético como alternativa aos solventes orgânicos convencionais na síntese enzimática de oleato de xilose.

Leonardo de Souza^{1*}, Paulo Waldir Tardioli¹.

¹ Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís, km 235, São Carlos, São Paulo, 13565-905, Brasil.

*leosouzaengbio@outlook.com.

Resumo/Abstract

RESUMO - Os ésteres de açúcares (EAs) são compostos anfífilos com propriedades surfactantes, emulsificantes e estabilizantes, amplamente aplicados nas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica. Recentemente, ésteres derivados de açúcares de cinco carbonos (C5-EAs) vêm despertando interesse devidos às suas propriedades antimicrobianas e lubrificantes. A baixa solubilidade dos açúcares em solventes orgânicos representa um desafio para a síntese dos EAs. Nesse contexto, solventes eutéticos profundos, do inglês *deep eutectic solvents* (DES), especialmente aqueles compostos por açúcares, surgem como alternativa promissora, devido à sua biodegradabilidade e baixa toxicidade. Além disso, os DES à base de açúcares podem atuar simultaneamente como solvente e substrato na síntese de EAs. O presente estudo avaliou o uso de DES baseados em xilose como solvente na síntese de oleato de xilose. Os resultados mostraram que a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em Lewatit VP OC 1600 (N435) apresentou maior estabilidade térmica em DES, mantendo cerca de 94% da atividade hidrolítica. Em contraste, nos solventes metiletilcetona (MEC) e álcool terc-butilico (TERC), observou-se uma redução de 27% e 40% na atividade, respectivamente. A avaliação do tipo de agitação em diferentes temperaturas indicou que a agitação com um impelidor do tipo pás planas a 60 °C permitiu maior conversão de substrato. Após 24 horas, as reações utilizando os três solventes alcançaram cerca de 17 % de conversão de ácido oleico. Desta forma, este estudo permitiu avaliar a produção de EAs em meio reacional composto por solvente eutético à base de xilose, comparando seu desempenho com solventes convencionais.

Palavras-chave: Ésteres de açúcar, éster graxo de xilose, solvente eutético, oleato de xilose.

ABSTRACT - Sugar esters (SEs) are amphiphilic compounds with surfactant, emulsifying, and stabilizing properties, widely used in the cosmetic, food, and pharmaceutical industries. Recently, esters derived from five-carbon sugars (C5-SEs) have attracted increasing interest due to their antimicrobial and lubricant properties. However, the low solubility of sugars in organic solvents presents a challenge for SEs synthesis. In this context, deep eutectic solvents (DESs), especially those composed of sugars, have emerged as promising alternatives due to their biodegradability and low toxicity. Additionally, sugar-based DESs can act simultaneously as both solvents and substrates in SE synthesis. This study evaluated the use of a xylose-based DES as a solvent in the synthesis of xylose oleate. The results showed that lipase B from *Candida antarctica* immobilized on Lewatit VP OC 1600 (N435), exhibited greater thermal stability in the DES, retaining approximately 94% of its hydrolytic activity. In contrast, when using methyl ethyl ketone (MEK) and tert-butyl alcohol (TERC), enzymatic activity decreased by 27 and 40%, respectively. An evaluation of agitation methods at different temperatures indicated that using a flat-blade impeller at 60 °C led to higher substrate conversion. After 24 hours, the reactions in all three solvents achieved approximately 17% conversion of oleic acid. Thus, this study demonstrated the feasibility of producing SEs using a reaction medium based on a xylose-derived eutectic solvent and compared its performance with that of conventional solvents.

Keywords: Sugar esters, xylose sugar ester, deep eutectic solvent, xylose oleate.

Introdução

Os ésteres de açúcares (EAs) são moléculas formadas pela ligação de açúcares a ácidos graxos por meio de ligações éster. Essas moléculas são anfífilas, não aniônicas e apresentam grande interesse industrial devido às suas propriedades surfactantes, emulsificantes e estabilizantes [1].

Além disso, os EAs são biodegradáveis, inodoros, não irritantes, não tóxicos e apresentam grande aplicabilidade na indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica [1,2]. Dentre

os EAs produzidos globalmente, destacam-se os ésteres de glicose e sacarose [2]. No entanto, ésteres formados por açúcares de cinco carbonos (C5-EAs) vêm ganhando destaque no meio científico e industrial, devido às suas ótimas propriedades lubrificantes e antimicrobianas, sendo considerados promissores para formulações de hidratantes de pele [2].

Uma das limitações na EAspor via enzimática é a baixa solubilidade dos açúcares em solventes orgânicos [3]. Para superar essa limitação, tem-se proposto o uso de uma nova

geração de solventes, como os líquidos iônicos e os solventes eutéticos [4,5].

Os solventes eutéticos, do inglês *deep eutectic solvent* (DES), são misturas de dois ou três compostos, que atual como doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, apresentando ponto de fusão mais baixo ao de seus componentes puros [4–6]. Os DES se apresentam como alternativas promissoras aos solventes orgânicos, devido à propriedades como não toxicidade, biodegradabilidade, não inflamabilidade e não volatilidade [7,8].

DES à base de açúcares podem atuar simultaneamente como solventes e substratos na síntese de EAs, possibilitando o uso de um meio reacional anidro contendo açúcares e ácidos graxos, favorecendo as reações de esterificação catalisadas por lipases [4,5,8].

Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar a produção de ésteres de açúcares em meio reacional composto por solvente eutético à base de xilose, além de comparar seu desempenho com o de solventes convencionais.

Experimental

Solubilização da xilose em solventes orgânicos

Soluções de xilose foram preparadas em metiletilcetona (MEC) e álcool terc-butilico (TERC) (ambos adquiridos da Sigma Chem. Co, St. Louis, EUA), nas concentrações de 7 mM e 30 mM, respectivamente, com base na solubilidade do açúcar em cada solvente [3,9]. As soluções foram mantidas a 60 °C por 24 horas, sob agitação contínua a 200 rpm em agitador magnético com aquecimento (Modelo PC-420D, CORNING, NY, EUA), para garantir a solubilização completa da xilose.

Preparo do Solvente Eutético baseado em xilose

O solvente eutético profundo (DES) à base de xilose foi obtido pela mistura equimolar de xilose e cloreto de colina (ambos adquiridos da Sigma Chem. Co, St. Louis, EUA), sob agitação a 70 °C em frasco fechado, sem adição de água. A mistura foi mantida sob agitação (agitador magnético com aquecimento, modelo PC-420D, Corning) por aproximadamente duas horas, até a formação de um líquido homogêneo e transparente [10].

Síntese enzimática de oleato de xilose

A síntese do oleato de xilose foi realizada por meio da esterificação enzimática entre xilose comercial e ácido oleico (C18:1), nas razões molares de 1:4 e 1:5 (xilose:ácido oleico), utilizando MEC, TERC e DES como meios de solubilização da xilose. O biocatalisador utilizado foi a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em Lewatit VP OC 1600 (N435, Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA). As reações foram conduzidas em reator encamisado, equipado com impelidores do tipo pás planas ou fluxo em vórtice, a

60 °C, 550 rpm, com carga de 500 TBU/g xilose. As amostras foram coletadas nos tempos de 0 e 24 horas, e a concentração de ácido oleico foi medida por cromatografia gasosa [3,9]. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

Atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica dos biocatalisadores foi determinada pela hidrólise da tributirina (Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA) em tampão fosfato 100 mM (pH 7,3), a 37 °C, durante 300 segundos. A quantidade de ácido butírico liberado foi titulada com KOH 20 mM, utilizando um titulador pH-Stat (modelo Titrando 907, (Metrohm, Herisau, Suíça). A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de ácido butírico produzido por minuto. Uma unidade de atividade hidrolítica da tributirina (TBU) foi definida como a taxa de micromoles de ácido butírico produzidos por minuto, nas condições descritas. O método foi adaptado de Beisson *et al.* [11].

Determinação de ácido oleico

A concentração de ácido oleico nas amostras do meio reacional foi quantificada por cromatografia gasosa, utilizando um equipamento Agilent, modelo 7890A, equipado com detector de ionização por chama (FID) e coluna HP INNOWAX (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A separação dos compostos foi realizada usando um programa de temperatura escalonado, com hélio como gás de arraste, totalizando 14 minutos de corrida [3].

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A presença de EAs foi confirmada por cromatografia em camada delgada (CCD), realizada em três etapas de eluição, com diferentes sistemas solventes, conforme descrito por Ducret *et al.* [12]. As placas foram reveladas na presença de iodo.

Resultados e Discussão

A escolha do solvente é uma etapa crítica na composição do meio reacional para a produção de EAs. A baixa solubilidade dos açúcares em solventes orgânicos apolares, aliada ao efeito desnaturante dos solventes orgânicos polares sobre as enzimas, dificulta a seleção de um meio que permita simultaneamente alta solubilidade dos substratos e estabilidade do biocatalisador [13–17].

A Figura 1 apresenta os dados de termoestabilidade da N435 nos três solventes avaliados neste estudo. Após seis horas na presença de MEC, a N435 apresentou redução de 27% em sua atividade hidrolítica. Na presença de TERC a redução foi de 40%. Por outro lado, foi observada uma redução mínima, de cerca de 7%, quando a N435 foi incubada no DES.

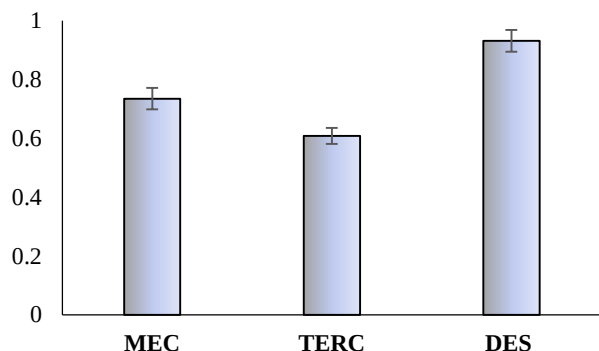


Figura 1. Atividade hidrolítica residual do biocatalisador N435 na presença de metiletilcetona (MEC), álcool terc-butilico (TERC) e solvente eutético (DES) a 60°C por 6 horas.

Esses resultados sugerem o potencial do DES como solvente na síntese enzimática de EAs, dado que, além de possibilitar maior termoestabilidade ao biocatalisador, proporciona uma solubilidade significativamente maior do açúcar (cerca de 10 vezes superior em relação ao TERC e 100 vezes maior que no MEC) [12].

Para avaliar a viabilidade do uso do DES na síntese de oleato de xilose, avaliou-se a conversão do ácido oleico em diferentes temperaturas, bem como o efeito de dois modos de agitação: com impelidores de pás planas e de fluxo em vórtice, conforme apresentado na Figura 2.

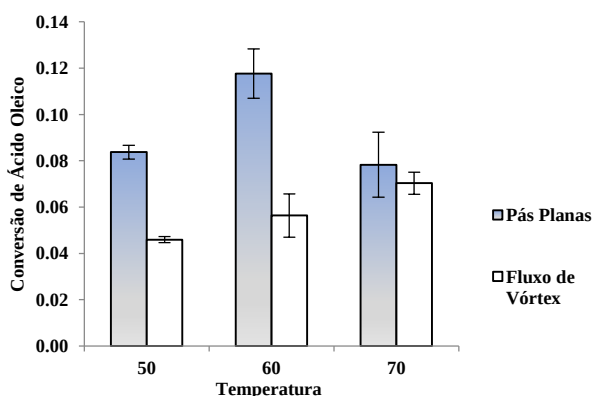


Figura 2. Conversão de ácido oleico na reação catalisada por N435 em diferentes temperaturas, em reatores com impelidores do tipo pás planas e fluxo em vórtice, utilizando razão molar de substratos de 1:4 (xilose:ácido oleico)

O uso do impelidor de fluxo em vórtice resultou na maior conversão de ácido oleico a 70 °C, com cerca de 7%. No entanto, o impelidor de pás planas proporcionou maior conversão a 60 °C, atingindo 11,77%. Considerando apenas a formação de monoésteres, a conversão máxima teórica de

ácido oleico seria de 25%, dada a razão molar de 1:4 (xilose:ácido oleico).

As reações conduzidas com DES e agitação por pás planas resultaram em conversões superiores em todas as temperaturas, comparadas às conduzidas com agitação em vórtice, sendo o desempenho a 60°C duas vezes maior com pás planas.

A síntese de oleato de xilose foi também realizada utilizando MEC, TERC e DES como solventes, a 60 °C, com impelidores do tipo pás planas. Os valores de conversão de ácido oleico após 24 horas de reação estão apresentados na Figura 3.

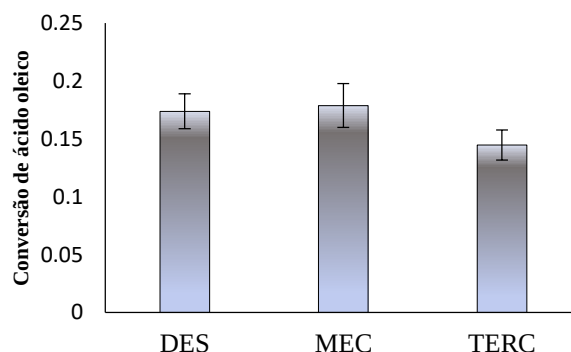


Figura 3. Conversão de ácido oleico na reação catalisada por N435 a 60 °C com impelidor de pás planas, utilizando metiletilcetona (MEC), álcool terc-butilico (TERC) e solvente eutético (DES) como solventes. Razão molar de substratos: 1:5 (xilose:ácido oleico).

A conversão obtida com MEC foi de 17,8% após 24 horas. Gonçalves *et al.* [3] relataram conversão de 20% sob as mesmas condições de substratos (razão molar 1:5, xilose:ácido oleico), temperatura (60°C), concentração enzimática (0,5% m/m de N435 por grama de xilose) e agitação tipo vórtice, também utilizando MEC como solvente.

Com TERC, a conversão foi de 14,46% após 24 horas. Vescovi *et al.* [9] alcançaram 69% de conversão de xilose em 24 horas de reação utilizando TERC, na mesma proporção molar de substratos (1:5, xilose:ácido oleico), a 60°C, 51 unidades de esterificação de lipase pancreática suína adsorvida em octil-sílica, e agitação em shaker.

Utilizando o DES como solvente, a conversão de ácido oleico após 24 horas foi de 17,37%, valor comparável ao obtido com MEC e superior ao obtido com TERC.

Esses resultados reforçam o potencial dos DES à base açúcares na síntese de EAs. O uso de DES representa uma alternativa ambientalmente amigável, derivada de matérias-primas renováveis e de baixo custo, como a biomassa

lignocelulósica, o que amplia seu potencial para aplicações em processos biocatalíticos [3,9].

A formação de ésteres foi confirmada em cromatografia de camada delgada, conforme a metodologia descrita por Ducret *et al.* [12]. O éster obtido em MEC foi precipitado segundo a metodologia descrita por Gonçalves *et al.* [3] e aplicado na placa juntamente com uma alíquota da reação realizada com DES. Os resultados são apresentados na Figura 4.



Figura 4. Cromatografia de camada delgada das amostras de: (1) ácido oleico, (2) reação com DES como solvente, e (3) éster obtido segundo Gonçalves *et al.* [3].

As bandas observadas na linha 2 da Figure 4 sugerem a formação de mono- e diésteres, evidenciada pela presença de múltiplas bandas distintas a do ácido oleico. A produção de mono- e diésteres também foi relatada por Gonçalves *et al.* [3], utilizando MEC como solvente.

Os resultados apresentados neste estudo demonstram a viabilidade do uso de DES à base de xilose como solvente na síntese de oleato de xilose, com desempenho comparável ou superior aos solventes convencionais avaliados.

Conclusões

Os resultados deste estudo demonstraram que a lipase B de *Candida antarctica*, imobilizada em Lewatit VP OC 1600 (N435), foi capaz de catalisar a síntese de oleato de xilose em diferentes meios reacionais. Embora diferentes solventes orgânicos tenham sido testados, o uso de solventes eutéticos profundos (DES) à base de xilose apresentou vantagens significativas, como maior estabilidade térmica do biocatalisador N435, maior solubilidade de xilose, além de poderem ser derivados de matérias-primas naturais, renováveis e de baixo custo. Esses fatores reforçam o potencial do DES como alternativa sustentável e eficiente para a produção enzimática de ésteres de açúcares.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processos 316480/2023-1 e 160760/2022-4).

Referências

- 1 Y. Zheng, M. Zheng, Z. Ma, B. Xin, R. Guo, X. Xu, 2015, *Biol. Chem. Technol.*, 63, 215–243.
- 2 P. Tracy, D. Dasgupta, S. More, *Ind. Crops Prod.*, 2023, 193, 116170..
- 3 M.C. Gonçalves, J.C. Amaral, R. Fernandez-Lafuente, R.D. Sousa Junior, P.W. Tardioli, 2023, *Molecules*, 26, 261.
- 4 E. Durand, J. Lecomte, P. Villeneuve, 2013, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 115, 379.
- 5 S. Siebenhaller, J. Kirchhoff, F. Kirschhöfer, G. Brenner-Weiß, C. Muhle-Goll, B. Luy, F. Haitz, T. Hahn, S. Zibek, C. Sylatk, K. Ochsenreither, 2018, *Front. Chem.*, 6, 421.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00421>.
- 6 R. Semproli, S.N. Chanquia, J.P. Bittner, S. Müller, P. Domínguez de María, S. Kara, D. Ubiali, 2023, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 11, 5926–5936.
- 7 H. Zhao, C. Zhang, T.D. Crittle, 2013, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 85–86, 243–247.
- 8 M. Shehata, A. Unlu, U. Sezerman, E. Timucin, 2020, *J. Phys. Chem. B*, 124, 8801–8810.
- 9 V. Vescovi, J.B.C. dos Santos, P.W. Tardioli, 2017, *Biocatal. Biotransformation*, 35, 298–305.
- 10 Y. Dai, J. van Spronsen, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, 2013, *Anal. Chim. Acta*, 766, 61–68.
- 11 F. Beisson, A. Tiss, C. Rivière, R. Verger, 2000, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 102, 133–153.
- 12 A. Ducret, A. Giroux, M. Trani, R. Lortie, 1995, *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 214–221.
- 13 Y. Qi, M. Chen, T. Jin, W. Chong, Z. Zhang, B. Nian, Y. Hu, 2024, *Trends Food Sci. Technol.*, 144, 104323.
- 14 A.R. Buzatu, M.A. Soler, S. Fortuna, O. Ozkilinc, D.M. Dreavă, I. Bîtcă, V. Badea, P. Giannozzi, F. Fogolari, L. Gardossi, F. Peter, A. Todea, C.G. Boeriu, 2024, *Catal. Today*, 426, 114373.
- 15 A. Kumar, K. Dhar, S.S. Kanwar, P.K. Arora, 2016, *Biol. Proced. Online*, 18, 2.
- 16 H. Cao, K. Nie, H. Xu, X. Xiong, R. Krastev, F. Wang, T. Tan, L. Liu, 2016, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 133, S400–S409.
- 17 M. Martin del Campo, O. Gómez-Secundino, R.M.



- 18 Camacho-Ruíz, J.C. Mateos Díaz, M. Müller-Santos, J.A. Rodríguez, 2023, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, 1868, 159380.
- M.C.P. Gonçalves, J.C. Amaral, L.A. Lopes, R. Fernandez-Lafuente, P.W. Tardioli, 2021, *Int. J. Biol. Macromol.*, 192, 665–674.