

# SIMULAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE CONDIÇÕES OPERACIONAIS DA CINÉTICA ENZIMÁTICA DA PRODUÇÃO DE PALMITATO DE CETILA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

Natália Allana Cirillo<sup>1</sup>  
Fernando Augusto Pedersen Voll<sup>2\*</sup>  
Marcos Lúcio Corazza<sup>3</sup>

1 - Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba - PR

2 – Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba - PR, fernando\_voll@ufpr.br

3 - Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba – PR

**Resumo:** O palmitato de cetila é o componente principal de algumas ceras naturais, como das provenientes do crânio de cachalotes, superfícies de plantas, colmeias e folhas de carnaúba. Industrialmente, é utilizado sobretudo na produção de cosméticos e produtos de higiene pessoal. Como a exploração a partir de fontes naturais não é vantajosa técnica e economicamente, a produção sintética através da catálise enzimática de reações de esterificação tornou-se necessária. Este trabalho tem por objetivo a simulação do comportamento reacional da síntese do palmitato de cetila em ampla faixa de condições de operação. Utilizado um modelo cinético baseado no mecanismo bi bi sequencial aleatório de 6 parâmetros, foram analisadas a influência da concentração de catalisador, da temperatura e da razão molar. A cinética racional não apresentou comportamento linear em relação a nenhum dos três parâmetros analisados, indicando que quantidades excessivas de catalisador, altas temperaturas e excesso de um dos reagentes, além de não favorecerem a reação, aumentam os custos de operação.

**Palavras-chave:** esterificação; ésteres de cera, lipase imobilizada; sistemas livres de solvente; modelagem cinética.

## Introdução

Ceras são ésteres de cadeia longa (12 carbonos ou mais), com alto valor agregado e alto grau de biodegradabilidade. Dentre as aplicações industriais das ceras, destacam-se a produção de lubrificantes, cosméticos, produtos de higiene pessoal, fármacos, revestimentos para madeira, agentes antiespumantes, tintas para impressão e vernizes [1]. São encontradas na natureza na superfície de frutas, no crânio de baleias cachalote (*Physeter macrocephalus*), nas folhas de carnaúba (*Copernicia cerifera*) e em colmeias [2]. Apesar de sua alta disponibilidade, sua obtenção a partir de fontes naturais é complicada, de acesso limitado, e geralmente de custo elevado, o que motiva a produção sintética das ceras.

O éster palmitato de cetila é o componente primário da cera encontrada na cavidade cranial das baleias cachalote e em corais. Industrialmente, é utilizado na produção de cosméticos, pois tem característica emoliente que lubrifica e condiciona a pele. É utilizado como surfactante em xampus, como agente emulsionante e espessante em cremes e adiciona textura a vários produtos de maquiagem, geralmente nos que são em formato de bastão [3].

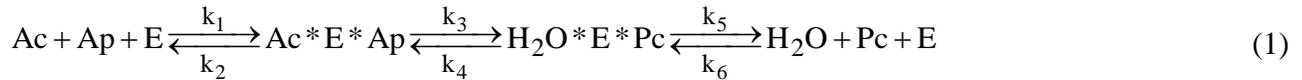
O método mais comum para a síntese de palmitato de cetila é a catálise enzimática. Muitas enzimas apresentam boa atividade catalítica em solvente orgânico e diversos trabalhos podem ser encontrados na literatura referentes a esse tema [4–7]. Contudo, há crescente preocupação com que os processos químicos sejam eficientes e amigáveis ao meio ambiente, e que o produto seja livre de contaminação. Por esse motivo, o uso de sistemas livres de solvente é preferível.

Pesquisas científicas mostraram que as enzimas comerciais imobilizadas costumam fornecer bons rendimentos para a produção de diversos tipos de ésteres, mesmo em sistemas livres de solvente. As enzimas mais amplamente utilizadas na catálise enzimática de éster são as comerciais, como a *Lipozyme RM IM*<sup>®</sup> (lipase imobilizada 1,3 específica de *Rhizomucor miehei*) [8], *Novozym 435*<sup>®</sup> (lipase imobilizada de *Candida antarctica* B) [8–14], *Lipozyme TL IM*<sup>®</sup> (lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus*) [15,16]. Como geralmente possuem custo elevado, é necessário encontrar condições de operação que favoreçam ao máximo a cinética da reação. Esses

fatores contribuem para um processo sem custos excessivos e com produto de maior qualidade, mais viável a atrativo industrialmente. Com base nessas informações, o objetivo deste trabalho é a simulação do comportamento cinético da síntese de palmitato de cetila, catalisada pela enzima *Lipozyme RM IM*<sup>®</sup>, sob ampla faixa de variação de temperatura da reação, concentração de enzimas e razão molar entre os reagentes, a partir de um modelo cinético previamente desenvolvido, baseado no mecanismo bi bi sequencial randômico.

## Materiais e Métodos

Para desenvolvimento deste trabalho, foi utilizado um modelo cinético enzimático baseado no mecanismo bi bi sequencial randômico, que descreve a síntese de ésteres a partir da reação de esterificação de dois substratos, gerando dois produtos. Nesse caso os substratos são o ácido palmítico e o álcool cetílico e os produtos gerados são o palmitato de cetila e a água. Esse mecanismo infere que não há ordem específica de ligação dos substratos à enzima e de liberação dos produtos. A equação que representativa deste mecanismo, incluindo a formação dos intermediários, pode ser descrita pela Eq. 1. Considerando que os sítios ativos da enzima podem sofrer inibição reversível de segunda ordem por parte dos quatro componentes presentes no sistema, as equações que representam essas inibições (Eqs. 2 a 5) devem ser consideradas.



Baseado nas Eqs. 1 a 5, a modelo cinético utilizado foi desenvolvido por Cirillo, 2018 [17], contendo 6 parâmetros ajustados a partir de 48 pontos experimentais, conforme apresentado nas Eqs. 6 a 10, onde  $[E_t^m]$  é a concentração mássica de enzima livre total do sistema.

$$\frac{d[Ap]}{dt} = \frac{-[E_t^m] \exp(-k_c[E_t^m])(V_1[Ac][Ap])}{1 + K_3[Ac]^2 + K_4[Ap]^2} \quad (6)$$

$$\frac{d[Ac]}{dt} = \frac{d[Ap]}{dt} \quad (7)$$

$$\frac{d[H_2O]}{dt} = -\frac{d[Ap]}{dt} \quad (8)$$

$$\frac{d[Pc]}{dt} = -\frac{d[Ap]}{dt} \quad (9)$$

$$V_1 = P_1 \{1 - \exp[-Q_1(T - T_{ref})]\} \quad (10)$$

O parâmetro  $k_c$  do termo exponencial da Eq. 6 corrige os efeitos de limitação de transferência de massa que podem ocorrer quando altas concentrações de enzimas são utilizadas. Em excesso, as enzimas podem formar aglomerados e dificultar o acesso dos substratos aos sítios ativos, afetando a cinética reacional. [14,18]. Os parâmetros  $K_3$  e  $K_4$  representam a inibição causada pelos produtos álcool cetílico e ácido palmítico, respectivamente. O parâmetro  $V_1$  representa a velocidade da reação de esterificação, que pode ser calculada a partir da Eq. 10 em função da temperatura. A Eq. 10 foi proposta por Cirillo, 2018 [17] para descrever o comportamento das reações enzimáticas até condição de temperatura máxima de operação, onde a velocidade de reação atinge valor máximo. Para temperaturas além da máxima, há início de desativação térmica da enzima. Na Eq. 10, o parâmetro  $T_{ref}$  representa a temperatura na qual a velocidade de reação é zero.

A Tabela 1 apresenta os valores dos 6 parâmetros do modelo, incluindo incertezas com 95% de confiança. O modelo apresenta RMSD de predição de 2,071%, indicando boa capacidade preditiva da síntese do palmitato de cetila [17].

Tabela 1. Valores dos parâmetros do modelo Fonte: adaptado de Cirillo, 2018 [17].

Parâmetro	Unidade	Valor $\pm$ Incerteza*
$P_1$	$\frac{g_{substrato}^2}{mmol_{substrato} \cdot mg_{enzima} \cdot h}$	$0,59 \pm 0,14$
$Q_1$	$K^{-1}$	$0,089 \pm 0,016$
$K_3$	$\frac{g_{substrato}^2}{mmol_{substrato} \cdot mmol_{enzima}}$	$1,350 \pm 0,033$
$K_4$	$\frac{g_{substrato}^2}{mmol_{substrato} \cdot mmol_{enzima}}$	$0,90 \pm 0,29$
$k_c$	$\frac{g_{substrato}}{mg_{enzima}}$	$0,0096 \pm 0,0088$
$T_{ref}$	$K$	$322,6 \pm 2,1$

\* Incerteza com 95% de confiança.

Para simulação das diferentes condições de operação, o modelo cinético foi implementado no *software* Matlab, onde a sub-rotina *ode23s* foi utilizada para solução do sistema de equações diferenciais. As faixas de condições utilizadas foram baseadas nas condições ótimas de operação encontradas para esse sistema, que são 70 °C, 1,0% de enzima (massa enzima/massa substratos) e razão molar (álcool:ácido) de 1:1 em 3 horas de reação [17].

Como os reagentes são sólidos em temperatura ambiente, a temperatura mínima de reação é limitada pelo ponto de fusão da mistura dos reagentes. O diagrama de fases binário (álcool cetílico e ácido palmítico) indica que a 60 °C a mistura está em fase líquida para qualquer proporção (razão molar) entre os compostos [19]. Por outro lado, sabe-se que temperatura máxima de operação recomendada para esse sistema é em torno de 87 °C [17]. Dessa forma, a faixa de temperatura adotada variou de 60 °C até 87 °C.

A concentração de enzima foi variada de 0,1% até 2,8% para contemplar desde a condição onde quantidade de enzima é mínima, onde se espera que a cinética seja lenta, até a condição onde a quantidade de enzima é 2,8 vezes maior que a quantidade ótima, evidenciando os possíveis efeitos do uso de concentrações excessivas de enzimas. A razão molar (álcool:ácido) foi variada de 0,1:1 até 2,8:1 para análise do efeito de excesso dos dois reagentes.

## Resultados e Discussões

O primeiro parâmetro analisado foi a influência da concentração de catalisador, para duas condições distintas de temperatura, mantendo a razão molar de 1:1 (estequiométrica) fixa, conforme Fig. 2 e Fig. 3. É possível observar em ambos os casos que uma variação linear na concentração de catalisador não gera um aumento linear na conversão. Esse fato pode ser explicado pela formação dos aglomerados que são gerados quando quantidades excessivas de enzima são usadas, o que dificulta acesso dos substratos aos sítios ativos. Como as enzimas comerciais possuem alto custo, o

aumento indiscriminado da concentração de catalisador, além de não gerar ganhos proporcionais na velocidade de reação, aumentam o custo do processo.

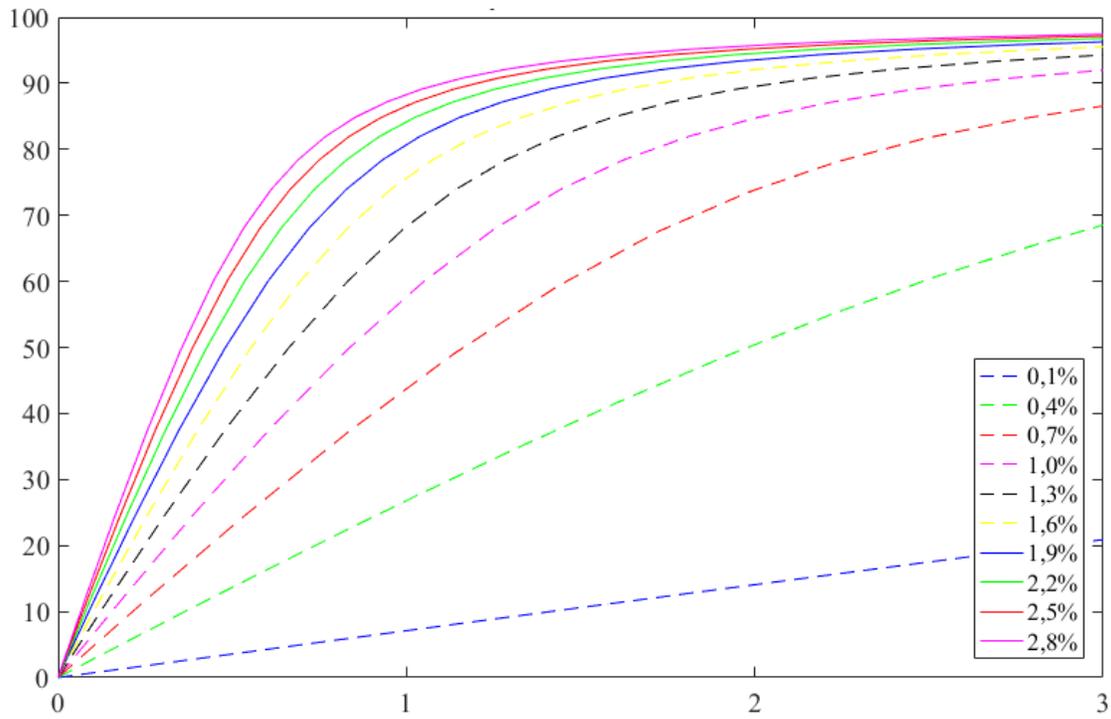


Figura 2. Influência da concentração de catalisador. Condições: 60°C, RM 1:1.

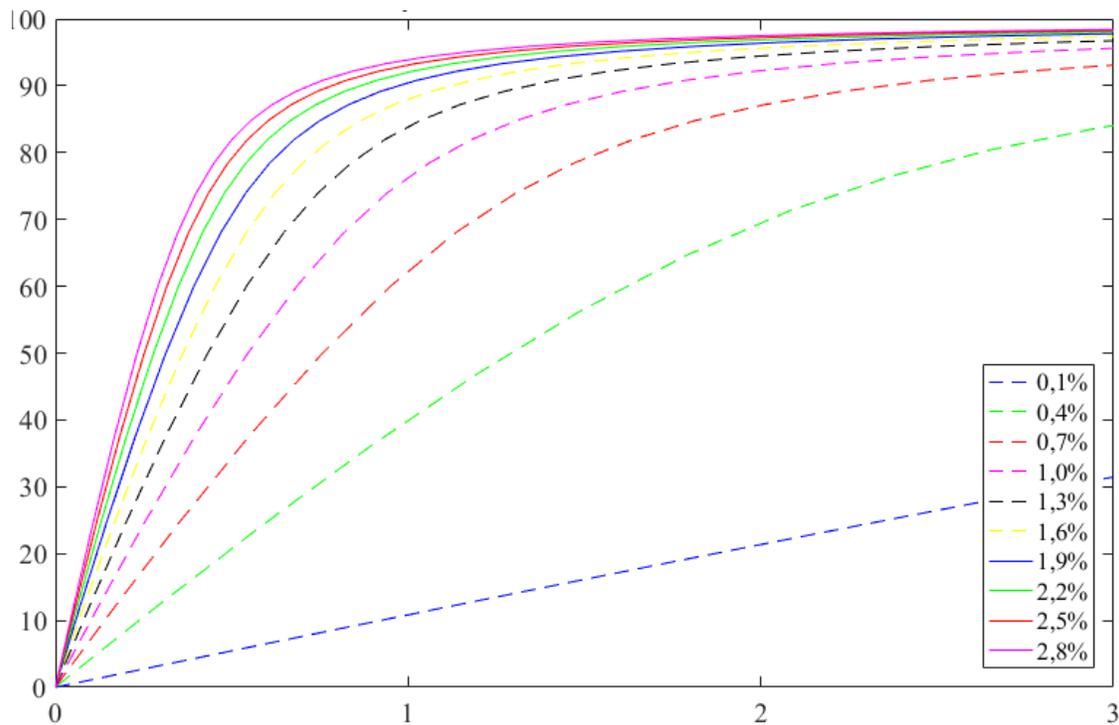


Figura 3. Influência da concentração de catalisador. Condições: 80°C, RM 1:1.

Na Fig. 3, onde a temperatura é de 80 °C é possível notar que a condição de equilíbrio é atingida em torno de 1,2 horas de reação (para concentrações de catalisador acima de 1,6%), enquanto que na Fig. 2, a conversão de equilíbrio é atingida apenas após 2,5 horas de reação.

Experimentalmente, concentrações mais baixas de catalisador poderiam ser compensadas com temperaturas mais altas de operação, e vice versa.

O segundo parâmetro analisado foi a influência da razão molar dos reagentes para duas condições distintas de concentração de catalisador (0,5% e 2,0% m/substratos), ambas a 70°C. As Figuras 4 e 5 apresentam os resultados obtidos para a simulação.

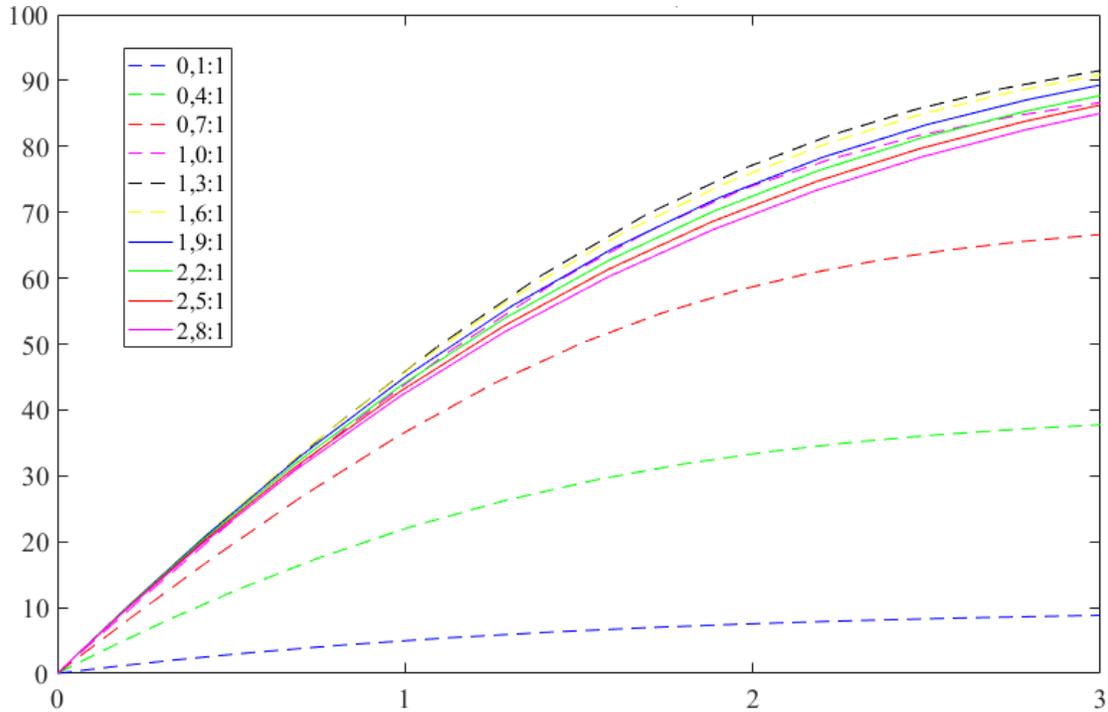


Figura 4. Influência da razão molar. Condições: 70°C, 0,5% de catalisador.

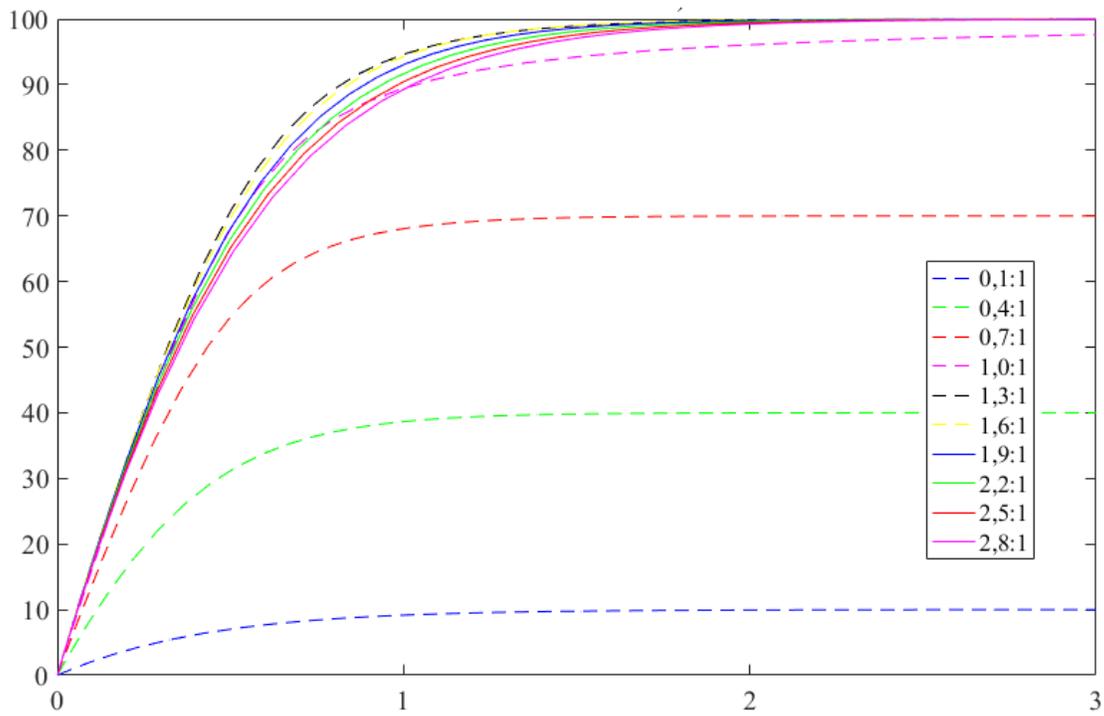


Figura 5. Influência da razão molar. Condições: 70°C, 2,0% de catalisador.

O comportamento da conversão conforme a concentração de álcool aumenta não é linear, sendo que as conversões aumentam abruptamente quando a quantidade de álcool no meio é baixa (0,1:1 até 1:1), pois nesses casos o álcool é reagente limitante. Na faixa de razões molares de 1:1 até 1,3:1 a conversão continua sendo crescente, porém com pequeno distanciamento entre as curvas cinéticas, indicando que o excesso de álcool cetílico pode não compensar os ganhos de conversão, além de gerar custos relacionados à compra do álcool e purificação do produto final. A curva de máxima conversão foi obtida para a razão molar de 1,3:1. Para quantidades maiores de álcool cetílico, é possível notar (Fig. 4 e Fig. 5) que há redução das velocidades de reação. Este comportamento pode ser explicado pela inibição que o álcool cetílico provoca nos sítios ativos da enzima, conforme indicado pelo parâmetro  $K_3$  do modelo cinético. Esse efeito é mais pronunciado para maiores quando a quantidade de álcool no meio é maior, dessa forma que as curvas cinéticas são mais lentas conforme a razão molar aumenta para valores além de 1,3:1.

A influência da temperatura foi analisada para duas condições distintas de razão molar (0,5:1 e 2:1), mantendo a concentração de catalisador em 1,0% em ambos os casos, conforme mostrado nas Fig. 6 e 7. Como a síntese do palmitato de cetila é uma reação endotérmica, o aumento da temperatura tende a favorecer a formação dos produtos. Além disso, para produtos com alto ponto de fusão, altas temperaturas diminuem a viscosidade do sistema e favorecem a transferência de massa. No entanto, a partir desses resultados, é possível concluir que a temperatura ótima para utilização da enzima *Lipozyme RM IM* na síntese de palmitato de cetila ocorre próximo de 70 °C. A operação em temperaturas maiores que 70 °C consome maior quantidade de energia para aquecimento do sistema e o pequeno ganho na conversão pode não compensar os custos extras. Apesar disso, mesmo para temperaturas em torno de 90 °C a conversão manteve-se elevada e nenhuma desativação térmica foi noticiada, indicando boa estabilidade da enzima.

Na Fig. 6, é possível notar que, mesmo para as diferentes temperaturas, em todas as curvas cinéticas a mesma condição de equilíbrio foi atingida. Essa condição de equilíbrio obtida em 50% de conversão é a máxima conversão que pode ser obtida quando a razão molar 0,5:1 é usada. O mesmo comportamento na condição de equilíbrio é obtido quando a razão molar de 2:1 é usada, no entanto, nesse caso, a conversão de aproximadamente 100% é atingida, conforme Fig. 7.

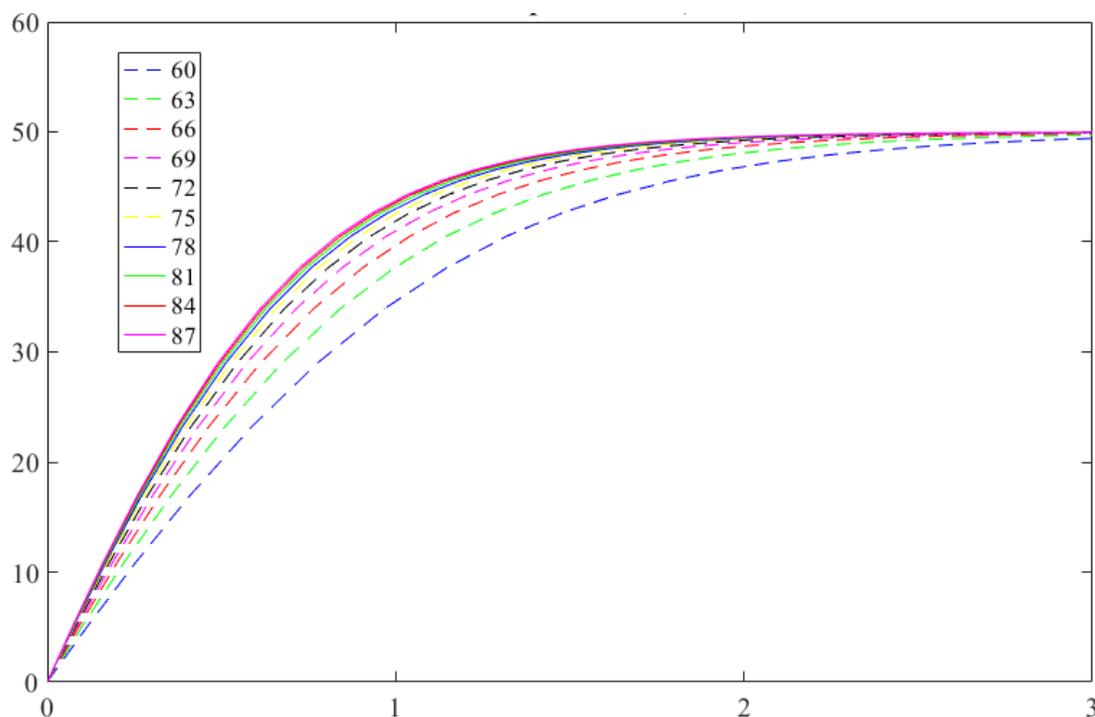


Figura 6. Influência da Temperatura. Condições: RM 0,5:1, 1,0% de catalisador.

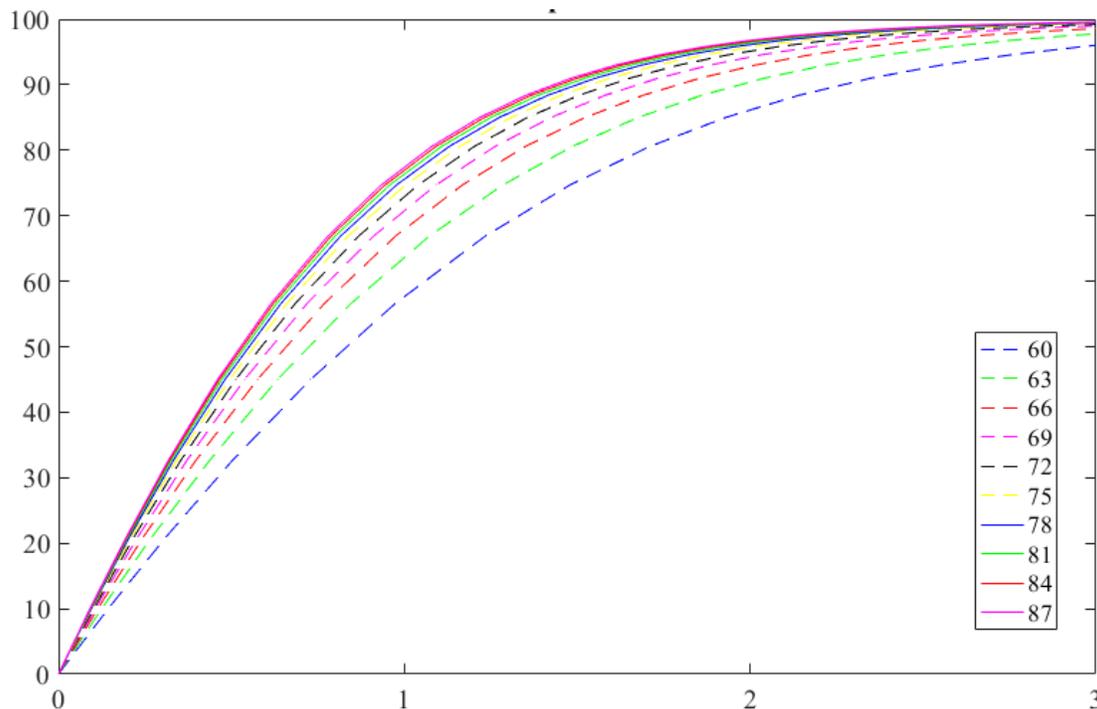


Figura 7. Influência da Temperatura. Condições: RM 2:1, 1,0% de catalisador.

## Conclusões

A partir do modelo cinético enzimático baseado no mecanismo bi bi sequencial randômico, foi possível simular o comportamento reacional da esterificação entre ácido palmítico e álcool cetílico para produção de palmitato de cetila. Três diferentes parâmetros foram variados em ampla faixa de condições para identificação da influência que eles exercem sobre a reação.

O aumento da concentração de catalisador não gera aumento linear na conversão, indicando que quantidades excessivas de enzimas imobilizadas podem limitar a transferência de massa do sistema, além de aumentar o custo do processo. A influência da razão molar também não é linear. Ao aumentar a quantidade de álcool cetílico presente no meio, a curva cinética tende a aumentar, até o limite onde a razão molar atinge 1,3:1. A partir deste ponto, o excesso de álcool no meio causa efeito de inibição suficiente para reduzir a velocidade racional.

A temperatura de reação é um fator importante a ser considerado, uma vez que as enzimas estão sujeitas a degradação térmica. Foi observado que há, por razões econômicas, uma temperatura recomendada para operação, nesse caso em torno de 70 °C. Independentemente das outras condições utilizadas, a operação em temperaturas acima deste valor não fornece melhoria significativa na cinética, além de não compensar o custo energético para elevação da temperatura.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPQ (Processo nº 406737/2013-4 e 309033/2016-0) e ao CAPES pelo suporte financeiro e pelas bolsas de estudo.

## Referências

- [1] V.N. Mutlu, S. Yilmaz, Esterification of cetyl alcohol with palmitic acid over WO<sub>3</sub>/Zr-SBA-15 and Zr-SBA-15 catalysts, *Applied Catalysis A: General*. 522 (2016) 194–200.
- [2] M.H. Guncheva, D. Zhiryakova, High-yield synthesis of wax esters catalysed by modified *Candida rugosa* lipase, *Biotechnology Letters*. 30 (2008) 509–512.

- [3] D.F. Williams, W.H. Schmitt, eds., *Chemistry and Technology of the Cosmetics and Toiletries Industry*, Second, Chapman & Hall, London, 1996.
- [4] C.H. Kuo, H.H. Chen, J.H. Chen, Y.C. Liu, C.J. Shieh, High yield of wax ester synthesized from cetyl alcohol and octanoic acid by lipozyme RMIM and novozym 435, *International Journal of Molecular Sciences*. 13 (2012) 11694–11704.
- [5] S. Ganguly, S. Nandi, Process optimization of lipase catalyzed synthesis of diesters in a packed bed reactor, *Biochemical Engineering Journal*. 102 (2015) 2–5.
- [6] H.C. Chen, C.H. Kuo, H.H. Chen, Y.C. Liu, C.J. Shieh, Optimization of Enzymatic Synthesis of Cetyl 2-Ethylhexanoate by Novozym® 435, *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 88 (2011) 1917–1923.
- [7] K.N.P. Rani, T.S.V.R. Neeharika, T.P. Kumar, B. Satyavathi, C. Sailu, R.B.N. Prasad, Kinetics of enzymatic esterification of oleic acid and decanol for wax ester and evaluation of its physico-chemical properties, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 55 (2015) 12–16.
- [8] S.B. More, J.T. Waghmare, P.R. Gogate, Ultrasound pretreatment as a novel approach for intensification of lipase catalyzed esterification of tricaprylin, *Ultrasonics Sonochemistry*. 36 (2017) 253–261.
- [9] M. Serrano-Arnaldos, M.F. Máximo-Martín, M.C. Montiel-Morte, S. Ortega-Requena, E. Gómez-Gómez, J. Bastida-Rodríguez, Solvent-free enzymatic production of high quality cetyl esters, *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 39 (2016) 641–649.
- [10] T. Garcia, A. Coteron, M. Martinez, J. Aracil, Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst, *Chemical Engineering Science*. 55 (2000) 1411–1423.
- [11] A.E. V. Petersoon, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, A Water Activity Control System for Enzymatic Reactions in Organic Media, *Biotechnology and Bioengineering*. 97 (2007) 235–241.
- [12] M.C. Montiel, M. Serrano, M.F. Máximo, M. Gómez, S. Ortega-Requena, J. Bastida, Synthesis of cetyl ricinoleate catalyzed by immobilized Lipozyme CalB lipase in a solvent-free system, *Catalysis Today*. 255 (2015) 49–53.
- [13] E. Wehtje, D. Costes, P. Adlercreutz, Continuous Lipase-Catalyzed Production of Wax Ester Using Silicone Tubing, *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 76 (1999) 1489–1493.
- [14] S.R. Bansode, V.K. Rathod, Ultrasound assisted lipase catalysed synthesis of isoamyl butyrate, *Process Biochemistry*. 49 (2014) 1297–1303.
- [15] D.B. Lopes, M.C.T. Duarte, G.A. Macedo, Biosynthesis of Oleyl Oleate Wax Ester by Non-commercial Lipase, *Food Science and Biotechnology*. 20 (2011) 1203–1209.
- [16] N. Paludo, J.S. Alves, C. Altmann, M.A.Z. Ayub, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase, *Ultrasonics Sonochemistry*. 22 (2015) 89–94.
- [17] N.A. Cirillo, *Cinética Enzimática da Produção de Palmitato de Cetila por Esterificação em Sistema Livre de Solvente*, Universidade Federal do Paraná, 2018.
- [18] L. Deng, X. Wang, K. Nie, F. Wang, J. Liu, P. Wang, T. Tan, Synthesis of Wax Esters by Lipase-catalyzed Esterification with Immobilized Lipase from *Candida* sp. 99-125, *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 19 (2011) 978–982.
- [19] M.A. Al-Mamun, Study of Binary Systems of Long Chain Alcohols and Acids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 51 (1974) 229–233.