

PLANEJAMENTO FATORIAL NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA PELA LIPASE NATIVA DE *Aspergillus niger*Sofia S. Dias^a, Michele R. G. Dias^a, Renata Danielle Adati^a, Patrícia de O. Carvalho^b e Cristiane Pilissão^{a,*} ^aDepartamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 81280-340 Curitiba – PR, Brasil^bFaculdade de Farmácia, Universidade São Francisco, 12916-900 Bragança Paulista – SP, Brasil

Recebido em 25/11/2021; aceito em 08/02/2022; publicado na web em 24/03/2022

FACTORIAL DESIGN FOR THE SYNTHESIS OF ETHYL OLEATE CATALYZED BY NATIVE LIPASE *Aspergillus niger*. This work reports the use of the Octave, a free computational software, to optimize the experimental design in the synthesis of ethyl oleate from oleic acid and ethanol catalyzed by a native lipase from *Aspergillus niger*. The central composite factorial design (CCD) was performed with 2 levels and 3 variables (temperature, mass of native *A. niger* lipase and oleic acid:ethanol molar ratio) in conjunction with response surface methodology (RSM). The results indicate that variable 1 (oleic acid:ethanol molar ratio; X_1) and 2 (mass of *A. niger* lipase, X_2), as well as the interaction between them, are statistically significant. The optimal reaction condition was estimated using ANOVA data and the response surface. The experimental results are consistent with those estimated, and thus, ethyl oleate was obtained with conversion (> 90%) using oleic acid and ethanol in a 1:2 molar ratio, *A. niger* lipase (8,00 mg) and temperature of 45 °C in 6 hours of reaction.

Keywords: lipase; esterification; oleic acid; Statistic; Octave.

INTRODUÇÃO

O ácido oleico é um dos ácidos graxos predominantes nos óleos vegetais e gorduras animais.¹⁻³ Como importante produto da reação de esterificação entre o ácido oleico e etanol, o oleato de etila é um éster graxo de ampla aplicação nas indústrias de alimentos e cosméticos, pode ainda ser utilizado como solvente na indústria farmacêutica, lubrificante, plastificante, na produção do biodiesel, ou como aditivo no óleo diesel.¹⁻⁴

Os ésteres graxos são obtidos por reações de esterificação e transesterificação catalisadas por ácidos inorgânicos líquidos, ácidos sólidos ou catálise básica. Comparativamente, os ácidos inorgânicos líquidos exibem desvantagens pela corrosão de equipamentos, dificuldade na separação/recuperação do produto e danos ocasionados por poluição ambiental. Os ácidos sólidos oferecem desvantagens pela baixa atividade catalítica, fácil desativação e adsorção de produtos. Já a catálise em meio básico é simples e apresenta altos rendimentos, todavia, a necessidade de um número significativo de etapas para a purificação e separação dos produtos é apontada como desvantagem. No contexto industrial, deve-se considerar que a purificação do produto demanda grandes quantidades de água e, conseqüentemente geração de efluentes, cujo tratamento leva a um aumento do custo final de produção, bem como, prejuízos ambientais.^{5,6}

Para superar as desvantagens supracitadas, as reações catalisadas por enzimas têm sido investigadas como uma alternativa interessante aos métodos tradicionais oferecendo vantagens,⁶⁻¹¹ como atuação em condições reacionais brandas (temperatura, pressão e pH), minimização da formação de subprodutos e facilidades na recuperação do produto final, características essas que conferem processos mais econômicos e sustentáveis.^{6,12,13} Além disso, as reações catalisadas por enzimas apresentam alta especificidade e seletividade (regio, quimio e enantioseletividade), e são consideradas biodegradáveis.^{12,13}

Em especial, a classe de lipases (EC. 3.1.1.3) tem-se destacado, pois apresentam estabilidade frente aos sistemas aqua-restrito e não necessitam de cofatores.¹⁴⁻¹⁶ A busca por novos biocatalisadores

estimula a exploração da biodiversidade brasileira para o isolamento de novos microorganismos de plantas, fungos ou células animais como fontes produtoras de enzimas.^{17,18} Considerando a extraordinária diversidade microbiana e a importância dos fungos como produtores de enzimas, as lipases microbianas constituem importante grupo de catalisadores para uso sintético, sobretudo pela fácil produção em larga escala e alta estabilidade.^{15,19}

Carvalho e colaboradores identificaram, caracterizaram e isolaram a partir de amostras de solo coletadas no sudoeste do Brasil, quatro espécies do fungo de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae* e *A. terreus*) definidas pela alta produção de lipase, as quais foram avaliadas na esterificação enantioseletiva entre (*R,S*)-2-octanol, (*R,S*)-ibuprofen, (*R,S*)-ketoprofen.^{17,20-24} Os resultados apontaram que as lipases exibem estabilidade em temperaturas elevadas e alta enantioseletividade, conferindo características importantes para a aplicação na biocatálise em meio orgânico.^{17,20,23,24}

Lipases fúngicas obtidas a partir dos fungos de *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus delemar* e *Penicillium expansum*^{12,25-27} também desempenham excelente potencial catalítico na hidrólise de óleos marinhos, síntese de ésteres de ácidos graxos poliinsaturados (biodiesel) e de ésteres de aroma.^{15,16,25}

Embora as reações de esterificação catalisadas por lipases tenham sido extensivamente reportadas na literatura devido à versatilidade, alta especificidade e potenciais aplicações,^{15,16,20,23-25} há poucos relatos sobre a aplicabilidade da lipase nativa de *A. niger* extraída de solo brasileiro na reação de esterificação entre o ácido oleico e etanol. Assim com a finalidade de conduzir tais reações de forma racional, procuramos avaliar parâmetros que promovem altas taxas de conversões em condições reacionais amenas, reprodutíveis e de baixo custo.

Vários parâmetros reacionais influenciam na eficiência catalítica de um processo como a especificidade da enzima, a concentração dos reagentes, o solvente do meio reacional (aquoso ou aqua-restrito), a razão molar entre os substratos, temperatura, tempo reacional, bem como, o potencial hidrogeniônico.^{28,29} Conduzir sínteses por planejamento estatístico experimental é relevante, pois viabiliza a realização de menor número de experimentos, e sobretudo oferece maior confiabilidade química e estatística quando comparado com

*e-mail: pilissao@utfpr.edu.br

o procedimento univariado convencional. O sucesso na execução do planejamento permite a descrição e validação de um modelo matemático que facilita a predição de variáveis significativas que devem ser avaliadas como parâmetros para reações.³⁰

A análise estatística dos dados pode ser realizada empregando o Octave,³¹ o qual oferece um sistema operacional de livre acesso e gratuito, e ainda é distribuído sob termos que garantem amplo uso para seus usuários como: executar, copiar, distribuir, estudar, alterar e melhorar o programa. Outra vantagem é que o programa pode ser operado em vários sistemas operacionais, como o Linux, Unix, Mac OS X e Microsoft Windows, sendo possível executá-lo em duas versões: *Command Line Interface* (CLI) e *Graphical User Interface* (GUI).^{30,32}

A versão Octave licença livre (4.2.1) permite efetuar cálculos de efeitos em planejamento fatorial completo, contrastes para planejamento fracionário, proposição de modelos de regressão de primeira ou segunda ordem, visualização de superfície de resposta e gráfico de contorno. Para a execução da versão algumas etapas podem ser realizadas, tais como triagem das variáveis, proposição de modelos, *Analysis of Variance* (Anova), avaliação dos coeficientes e validação do modelo proposto.³⁰

Na literatura são escassos os trabalhos que empregam o programa Octave para análise estatística em reações de esterificação catalisada por lipases. Este trabalho tem como objetivo oferecer pela primeira vez o uso do programa livre Octave como ferramenta para a otimização do planejamento experimental na síntese do oleato de etila a partir do ácido oleico e etanol catalisado por uma lipase nativa de *Aspergillus niger* (*A. niger* – produzida pela cepa fúngica isolada em território brasileiro) (Esquema 1). Para a determinação das condições reacionais foi realizado o planejamento fatorial *Central Composite Design* (CCD) com 2 níveis e 3 variáveis (temperatura, massa da lipase nativa de *A. niger* e a razão molar do ácido oleico:etanol) em conjunto com a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes

A lipase de *A. niger* (0,56 U mg⁻¹) foi utilizada na forma livre e liofilizada.²⁰⁻²² Os solventes e reagentes utilizados na reação de esterificação: ácido oleico comercial, etanol e *n*-hexano foram adquiridos da Alphatec (Brasil, BR) e apresentam grau de pureza analítica (> 99%). O padrão oleato de etila foi obtido por síntese enzimática catalisada pela lipase comercial Lipozym 435 (lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina macroporosa) (> 2000 Ug⁻¹), a qual foi gentilmente doada pela Novozymes (Araucária, Paraná, Brasil). O procedimento experimental e a caracterização espectroscópica estão apresentados no material suplementar (Figuras 1S, 2S e 3S).

Planejamento fatorial

Para a otimização das condições experimentais foi utilizado o planejamento fatorial composto central (CCD) com metodologia de

superfície de resposta. Dezesete experimentos foram realizados, conforme matriz de contraste apresentada na Tabela 1. Três variáveis ($k = 3$) foram estudadas: razão molar ácido oleico:etanol (mmol) (X_1), massa da lipase de *A. niger* (mg) (X_2) e temperatura (°C) (X_3). Os níveis avaliados foram $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ e $+\alpha$, onde $\alpha = [2k]^{1/4} = 1,68$. Três repetições foram realizadas no ponto central. A resposta medida foi a conversão do ácido oleico em oleato de etila, calculada por CG-FID e expressa em percentual. A análise estatística dos resultados foi realizada no programa Octave (versão 4.2.1).³¹

Síntese do oleato de etila catalisada pela lipase de *A. niger*

Em um erlenmeyer foram adicionados a lipase de *A. niger* (8,00-92,00 mg), o ácido oleico (1 mmol, 310 μ L) e o etanol (0,32-3,68 mmol) em diferentes razões molares (ácido oleico:etanol) (1:0,32-1:3,68) acrescidos de 25 mL de *n*-hexano. A mistura foi mantida sob agitação à 150 rpm em banho termostatizado nas temperaturas selecionadas entre 20-70 °C por 6 h. Ao término da reação a enzima foi decantada por centrifugação a 1500 rpm e em seguida a solução foi filtrada para a separação da lipase. A síntese do oleato de etila foi realizada conforme os níveis das variáveis apresentados na Tabela 1. O sobrenadante remanescente foi quantificado por cromatografia gasosa (CG-FID) e pelo método Lowry-Tinsley.³²⁻³⁶

Cromatografia gasosa (CG-FID)

As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-17A com detector FID, equipado com coluna capilar HP-INNOWAX com 30 m de comprimento, 0,250 mm de diâmetro interno, 0,25 μ m espessura do filme. As condições de análise foram: Injetor = 240 °C, Detector = 260 °C, programação = 80 a 240 °C com razão de 10 °C min⁻¹, Split 1:9, pressão do N₂ = 101 kPa, injeção manual de 1 μ L.

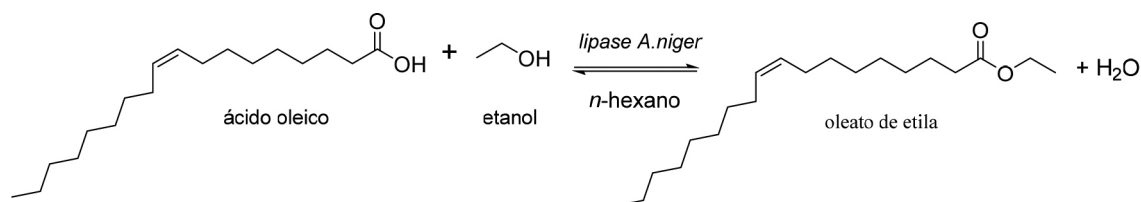
A quantificação da síntese do oleato de etila via catálise enzimática (lipase nativa de *A. niger*) é comparada em função dos diferentes tempos de retenção dos padrões (ácido oleico comercial e oleato de etila obtido via síntese com a lipase Lipozym 435).

A área dos picos foi determinada pela integral definida e expressa em porcentagem relativa conforme apresentado na Equação (1), onde A_e e A_a são a área do éster (oleato de etila) e do ácido oleico, respectivamente. Os cromatogramas dos padrões e da alíquota da reação obtida a partir da reação catalisada pela lipase nativa de *A. niger* estão apresentados no material suplementar (Figura 3S).

$$\% \text{éster} = \frac{A_e}{A_a - A_e} \times 100 \quad (1)$$

Método colorimétrico de Lowry-Tinsley³³

Em um balão volumétrico de 25 mL foram preparadas soluções de ácido oleico em distintas concentrações de 4 – 80 mmol L⁻¹ em *n*-hexano. A partir da solução inicial alíquota de 0,5 mL foi diluída em *n*-hexano em balões volumétricos de 10 mL. Posteriormente, 3 mL da solução final contendo o ácido oleico foi adicionada a 7,5 mL do reagente de Lowry (solução contendo 5% de acetato de cobre (II)



Esquema 1. Esterificação do ácido oleico com etanol catalisada pela lipase nativa de *A. niger*

–pH 6,0-6,2). Duas fases foram observadas e misturadas por 1 min em agitador tipo vórtex, posteriormente, centrifugadas por 10 min a 1500 rpm. A absorbância do sobrenadante foi monitorada em $\lambda_{\text{abs.}} = 715$ nm em espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50. A conversão ao oleato de etila (%) foi determinada a partir do desaparecimento do ácido oleico no meio reacional, associado à absorbância obtida por curva de calibração (Figura 4S).

Rotinas computacionais

Inicialmente as respostas de conversão ao oleato de etila foram avaliadas pelo diagrama de dispersão^{37,38} (Tabela 1S), a partir dessa análise optou-se por utilizar como resposta os valores de conversões experimentais obtidos pelo método CG-FID.

Na função computacional denominada por “regression2” é possível obter resultados da análise de variância (*Analysis of variance*, Anova). A partir dessa análise foram gerados gráficos que expressam as médias quadráticas da regressão, resíduo, erro puro e falta de ajuste, além dos testes F calculados e tabelados. Os valores de coeficientes de regressão, valores experimentais versus previstos, valores previstos versus resíduos, histograma dos resíduos e coeficientes de regressão também foram determinados.³⁰

A rotina “super_fabi” foi utilizada para gerar a superfície de resposta, e assim, visualizar as condições operacionais ótimas do modelo calculado.³⁹ Os cálculos foram realizados utilizando as rotinas computacionais disponibilizadas por Pereira e Pereira-Filho.³⁰

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Três variáveis foram selecionadas para avaliar as condições reacionais ótimas na síntese do oleato de etila catalisada pela lipase nativa de *A. niger*, sendo: razão molar ácido oleico:etanol (X_1), massa da lipase de *A. niger* (X_2) e temperatura (X_3).

Os resultados de conversão ao oleato de etila a partir do planejamento fatorial 2^3 com pontos centrais e axiais, variáveis codificadas e reais, e a resposta expressa em conversão ao respectivo éster estão apresentados na Tabela 1.

Após definir as variáveis e os efeitos significativos na síntese do oleato de etila, os resultados foram ajustados por análise de

regressão múltipla para um modelo polinomial, de forma que a função ajustada está descrita na Equação (2), onde X_1 corresponde a razão molar ácido oleico:etanol, X_2 é a massa da lipase nativa de *A. niger*. A significância estatística do modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA)⁴⁰ a um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$). De forma que quando o valor p é menor ou igual a 0,05 o modelo é considerado estatisticamente significativo, mas quando o valor p for maior ou igual a 0,05 passa a ser considerado não significativo.⁴¹ A equação ajustada referente ao modelo polinomial (Equação 2) apontou seis coeficientes: b_0 (constante), b_1 , b_2 (coeficientes lineares referentes as variáveis X_1 e X_2) b_{11} , b_{22} (coeficientes quadráticos referentes as variáveis X_1^2 e X_2^2) e b_{12} (coeficiente de interação de segunda ordem referente as variáveis X_1 e X_2), válidos com 95% de confiança como mostra a Equação 2.

$$\text{Resposta} = 98,34 + 2,4x_1 - 2,28x_2 - 7,02x_1^2 - 1,32x_2^2 - 3,37x_{12} \quad (1)$$

Através da análise estatística dos resultados nota-se que o modelo de regressão apresentou falta de ajuste ($p = 0,07$), o que não indica que o modelo falhou em descrever adequadamente a relação funcional entre os fatores experimentais e a variável de resposta, uma vez que houve pouca variabilidade das respostas no ponto central (experimentos 15-17, Tabela 1) devido a boa reprodutibilidade do método de síntese e precisão da técnica analítica utilizada para obtenção das respostas. Nesse sentido, algumas estratégias foram adotadas para recalculer o modelo tais como: i. refazer o cálculo ignorando a falta de ajuste; ii. utilizar a média quadrática dos resíduos (MQR).⁴²

Para o valor do teste t de Student^{41,43} (razão entre o coeficiente estimado e seu erro padrão) utilizou-se 1 a fim de obter um perfil da melhor condição de trabalho, dessa forma, foi possível calcular o erro dos coeficientes ao invés do intervalo de confiança. E a partir desse valor o cálculo do intervalo de confiança é realizado através da Equação 3:

$$\text{Coef}_e = [(\text{Diagonal principal da matriz } X'X^{-1} * \text{Variância})^{0.5}] * t \quad (3)$$

Ao utilizar 1 no valor de t , substituindo o valor obtido no cálculo da regressão (nesse caso 2,22), o resultado da variância calculada vs

Tabela 1. Planejamento fatorial composto central 2^3 e a resposta obtida através da quantificação do oleato de etila

Experimentos	Razão ácido oleico:etanol (X_1)		Massa da lipase de <i>A. niger</i> (X_2)		Temperatura (X_3)		Resposta
	Codificado	Real (mmol)	Codificado	Real (mg)	Codificado	Real (°C)	Conversão CG-FID (%)
1	-1	1:1	-1	25	-1	30	96,00
2	+1	1:3	-1	25	-1	30	98,40
3	-1	1:1	+1	75	-1	30	95,20
4	+1	1:3	+1	75	-1	30	81,80
5	-1	1:1	-1	25	+1	60	95,50
6	+1	1:3	-1	25	+1	60	96,70
7	-1	1:1	+1	75	+1	60	94,90
8	+1	1:3	+1	75	+1	60	85,00
9	-1,68	1:0,32	0	50	0	45	58,70
10	+1,68	1:3,68	0	50	0	45	90,00
11	0	1:2	-1,68	8	0	45	90,90
12	0	1:2	+1,68	92	0	45	90,00
13	0	1:2	0	50	-1,68	20	95,20
14	0	1:2	0	50	+1,68	70	95,50
15	0	1:2	0	50	0	45	98,20
16	0	1:2	0	50	0	45	97,90
17	0	1:2	0	50	0	45	98,00

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) para a resposta de conversão ao respectivo oleato de etila

Parâmetros	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	Efeitos	p-valor
Regressão (SQR)	828,27	5	207,07	3,62		0,07
Resíduo (SQres)	685,82	11	57,15		X ₁	0,27
Erro puro (EP)	15,75	8	1,97	85,09	X ₂	0,30
Falta de ajuste (SQfaj)	670,07	4	167,52		X ₁ ²	0,008
Total	1514,1	16			X ₂ ²	0,56
R ²	0,547				X ₁₂	0,24

*Significativo ao nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

variância, não será influenciada pelo valor de t , obtendo-se assim o erro dos coeficientes. A partir dessas considerações foram obtidos os dados da análise de variância (ANOVA) apresentados na Tabela 2.

A variável X₁² mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0,05$), entretanto, devido à falta de ajuste apresentada pelo modelo não houve uma boa correlação entre os coeficientes levando a uma regressão não significativa ($p > 0,05$). Contudo, o modelo ainda pôde ser utilizado para obter um perfil da melhor condição de trabalho através do modelo de superfície de resposta.

A maneira mais confiável e descrita na literatura para avaliar a qualidade do ajuste do modelo é empregando a análise de variância (ANOVA).⁴⁰ Nessa análise a variação total da resposta é estabelecida através da soma quadrática da regressão (SQR) e a soma quadrática dos resíduos (SQres). A soma quadrática total das variáveis corrigida para a média (SQtotal) pode ser descrita pela Equação 4.⁴³

$$SQ_{total} = SQR + SQ_{res} \quad (4)$$

A média quadrática (MQ) é obtida dividindo a soma quadrática de cada parâmetro pelo seu respectivo número de grau de liberdade. A razão entre a média quadrática da regressão (MQreg) pela média quadrática dos resíduos (MQres) é usada para comparar as fontes de variação através do teste F (distribuição de Fisher), levando em consideração seus respectivos números de graus de liberdade. O mesmo raciocínio pode ser aplicado para a razão entre a média quadrática da falta de ajuste (MQfaj) e média quadrática do erro puro (MQep).⁴³

Dessa forma, para obter um modelo ideal e apresentar alta regressão combinada com uma baixa falta de ajuste, é necessário que a maior parte da variação total das observações em torno da média seja explicada pela equação de regressão e o restante provavelmente, ficará com os resíduos. Espera-se ainda que da variação dos resíduos a maior parte exiba apenas (erro experimental) e não considere a falta de ajuste, que está diretamente relacionada ao modelo.⁴³

Outros parâmetros que corroboram para analisar toda variação em torno da média são explicados pela regressão, considerando o valor do coeficiente de variação R² e o gráfico dos resíduos.⁴⁴ O valor de R² representa a fração da variação que é explicada pela falta de ajuste do modelo. Quanto mais próximo de 1 o valor do coeficiente estiver, melhor será o ajuste do modelo e às respostas observadas.⁴³

Após a realização dos experimentos de triagem, os fatores (efeitos) significativos são selecionados e uma metodologia de análise de superfícies de respostas pode ser executada para otimização do experimento. A metodologia de superfície de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar o sistema até sua otimização.^{43,45} O planejamento composto central (*central composite design*, CCD) e planejamento Doehlert são as classes de planejamentos mais utilizadas para ajustar modelos quadráticos aplicados na metodologia de superfície de resposta.

As representações tridimensionais (3D) da superfície de resposta foram traçadas para entender a interação entre as variáveis (X₁ e X₂) e para determinar o nível ótimo de cada variável para resposta máxima (Figura 1).

Na Figura 1 a forma elíptica das curvas indica uma boa interação das duas variáveis (X₁ e X₂). As coordenadas do ponto central dentro dos níveis de contorno mais altos em cada uma das parcelas correspondem aos valores ótimos das respectivas variáveis, sendo eles a massa da lipase de *A. niger* em 8 mg e a razão molar ácido oleico:etanol 1:2,47.

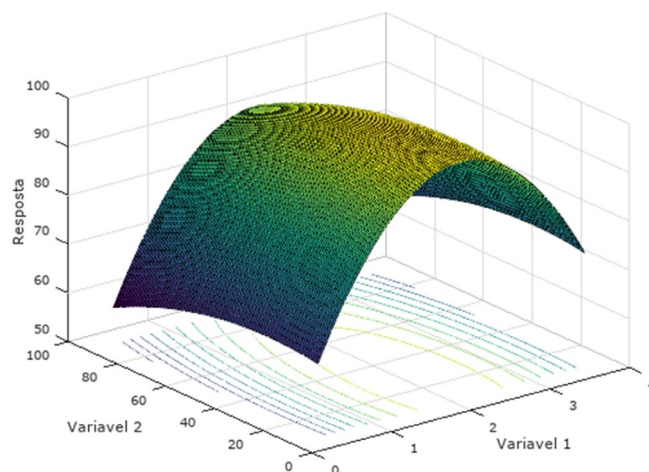


Figura 1. Superfície de resposta para a resposta de conversão (%) em oleato de etila sobre o efeito da razão molar ácido oleico:etanol (variável X₁) e massa da lipase nativa de *A. niger* (variável X₂)

Os resultados da superfície de resposta (Figura 1) indicam que quanto menor o valor da massa da lipase de *A. niger* (8 mg), maior a porcentagem de conversão ao respectivo oleato de etila. Por outro lado, a razão molar ácido oleico:etanol na proporção (1:2,47) é identificada como ponto ótimo. Nessas condições reacionais a taxa de conversão em oleato de etila prevista foi de aproximadamente 99%. Frente ao exposto, o resultado experimental que converge para o ponto ótimo do modelo de superfície de resposta é o do experimento 11 (Tabela 1), onde a conversão para oleato de etila é 90,9% utilizando ácido oleico e etanol na razão molar de 1:2, massa da lipase de *A. niger* (8,00 mg), e temperatura reacional de 45 °C. Há relatos que maiores massas de enzimas, tendem a favorecer o equilíbrio para o sentido dos produtos e aumentar as taxas de conversão, por apresentar maior disponibilidade de sítios ativos para reagir.^{46,47} No entanto, no atual trabalho, e em outros reportados na literatura,⁴⁷⁻⁴⁹ é demonstrado que a catálise enzimática necessita de uma quantidade mínima do catalisador para ativar o substrato e a reação ser efetiva. Maior concentração da enzima pode induzir o efeito de transferência de massa entre substrato-enzima, bem como, promover interações intermoleculares, e assim ocasionar o

fechamento da tampa hidrofóbica, e posterior inibição da entrada do substrato ao respectivo sítio ativo da enzima.⁴⁸⁻⁵⁰ Dentre as vantagens citadas para o uso do planejamento estatístico, enfatizamos que a previsão das variáveis adequadamente ajustadas permite a redução do custo na execução da síntese.

No estudo teórico apresentado pelo modelo, os dados observados com a Análise de variância (Tabela 3S) indicam um baixo valor de regressão, porém o modelo não apresentou falta de ajuste ($p = 0,0007$). Outro ponto observado foi que apenas a variável X_1 ² apresentou-se como significativa ao nível 95% com $p = 0,0002$. A superfície de resposta (Figura 5S) indica o experimento 11 como ponto ótimo para a conversão ao éster (oleato de etila), demonstrando que a menor quantidade de massa da lipase (8,00 mg - $X_2 = -1,68$) permite uma boa conversão ao éster (98,2%), resultado que oferece apreciável relação de custo-benefício para o processo.

Ao observar a superfície de resposta do modelo de regressão utilizando como resposta os dados experimentais (Figura 1), é observado que a condição ótima de trabalho também converge para o experimento 11, no qual as condições reacionais incluem a menor massa de catalisador comparado aos experimentos (2, 15 e 17, Tabela 1) que apresentam maiores conversões em comparação ao experimento 11 (Tabela 1). Para esses experimentos identifica-se aumento nas porcentagens de conversão de aproximadamente 7,5%, o que não justifica um aumento de 3,12 a 6,25 vezes (25 mg = -1 e 50 mg = 0) a mais de catalisador. Essas condições reacionais implicam em maiores custos para o processo, sem ganho significativo na conversão ao produto desejado.

Ao exceder essa proporção observou-se uma diminuição na eficiência catalítica da lipase de *A. niger* refletida pela redução da taxa de conversão, esse processo pode estar relacionado a desnaturação das enzimas em solventes polares próticos, uma vez que ocorre a distorção e remoção da camada de água essencial que estabiliza a enzima, fatores que promovem a inibição competitiva da enzima pelos substratos também devem ser considerados.^{46,51-55}

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizado o planejamento experimental 2³ com o software gratuito Octave na esterificação entre o ácido oleico e etanol catalisado pela lipase nativa de *A. niger*. Três variáveis reacionais foram avaliadas (temperatura, massa da lipase nativa de *A. niger* e a razão molar do ácido oleico:etanol). O programa Octave oferece ferramentas empregadas com sucesso na análise do efeito individual das variáveis experimentais e suas interações em função da conversão ao oleato de etila. Os resultados indicam que a variável 1 (razão molar ácido oleico:etanol; X_1) e 2 (massa da lipase *A. niger*, X_2) bem como, a interação entre elas são estatisticamente significativas, enquanto a variável 3 (temperatura, X_3) e suas interações (13; 23 e 123) não foram consideradas significativas. A análise estatística apontou falta de ajuste no modelo de regressão calculado, no entanto, a condição ótima foi estimada utilizando os dados ANOVA e a superfície de resposta. Os resultados experimentais são condizentes com os estimados e, assim, o oleato de etila foi obtido com conversão > 90% utilizando o ácido oleico e etanol na razão molar 1:2, lipase de *A. niger* (8,00 mg) e temperatura fixa de 45 °C em 6 horas de reação.

MATERIAL SUPLEMENTAR

O Material Suplementar contém os espectros de RMN ¹H, FTIR/ATR, cromatograma (CG) e a curva de calibração obtida através do método Lowry-Tinsley na caracterização do oleato de etila padrão. Além disso, é possível encontrar o diagrama de dispersão da resposta de conversão (%) ao oleato de etila pelo método de Lowry-Tinsley vs

Cromatografia gasosa (CG-FID). Essas informações estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Química (UTFPR, Brasil), Laboratório Multiusuários de Análises Químicas (LAMAQ-UTFPR), e ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR) por disponibilizar o equipamento de RMN para a realização das análises. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro da chamada Universal-CNPq (processo N°. 476159/2013-0 e N°. 424462/2016-8), à CAPES pelo apoio financeiro nas pesquisas e pelas bolsas concedidas aos alunos envolvidos. À Novozyme pela gentil doação da enzima lipozyme 435. Ao professor Edenir Rodrigues Pereira-Filho (UFSCar) pelo auxílio na interpretação dos resultados no planejamento fatorial.

REFERÊNCIAS

1. Foresti, M. L.; Ferreira, M. L.; *Catal. Today* **2005**, *107*, 23.
2. Neumann, K.; Werth, K.; Martín, A.; Górak, A.; *Chem. Eng. Res. Des.* **2016**, *107*, 52.
3. Nguyen, H. C.; Wang, F. M.; Dinh, K. K.; Pham, T. T.; Juan, H. Y.; Nguyen, N. P.; Ong, H. C.; Su, C. H.; *Energies* **2020**, *13*, 2167.
4. Zheng, Y.; Zheng, Y.; Yang, S.; Guo, Z.; Zhang, T.; Song, H.; Shao, Q.; *Green Chem. Lett. Rev.* **2017**, *10*, 202.
5. De Jesus, A. A.; de Santana Souza, D. F.; de Oliveira, J. A.; de Deus, M. S.; da Silva, M. G.; Franceschi, E.; da Silva Egues, S. M.; Dariva, C.; *Energy Convers. Manage.* **2018**, *171*, 1697.
6. Saranya, G.; Ramachandra, T. V.; *Renewable Energy* **2020**, *153*, 919.
7. Martínez-Ruiz, A.; Tovar-Castro, L.; García, H. S.; Saucedo-Castañeda, G.; Favela-Torres, E.; *Bioresour. Technol.* **2018**, *265*, 52.
8. Moazeni, F.; Chen, Y.-C.; Zhang, G.; *J. Clean. Prod.* **2019**, *216*, 117.
9. Aguiar, E. C. G.; de Barros, D. S. N.; Fernandez-Lafuente, R.; Freire, D. M. G.; *Renewable Energy* **2019**, *130*, 574.
10. Korma, S. A.; Zou, X.; Ali, A. H.; Abed, S. M.; Jin, Q.; Wang, X.; *Food Bioprod. Process.* **2018**, *107*, 121.
11. Hama, S.; Noda, H.; Kondo, A.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *50*, 57.
12. Contesini, F. J.; Lopes, D. B.; Macedo, G. A.; Nascimento, M. da G.; Carvalho, P. de O.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 163.
13. Ortiz, C.; Ferreira, M. L.; Barbosa, O.; dos Santos, J. C. S.; Rodrigues, R. C.; Berenguer-Murcia, Á.; Briand, L. E.; Fernandez-Lafuente, R.; *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 2380.
14. Gricajeva, A.; Kazlauskas, S.; Kalėdienė, L.; Bendikienė, V.; *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *108*, 1165.
15. Souza, R. C.; Cantão, M. E.; Nogueira, M. A.; Vasconcelos, A. T. R.; Hungria, M.; *Braz. J. Microbiol.* **2018**, *49*, 723.
16. dos Santos, A. F. A.; de Andrade, V. D.; Cardoso, B. A.; da Silva, O. S.; de Oliveira, R. L.; Porto, A. L. F.; Porto, T. S.; Porto, C. S.; *Brazilian Journal of Development* **2020**, *6*, 25663.
17. Carvalho, P. de O.; Calafatti, S. A.; Marassi, M.; Silva, D. M. da; Contesini, F. J.; Bizaco, R.; Macedo, G. A.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 614.
18. Bharathi, D.; Rajalakshmi, G.; *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *22*, 101368.
19. Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235.
20. de Oliveira Carvalho, P.; Contesini, F. J.; Bizaco, R.; Alves Macedo, G.; *Food Biotechnol.* **2005**, *19*, 183.
21. Campos, P. R. B.; de Oliveira, B. F.; Noffs, M. D'A.; Carvalho, P. O.; *Revista Lecta (Bragança Paulista)* **2002**, *20*, 7.

22. Contesini, F. J.; da Silva, V. C. F.; Maciel, R. F.; de Lima, R. J.; Barros, F. F. C.; Carvalho, P. O.; *J. Microbiol.* **2009**, *47*, 563.
23. Carvalho, P. O.; Contesini, F. J.; Ikegaki, M.; *Braz. J. Microbiol.* **2006**, *37*, 329.
24. Contesini, F. J.; Carvalho, P. O.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2069.
25. Maia, M. M. D.; Heasley, A.; De Moraes, M. M. C.; Melo, E. H. M.; Moraes Jr, M. A.; Ledingham, W. M.; Lima Filho, J. L.; *Bioresour. Technol.* **2001**, *76*, 23.
26. Chandra, P.; Singh, R.; Arora, P. K.; *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19*, 1.
27. Arora, R.; In *Microbial Diversity, Interventions and Scope*; Sharma, S. G., Sharma, N. R., Sharma, M., eds.; Springer, 2020; pp. 301–318.
28. Selvakumar, P.; Sivashanmugam, P.; *Energy Convers. Manag.* **2019**, *179*, 141.
29. Javed, S.; Azeem, F.; Hussain, S.; Rasul, I.; Siddique, M. H.; Riaz, M.; Afzal, M.; Kouser, A.; Nadeem, H.; *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2018**, *132*, 23.
30. Pereira, F. M. V.; Pereira-Filho, E. R.; *Quim. Nova* **2018**, *41*, 1061.
31. <http://www.octave.org>, acessada em março 2022.
32. Eaton, J. W.; *J. Process Control* **2012**, *22*, 1433.
33. Lowry, R. R.; Tinsley, I. J.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1976**, *53*, 470.
34. Marques, M. V.; Naciuk, F. F.; Mello, A. M. de S.; Seibel, N. M.; Fontoura, L. A. M.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 978.
35. Pantano, L.; Lo Cascio, G.; Alongi, A.; Cammilleri, G.; Vella, A.; Macaluso, A.; Cicero, N.; Migliazzo, A.; Ferrantelli, V.; *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30*, 2378.
36. Braun, J. V.; dos Santos, V. O. B.; Fontoura, L. A. M.; Pereira, E.; Napp, A.; Seferin, M.; Lima, J.; Ligabue, R.; Vainstein, M. H.; *Quim. Nova* **2017**, *40*, 1111.
37. Swinscow, T. D. V.; Campbell, M. J.; *Statistics at square one*, BMJ: London, 2002.
38. Bewick, V.; Cheek, L.; Ball, J.; *Crit. Care* **2003**, *7*, 1.
39. Zaviska, F.; Drogui, P.; Blais, J.-F.; Mercier, G.; Lafrance, P.; *J. Hazard. Mater.* **2011**, *185*, 1499.
40. Christensen, R.; *Analysis of variance, design, and regression: Applied statistical methods*; CRC Press, 1996.
41. Seltman, H. J.; *Experimental Design and Analysis*, disponível em <https://www.stat.cmu.edu/~hseltman/309/Book/Book.pdf>, acessado em março 2021.
42. Breitreitz, M. C.; Souza, A. M. de; Poppi, R. J.; *Quim. Nova* **2014**, *37*, 564.
43. Teófilo, R. F.; Ferreira, M.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 338.
44. Neto, B. B.; Scarmínio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*; Bookman Editora: Porto Alegre, 2010.
45. Ferreira, M.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 724.
46. Ganguly, S.; Nandi, S.; *Biochem. Eng. J.* **2015**, *102*, 2.
47. Ma, L.; Han, Y.; Sun, K.; Lu, J.; Ding, J.; *Energy Convers. Manage.* **2015**, *98*, 46.
48. Bansode, S. R.; Rathod, V. K.; *Chem. Eng. Process. Intensif.* **2019**, *143*, 107605.
49. Sun, M.; Nie, K.; Wang, F.; Deng, L.; *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *7*, 486.
50. Zaak, H.; Siar, E.-H.; Kornecki, J. F.; Fernandez-Lopez, L.; Pedrero, S. G.; Virgen-Ortiz, J. J.; Fernandez-Lafuente, R.; *Process Biochem.* **2017**, *56*, 117.
51. Shieh, C.-J.; Liao, H.-F.; Lee, C.-C.; *Bioresour. Technol.* **2003**, *88*, 103.
52. Yadav, G. D.; Devi, K. M.; *Chem. Eng. Sci.* **2004**, *59*, 373.
53. Köse, Ö.; Tüter, M.; Aksoy, H. A.; *Bioresour. Technol.* **2002**, *83*, 125.
54. Nouredini, H.; Gao, X.; Philkana, R. S.; *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 769.
55. Chakravorty, D.; Parameswaran, S.; Dubey, V. K.; Patra, S.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *167*, 439.