

Área: Engenharia de Alimentos

PRODUÇÃO DE POLICAPROLACTONA EM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO UTILIZANDO LIPASE

**Sibele R. Rosso Comim, Marcos A. de Oliveira, Emanuel Bianchin, Débora de Oliveira,
Sandra Regina Salvador Ferreira, J. Vladimir de Oliveira***

*Laboratório de Termodinâmica, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos,
Universidade Regional Integrada*

*Laboratório de Extração Supercrítica, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de
Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina*

**E-mail: vladimir@uricer.edu.br*

RESUMO

A síntese de policaprolactona em dióxido de carbono supercrítico catalisada por lipase foi realizada em sistema batelada, a fim de avaliar o efeito das condições de reação sobre o rendimento em biopolímero e sobre a atividade enzimática da lipase. O estudo compreendeu um planejamento fatorial e uma cinética de polimerização. As variáveis estudadas no planejamento foram teor mássico de enzima em relação ao monômero, pressão e razão mássica solvente/substrato. O gráfico de Pareto para o planejamento fatorial mostrou que tanto a porcentagem de enzima quanto o efeito cruzado entre razão de enzima e fração foram significativos com 95% de confiança. De acordo com o planejamento experimental, para tempos curtos (duas horas), os maiores rendimentos foram obtidos para as reações com 15 % de enzima que variaram de 63% a 76%. No entanto, rendimentos similares aos obtidos utilizando-se 15 % de enzima são alcançados com cerca de 8 a 12 horas de reação para a cinética com 5% de enzima, obtendo-se valores de 65% e 75%, respectivamente. A atividade enzimática residual medida para as diversas condições de operação e ao longo do tempo indica que há possibilidade de reuso da enzima.

Palavras-chave: Policaprolactona, lipase, dióxido de carbono.

1 INTRODUÇÃO

Policaprolactona (PCL) é um dos mais atrativos poliésteres alifáticos para aplicações biomédicas e em alimentos devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (Stassin et

al., 2001; Pitt et al., 1981). Pode ser utilizado como agente encapsulante de drogas, aromas e pigmentos. Tradicionalmente, a PCL tem sido sintetizada por polimerização em massa, em solução ou em suspensão utilizando um iniciador organometálico. No entanto, a utilização de enzimas como catalisador na polimerização por abertura de anel vem se tornando uma alternativa bastante atrativa. Enquanto catalisadores tradicionais geralmente contém espécies metálicas tóxicas, enzimas são uma opção ecologicamente correta (Thurecht et al., 2006). O uso do dióxido de carbono supercrítico também tem apelo ambiental, uma vez que pode ser facilmente separado pela depressurização do sistema e pode ser reutilizado no processo. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar a produção de poli(ϵ -caprolactona) em dióxido de carbono supercrítico catalisada pela lipase comercial Novozym 435. O parâmetro empregado para avaliação da produção foi a porcentagem de monômero convertida em polímero. Além disto, foi determinada a atividade da enzima após a reação com o intuito de verificar a possibilidade de seu reuso.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

As reações de polimerização foram conduzidas em um reator de volume variável com visualização. Resumidamente, o dispositivo experimental consiste de um reator com um volume interno máximo de 27 mL, duas janelas de safira para observação visual, um transdutor de pressão absoluta (DL 301, Smar, de Sertãozinho/SP/Brasil), com uma precisão de $\pm 0,03$ MPa e uma bomba de seringa (260 D, ISCO, Lincon/NE/EUA). A célula contém um pistão móvel que permite o controle de pressão dentro do reator. A enzima, uma lipase comercial imobilizada *Candida antarctica* de nome comercial Novozym 435 (Novozymes S/A), e o monômero, poli(ϵ -caprolactona) (Sigma-Aldrich, 97%), são pesados em balança analítica e adicionados ao reator que então é fechado. O dióxido de carbono (White Martins, 99,9%) é adicionado ao reator com auxílio da bomba de seringa. Sua massa é calculada de acordo com o volume deslocado na bomba levando em consideração a densidade do dióxido de carbono na temperatura e pressão da bomba. A temperatura do reator é mantida constante com o auxílio de um banho termostático, com água como fluido circulante em uma jaqueta

em torno do reator. O sistema é mantido em agitação contínua, com a ajuda de um agitador magnético. As massas adicionadas ao reator são calculadas para atingir um volume de aproximadamente 13 mL dentro do reator, nas condições de reação. Após a polimerização, o material foi solubilizado em THF (Fmaia 99%), filtrado para separar a enzima e precipitado em etanol (Merck, 99%). A suspensão de polímero foi então filtrada. O rendimento foi calculado tomando-se a massa de material precipitado com relação à massa de monômero utilizado na polimerização expresso em porcentagem.

A atividade enzimática foi avaliada seguindo metodologia descrita em Oliveira et al. (2006) e Fiametti (2008). A quantificação ocorre por meio da reação de esterificação entre o ácido láurico (Vetec, 98%), e o álcool n-propílico (Synth, 99,5%), na razão molar 3:1, à temperatura de 60°C com 5% (m/m) de enzima. A reação foi conduzida em um reator de vidro aberto com agitação magnética cuja temperatura é mantida a 60°C com o auxílio de um banho termostático. Foram retiradas alíquotas de 150 µL, em triplicata, do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e foram diluídas em 20 mL da solução acetona/etanol 1:1 (Vetec, 99,5%). A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada pela titulação de hidróxido de sódio 0,01N (Quimex 99,5%). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1µmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas. A atividade da enzima foi avaliada em duplicata antes do início dos experimentos obtendo-se o valor de cerca de 45 U/g. A atividade enzimática residual foi calculada tomando-se a atividade enzimática final com relação à inicial expressa em porcentagem. Valores abaixo de 100% indicam perda de atividade enquanto valores superiores a 100% indicam ganho de atividade.

Para avaliar a influência das variáveis de processo na produção enzimática de poli(ϵ -caprolactona) em dióxido de carbono à alta pressão foi realizado um planejamento fatorial completo, totalizando 11 experimentos. As variáveis investigadas foram pressão de operação, porcentagem de enzima sobre a massa de substrato e fração solvente/substrato. As pressões e frações de substrato foram escolhidas observando-se o diagrama de equilíbrio de fases entre o dióxido de carbono e a ϵ -caprolactona apresentado por Bender et al. (2009). As pressões de 280 e 200 bar denotam região monofásica, enquanto a pressão de 120 bar apresenta sistema bifásico, de imiscibilidade líquido-líquido. O planejamento foi realizado à temperatura constante de 65°C (temperatura ótima da enzima) com duas horas de reação. A cinética de polimerização foi realizada a 120 bar, 65°C, fração mássica de 2:1 (dióxido de carbono: ϵ -

caprolactona) e 5% de enzima (m/m) com experimentos destrutivos em tempos determinados até 20 horas. Os resultados foram analisados com o software Statistica 8.0 Statsoft Inc.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra as condições de processo e os resultados de rendimento de polimerização via execução de planejamento fatorial.

Tabela 1. Resultados do planejamento para a produção de poli(ϵ -caprolactona) em CO₂ à alta pressão catalisada por lipase para duas horas de reação e temperatura de 65°C.

Nº	Pressão (bar)/ Densidade (kg/m ³)	[Enzima] (m/m%)	Fração Mássica (CO ₂ :caprolactona)	Rendimento (%)	Atividade Enzimática Residual (%)
1	120/ 0,3781	5	1 :2	47	80
2	280/ 0,7865	5	1 :2	39	94
3	120/ 0,3781	15	1 :2	72	89
4	280/ 0,7865	15	1 :2	63	86
5	120/ 0,3781	5	2:1	29	--- ^a
6	280/ 0,7865	5	2:1	25	--- ^a
7	120/ 0,3781	15	2:1	67	91
8	280/ 0,7865	15	2:1	76	74
9	200/ 0,7986	10	1:1	56	114
10	200/ 0,7986	10	1:1	56	91
11	200/ 0,7986	10	1:1	60	114

^a Quantidade de amostra insuficiente para avaliação da atividade.

Os maiores rendimentos obtidos foram de 72% e 76% para as condições de 120 bar, fração de 2:1, 15% de enzima e 280 bar fração de 1: 2, 15% de enzima respectivamente. Foram realizadas também medidas de atividade enzimática para avaliar o efeito das condições de reação sobre a atividade da enzima. Como observado na Tabela 1 os resultados de atividade enzimática residual variam de 74% a 114%. Considerando-se o desvio padrão do ponto central 116 ± 13 %, observa-se que não há perda que impossibilite a reutilização da enzima no processo de polimerização.

A respeito da influência das condições de processo quanto ao rendimento da polimerização foi realizada uma análise estatística do tipo ANOVA em que os níveis foram avaliados para o intervalo de confiança de 95% ($p=0,05$). O diagrama de Pareto (Figura 1) mostra que a concentração de enzima foi a variável estatisticamente mais significativa para as faixas de condições de processo estudadas. Ainda, o efeito cruzado entre a concentração de enzima e a razão entre dióxido de carbono e ϵ -caprolactona apresentou um efeito significativo, ou seja, melhores resultados são obtidos associando-se altas concentrações de enzima à proporção entre dióxido de carbono e caprolactona de 2:1. Um aspecto interessante do diagrama de Pareto é que a pressão, assim como a densidade, não se mostrou uma variável significativa para a faixa estudada apesar de as reações realizadas a 120 bar terem ocorrido em um região de imiscibilidade líquido-líquido. Segundo Loeker et al. (2004), para as reações de polimerização, trabalhar dentro da região de solubilidade permite que haja uma maior interação entre o monômero e a espécie iniciadora da reação, permitindo o monômero se difundir rapidamente para o sítio ativo no crescimento das cadeias do polímero.

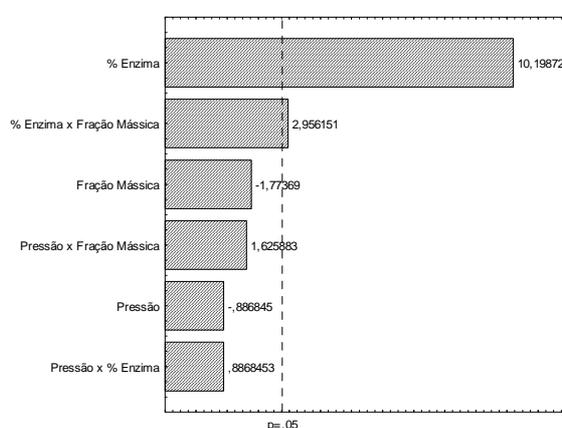


Figura 1. Diagrama de Pareto para o rendimento da polimerização com nível de significância de 90%.

Deixando de lado momentaneamente o efeito cruzado entre a porcentagem de enzima e a fração, observa-se que apesar de não ser significativo com $p=0,05$ o efeito da variável fração tem efeito negativo. Sendo assim, para as concentrações de enzima mais baixas, e

portanto de interesse econômico, os rendimentos são maiores para menores quantidades de solvente com reação ao monômero, ou seja, para relações mássicas de 1:2.

A partir dos resultados do planejamento, foram escolhidas as condições para a realização dos experimentos de cinética de polimerização da caprolactona com o intuito de avaliar o processo de polimerização ao longo do tempo. Apesar de os resultados obtidos para os ensaios com 15% de rendimento terem fornecido os melhores resultados (63%-76%) altos rendimentos foram obtidos em curto período de tempo. Devido ao alto custo da enzima, procurou-se buscar uma condição que se apresentasse promissora com uma menor quantidade de enzima (5%). Dentre os experimentos realizados no planejamento observa-se um ponto singular em que com apenas 5% obteve-se um rendimento de 47%. Dentre as condições do ponto 1 pode se citar o nível (-1) de pressão, propiciando economia energética, além do nível (-1) de fração mássica entre dióxido de carbono e ϵ -caprolactona, propiciando economia de solvente. Desta forma, estas foram as condições utilizadas na cinética de polimerização.

A Figura 2 mostra os resultados de cinética para a conversão e a atividade residual da enzima para polimerização da ϵ -caprolactona a 120 bar, 65 °C, fração mássica de 1:2 (dióxido de carbono: ϵ -caprolactona) e 5 % de enzima. Pode-se observar pela Figura 2 que rendimentos similares aos obtidos utilizando-se 15 % de enzima (63% a 76% de conversão) são alcançados com cerca de 8 a 12 horas de reação para a cinética com 5% de enzima, obtendo-se valores de 65% e 75%, respectivamente.

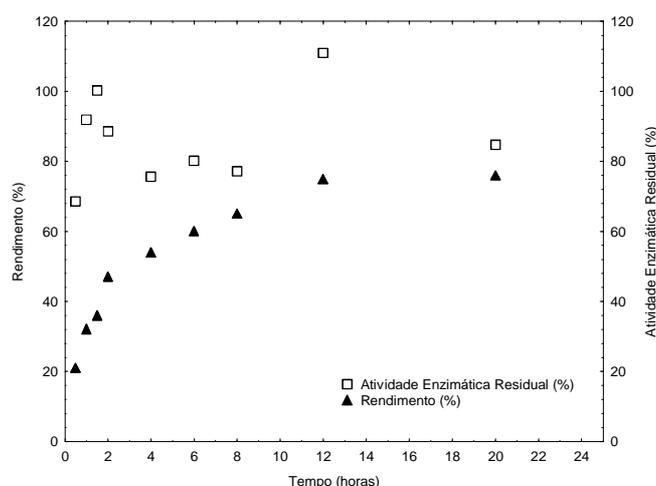


Figura 2. Cinética de conversão e atividade enzimática residual para a polimerização da ϵ -caprolactona a 120 bar, 65 °C, fração mássica de 1:2 (CO_2 : ϵ -caprolactona) e 5 % de enzima.

Loecker et al. (2004) alcançaram rendimentos de até 98% para a reação de polimerização a 138 bar, 65°C e 24 horas utilizando 10% de enzima. Além da maior quantidade de enzima no meio, outro fator que contribui para a diferença de rendimento é o método de separação do polímero. Loecker e seus colaboradores (2004) separaram os oligômeros formados e monômeros residuais utilizando extração com dióxido de carbono supercrítico, enquanto este trabalho usa a solubilização com solvente e precipitação em anti-solvente. No caso da extração com dióxido de carbono supercrítico, a remoção de compostos de maior massa molar pode ser inferior ao que se verifica com o uso de um solvente orgânico no estado líquido. Isso pode justificar o menor rendimento obtido em nosso trabalho. Outro ponto importante é o maior teor de água presente em nossa amostra de monômero quando comparado ao de Locker et al. (2004). Neste trabalho, o monômero foi utilizado sem prévia secagem visando economia de custos para um processo em larga escala. Segundo Turecht et al. (2006) a presença de umidade conduz a obtenção de maior fração de cadeias com menor massa molar, passíveis de remoção com a separação utilizando-se o solvente e anti-solvente. Análises de GPC posteriores para cálculo de massa molar permitirão uma comparação mais adequada entre os resultados deste trabalho e o de outros autores.

Nota-se também que a atividade da enzima permanece aproximadamente constante ao longo da reação proporcionando a possibilidade de reuso da enzima. Tendo em vista o elevado custo da enzima (em torno de U\$ 1,500,00/kg), pode ser mais vantajoso admitir maiores tempos de reação com menores quantidades de enzima. Uma detalhada análise de custo pode contribuir para esta decisão.

3 CONCLUSÃO

A área de produção de biopolímeros está crescendo cada vez mais com o uso de técnicas menos agressivas ao ambiente. A produção de poli(ϵ -caprolactona) em dióxido de carbono supercrítico catalisada por lipase surge nesse contexto como um processo promissor ainda pouco explorado pela comunidade científica.

De acordo com o planejamento experimental, para tempos curtos (duas horas), os maiores rendimentos foram obtidos para as reações com 15 % de enzima. No entanto,

rendimentos similares aos obtidos utilizando-se 15 % de enzima são alcançados com cerca de 8 a 12 horas de reação para a cinética com 5% de enzima o que pode representar economia devido ao alto custo da enzima.

Quanto à atividade enzimática após a polimerização observou-se a possibilidade de reuso da enzima, sendo este um fator importante para a viabilidade do processo

REFERÊNCIAS

- BENDER, J. P.; FEITEN, M.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Phase behavior of binary systems of lactones in carbon dioxide. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 42, p. 48-53, 2010.
- LOEKER, F. C.; DUXBURY, C. J.; KUMAR, R.; GAO, W.; GROSS, R.; HOWDLE, S. M. Enzyme-catalyzed Ring-Opening Polymerization of ϵ -caprolactone in supercritical carbon dioxide. *Macromolecules*, n.37, p.2450-2453, 2004
- OLIVEIRA, D.; FEHRMANN, A.C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n. 39, p.117–23, 2006.
- PITT, C.G.; CHASALOW, F.I.; HIBIONADA, Y.M.; KLIMAS, D.M. AND SCHINDLER, A. Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly(ϵ -caprolactone) in vivo, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 26, n.11, p. 3779-3787, 1981.
- STASSIN, F.; HALLEUX, O.; JÉRÔME, R. Ring-opening Polymerization of ϵ -caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide. *Macromolecules*, n. 34, 775-781, 2001.
- THURECHT, K. J.; HEISE, A.; DEGEUS, M.; VILLARROYA, S.; ZHOU, J.; WYATT, M. F.; HOWDLE, S. M. Kinetics of Enzymatic Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide. *Macromolecules*, n.39, p.7967-7972, 2006.