

Área: Engenharia de Alimentos

APLICAÇÃO DE IRRADIAÇÃO ULTRASSÔNICA NA SÍNTESE DE ETIL OLEATO USANDO LIPASE CALB EM POLIURETANO

Alessandro R. Paulazzi^{1*}, Raquel V. Zamadei¹, Verônica Cristina Dalsasso¹, Jamile Zeni¹, Nádia Ligianara D. Nyari¹, Rogério M. Dallago¹

Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões - URI- Erechim, RS

** e-mail: alessandro.paulazzi@hotmail.com*

RESUMO – Lipases são biocatalisadores de grande importância em diferentes áreas, sendo capazes de catalisar reações em meios aquosos ou orgânicos, além de promoverem a esterificação entre ácidos graxos e etanol produzindo ésteres oleatos. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi produzir de oleato de etila (ácido oleico e álcool etílico) a partir de lipase de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em poliuretano (PU) submetida irradiação ultrassônica. Os experimentos foram realizados, através de um Delineamento Composto Central Rotacional Completo 2³ (DCCR), avaliando a concentração de enzima (g), temperatura (°C), agitação ultrassônica (% - 132 W) e o tempo de reação. A produção foi otimizada com conversão de 40% (0,1 g, 72,5 °C, 50 % e 15 min de reação), com atividade de esterificação de 3707,0 U/g (R² 0,95) e rendimento de 242% (0,05 g, 50 °C, 70 % em 15 min de reação). A estabilidade operacional foi de 24 ciclos de reutilização com 41 % de atividade em relação a inicial. Os resultados de conversão de oleato de etila são considerados promissores, podendo ser utilizada na indústria de biodiesel, cosméticos, farmacêuticos e de detergentes, por possuírem características tensoativas, emulsionantes, lubrificidade e de plastificantes

Palavras-chave: Esterificação, Síntese de ésteres, Oleato de etila, Agitação Ultrassônica.

1 INTRODUÇÃO

Os ésteres são considerados uma das classes mais importantes de compostos orgânicos e podem ser obtidos através de diferentes formas, como através de fontes naturais por destilação e extração com solventes adequados, catalise química e mais recentemente por biocatálise. A incorporação dessa nova técnica para a produção de compostos biodegradáveis tem como principal objetivo, a produção de produtos biocompatíveis, sintetizadas a partir de substratos renováveis, em condições brandas, elevado grau de pureza, minimização de resíduos e consequentemente vantagens ambientais (Dhake et al., 2012; Neta et al. 2012; Aguiéiras et al., 2013). No caso das lipases, podem ser através da esterificação, interesterificação e transesterificação, representando

melhorias significativas no processo, principalmente no que se refere ao tempo de reação, consumo de energia, estabilidade, termoestabilidade e atividade catalítica (Aguieiras et al., 2013). Neste sentido, sendo utilizados principalmente na indústria (cosmética, biomédica, farmacêutica, agrícola, química, detergentes e de alimentos) e em níveis acadêmicos (Neta et al., 2012; Agueiras et al., 2013; Nyari, 2013). Sendo assim, a utilização de irradiação ultrassônica em aplicações químicas torna – se uma alternativa interessante no desempenho de bioprocessos, esta tecnologia tem sido utilizada devido à sua capacidade em aumentar a interação entre as fases através do colapso das bolhas de cavitação, e do jato de ultrassom que rompe as fases dos substratos, auxiliando em processos biotecnológicos influenciando diretamente sobre a atividade e a estabilidade do catalisador (Rokhina et al., 2012). Face ao exposto, objetivo deste estudo foi produzir de oleato de etila a partir de lipase de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em poliuretano submetida irradiação ultrassônica

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A enzima utilizada nesta pesquisa foi a lipase de *Candida antarctica* B (Novozyme NZL-102-LYO-HQ) e os monômeros comerciais Polioliol e Isocianato (Empresa Flexível Poliuretanos – Mannes). Os solventes foram acetona (FMaia), ácido Oléico (Vetec), álcool Etilico (Merck) e hidróxido de Sódio (Nuclear).

2.1 Métodos

2.1 Imobilização

O procedimento de imobilização da enzima CAL B imobilizada em *situ* em espuma rígida de poliuretano (PU) foi realizada na concentração pré-estabelecida (60/40 %) descrita por Nyari (2013) onde são adicionadas 10 % da enzima diluída ao monômero (Polioliol), homogeneizado e em seguida adicionado o isocianato, após 5 min (etapa de polimerização) o derivado imobilizado foi mantido por 24 horas em dessecador e posterior medida da conversão.

2.2 Avaliação do tempo de reação na síntese de ésteres de oleato de etila sob irradiação ultrassônica

A fim de verificar em qual tempo de reação ocorria a maior produção de oleato de etila, foi realizado um estudo de produção em função do tempo (0 a 60 min), onde o meio reacional era composto por ácido oleico e álcool etílico (1:1) em condições reacionais de temperatura de 15 min.

2.3 Otimização da produção de oleato de etila sob irradiação ultrassônica

A fim de otimizar a produção de oleato de etila sob irradiação ultrassônica, foi realizado um DCCR completo 2^3 , as variáveis estudadas foram concentração de enzima (0,016 a 0,184 g), temperatura de reação (24,8 a 72,5 °C) e a agitação ultrassônica (16,6 a 83,6 % - 132 Watts - 40 Hz), fixando a razão molar em 1:1 de ácido/álcool (peso dos substratos (m/v) em 5 g ácido oleico/álcool etílico) e o tempo de reação de 15 min (Trentin et al., 2014).

2.4 Estabilidade Operacional

Depois de otimizados as variáveis de produção de oleato de etila foram realizadas o estudo dos ciclos operacionais da lipase imobilizada, após cada ciclo a lipase imobilizada era submetida a um novo processo sem lavagem, retirado apenas o excesso por meio de centrifugação (2000 rpm) por 5 min, sendo realizado todos em triplicata, repetidos sucessivamente até obtermos resultados inferiores a 50 % da atividade inicial.

2.5 Determinações Analíticas

A atividade de esterificação (U/g) foi quantificada através de uma reação de síntese, empregando a razão molar (ácido/álcool (m/v) (volume substrato)) como reagentes, segundo metodologia descrita por Paroul et al. (2011). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A determinação da conversão das reações é feita acompanhando a redução da área do sinal do agente limitante (Paula et al., 2005).

2.6 Análise Estatística

A análise de variância seguida pelo teste de Tukey foi aplicado para a análise estatística dos dados obtidos. Os dados foram tratados com o auxílio do programa software Statistica $\text{\textcircled{R}}$ 8.0 (Statsoft Inc) foi usado para auxiliar o design e a estatística análise de informação experimental, adotando em todos os casos estudados um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Imobilização

O procedimento de imobilização da enzima CAL B imobilizada em *situ* em espuma rígida de poliuretano (PU) foi realizada na concentração pré-estabelecida (60/40 %) descrita por Nyari (2013) onde são adicionadas 10 % da enzima diluída ao monômero (Poliol), homogeneizado e em seguida adicionado o isocianato, após 5 min (etapa de polimerização) o derivado imobilizado foi mantido por 24 horas em dessecador e posterior medida da atividade por esterificação e seu rendimento.

3.2 Avaliação do tempo de reação na síntese de ésteres de oleato de etila sob irradiação ultrassônica

A determinação do tempo de reação é importante, pois através desta há possibilidade de agilizar o processo, evitar perdas de materiais e solventes, energia, conseqüentemente gerando menor custo do processo. No decorrer de 15 min de reação a atividade de esterificação atingiu seu apice com 1234 U/g e conversão de oleato de etila de 31 %. Estudos reportados na literatura apresentam tempo reacional bem superior aos encontrados neste trabalho. Barboza et al. (1992) concluíram que a utilização do ultrassom em reações químicas possui algumas vantagens, entre elas: redução do tempo de reação, redução da quantidade de reagentes, aumento de rendimento, seletividade, favorecimento de reações que normalmente não ocorrem em condições normais. Liu

et al. (2008) estudaram o efeito da agitação ultrassônica na hidrólise de óleo de soja em sistema livre de solvente, utilizando a CALB, em comparação a agitação mecânica, apresentando um aumento nas taxas de reação de 94 % em 1 hora de reação e 64 % em 2 horas, 58 % em 3 horas, 41 % em 4 horas e de 34 % em 5 horas. Mostrando que a taxa de reação em banho ultrassônico foi de 2,3 vezes maior em 5 horas do que aquela obtida em 12 horas de reação.

3.3 Otimização da produção de oleato de etila sob irradiação ultrassônica

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, matriz do DCCR completo 2^3 , podemos observar que a maior conversão de oleato de etila foi de 40 % no ensaio 12 com concentração de enzima igual a 0,1 g, temperatura de 72,5 °C e 50 % de agitação ultrassônica. Já a maior atividade de esterificação foi de 3707 U/g com rendimento de 242 % no ensaio 4, com concentração de enzima de 0,05 g, temperatura de 50 °C e 70 % de agitação ultrassônica em apenas 15 min de reação.

Tabela 1. Matriz do DCCR completo 2^3 em função das variáveis estudadas para a síntese de ésteres de oleato de etila.

Ensaio	Agitação Ultrassônica (%)	Temperatura (°C)	Concentração de Enzima (g)	Atividade de Esterificação (U/g)	Conversão (%)
1	-1 (30,00)	- 1 (30)	-1 (0,05)	416,6 ± 104,1	2,1 ± 0,2
2	1 (70,00)	- 1 (30)	-1 (0,05)	3641,3 ± 595,2	20,0 ± 0,7
3	-1 (30,00)	1 (50)	-1 (0,05)	1785,7 ± 2199,4	8,1 ± 0,0
4	1 (70,00)	1 (50)	-1 (0,05)	3707,0 ± 1555,0	22,2 ± 3,5
5	-1 (30,00)	- 1 (30)	1 (0,150)	1139,8 ± 572,9	19,2 ± 0,0
6	1 (70,00)	- 1 (30)	1 (0,15)	1795,7 ± 408,6	30,4 ± 2,6
7	-1 (30,00)	1 (50)	1 (0,15)	650,7 ± 136,4	11,2 ± 0,9
8	1 (70,00)	1 (50)	1 (0,15)	1887,6 ± 122,1	30,9 ± 0,7
9	-1,68 (16,4)	0 (40)	0 (0,1)	1064,8 ± 16,1	12,0 ± 0,0
10	1,68 (83,6)	0 (40)	0 (0,1)	867,7 ± 722,6	9,6 ± 1,3
11	0 (50)	-1,68 (24,8)	0 (0,1)	939,3 ± 467,0	10,6 ± 0,9
12	0 (50)	1,68 (72,5)	0 (0,1)	3054,2 ± 341,2	40,4 ± 0,7
13	0 (50)	0 (40)	-1,68 (0,016)	3075,4 ± 198,4	5,6 ± 0,1
14	0 (50)	0 (40)	1,68 (0,184)	1398,5 ± 302,2	28,7 ± 1,3
15	0 (50)	0 (40)	0 (0,1)	1122,9 ± 130,2	12,6 ± 0,4
16	0 (50)	0 (40)	0 (0,1)	1272,4 ± 163,5	14,2 ± 0,4
17	0 (50)	0 (40)	0 (0,1)	1128,3 ± 596,7	13,5 ± 0,1

*Variáveis fixas: Razão molar (ácido/álcool (1:1) m/v 5 g) e 15 min de reação.

A Figura 1 apresenta o diagrama de Pareto com resposta em termos de conversão (%) de oleato de etila em função das variáveis estudadas, com efeito significativo positivo ($p < 0,05$) para a concentração de enzima,

seguida da agitação ultrassônica e da temperatura, ou seja, se aumentarmos os níveis destas variáveis possivelmente ocorreria um incremento na porcentagem de conversão e a interação entre a temperatura e a concentração de enzima apresentou um efeito significativo negativo na síntese de ésteres de oleato de etila. Na literatura podemos comprovar a eficiência da irradiação ultrassônica na conversão em ésteres, mas não especificamente em ésteres de oleato de etila, utilizando enzimas imobilizadas.

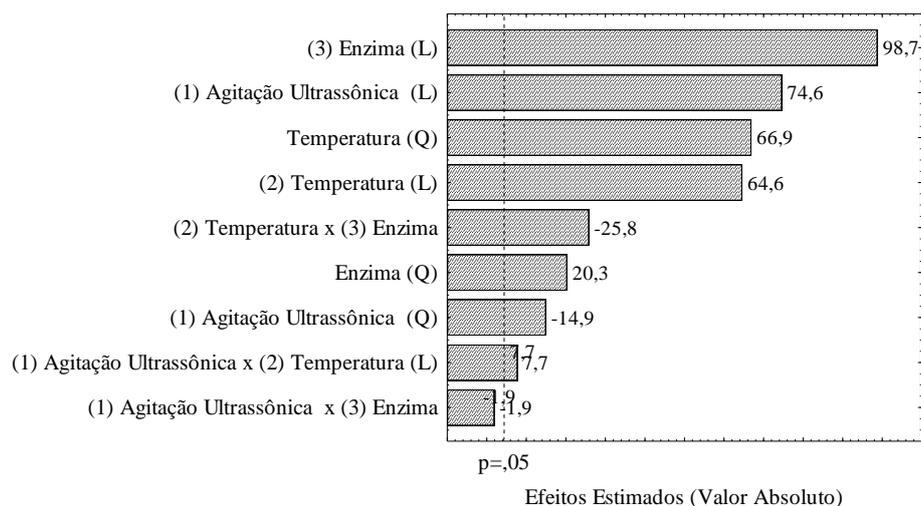


Figura 1. Diagrama de Pareto para a conversão (%) de oleato de etila sob irradiação ultrassônica.

Em alguns estudos relatados na literatura, uma potência considerada ótima é de 60 %, quando utilizada em potências mais baixas, há muito pouca dispersão de ondas e menos dissipação, resultando em bolhas de cavitação mínimas (Khan et al., 2015). Os autores concluíram que estes resultados podem ter sido verificados provavelmente devido ao fato de o ultrassom induzir a uma melhor dispersão e diminuir a aglomeração da enzima.

3.4 Estabilidade Operacional

A lipase imobilizada foi submetida a reações sucessivas de síntese e ela apresentou 24 ciclos de utilização (estabilidade operacional) com atividade residual de 41 % em relação à atividade inicial. Este resultado é superior aos reportados na literatura. Bansode e Rathod (2014) utilizando o ultrassom na síntese de isoamilo butirato usando a lipase (Novozym-435) obtiveram 7 ciclos consecutivos de reutilização livre de solvente orgânico, sendo assim de forma mais ecológica.

4 CONCLUSÃO

A produção de oleato de etila foi otimizada com 40% conversão, rendimento de 242 % e atividade de esterificação de 3707,0 U/g. O reuso da enzima imobilizada na produção de oleato de etila apresentou 24 ciclos

de reutilização com 41 % de atividade residual. Os resultados de conversão de oleato de etila utilizando o sistema de irradiação ultrassônica, são considerados bons, podendo este sistema ser utilizado na indústria, principalmente na de fármacos, cosméticos e até mesmo de alimento, por não se tratar de um método químico.

5 REFERÊNCIAS

- AGUIEIRAS E. C., SOUZA S. L. e LANGONE M. A. Study of immobilized lipase Lipozyme RM IM in esterification reactions for biodiesel synthesis. **Química Nova**. v. 36, n. 5, p. 646-650, 2013.
- BANSODE S. R. e RATHOD V. K. Ultrasound assisted lipase catalysed synthesis of isoamyl butyrate. **Process Biochemistry**. v. 49, n. 8, p. 1297-1303, 2014.
- DHAKA K. P., DESHMUKH K. M., WAGH Y. S., SINGHAL R. S. e BHANAGE B. M. Investigation of steapsin lipase for kinetic resolution of secondary alcohols and synthesis of valuable acetates in non-aqueous reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 77, n. 1, p. 77, 15-23, 2012.
- KHAN N. R., JADHAV S. V. e RATHOD V. K. Lipase catalysed synthesis of cetyl oleate using ultrasound: Optimisation and kinetic studies. **Ultrasonics sonochemistry**. 2015.
- LIU Z., CHI Z., WANG L., e LI J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2. 3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**. 40. v. 3, n. 1, p. 445-451, 2008.
- NETA N. S., CUNHA J. A. C., SANCHO S. O., ABREU R. F. A., PONTES D. F., CARIOCA J. O. B. E TEIXEIRA J. A. Produção enzimática do ester oleato de etila utilizando lipase a partir de *Candida antarctica* B **Revista Holos**. v. 2, n. 1, p.1807-1600, 2012.
- NYARI N. L. D., Estudo da Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B em Poliuretano. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI, Erechim, 2013.
- PALUDO N., ALVES J. S., ALTMANN C., AYUB M. A., FERNANDEZ-LAFUENTE R. e RODRIGUES R. C. The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 22, n. 1, p. 89-94, 2015.
- PAROUL N., GRZEGOZESKI L. P., CHIARADIA V., TREICHEL H., CANSIAN R. L., OLIVEIRA J. V. e OLIVEIRA D. Erratum to: Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 34, n. 3, p. 331-337, 2011.
- PAULA A. V. D., BARBOZA J. C. e CASTRO H. F. D. Study of the influence of solvent, carbohydrate and fatty acid in the enzymatic synthesis of sugar esters by lipases. **Química Nova**. v. 28, n. 5, 792-796, 2005.
- ROKHINA E. V., LAHTINEN M., MAKAROVA K., JEGATHEESAN V. e VIRKUTYTE J. Theoretical and practical aspects of chemical functionalization of carbon nanofibers (CNFs): DFT calculations and adsorption study. **Bioresource Technology**. v. 113, n. 1, p. 127-131, 2012.
- TRENTIN C. M., SCHERER R. P., DALLA ROSA C., TREICHEL H., OLIVEIRA D. e OLIVEIRA J. V. Continuous lipase-catalyzed esterification of soybean fatty acids under ultrasound irradiation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 37, n. 5, p. 841-847, 2014.