

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE AÇÚCARES EMPREGANDO LIPASE PANCREÁTICA IMOBILIZADA EM POLISILOXANO-ÁLCOOL POLIVINÍLICO

*Ariela Velozo de Paula, Grazielle dos Santos Silva, Heizir F. de Castro**

Faculdade de Engenharia Química de Lorena/ Departamento de Engenharia Química,
CP 116, 12600-970 Lorena-SP, e-mail: heizir@dequi.fauenquil.br

Palavras-chave: Surfactantes, lipase, carboidratos, esterificação

Área do Conhecimento: III, Engenharias

Resumo - A influência do tipo de carboidrato (glicose, frutose e sacarose) e tamanho da cadeia de ácido graxo (láurico, palmítico e oléico) foi verificada no desempenho da síntese de ésteres de açúcares (surfactantes) em meio à solvente empregando como catalisador uma preparação experimental de lipase pancreática imobilizada em partículas de polisiloxano-álcool polivinílico. De acordo com os resultados obtidos, os carboidratos foram preferencialmente esterificados na seguinte ordem: sacarose < glicose < frutose. O tamanho da cadeia do ácido graxo não influenciou significativamente nas conversões molares obtidas. Os sistemas constituídos de frutose e ácidos láurico ou oleico foram os mais efetivos na obtenção dos ésteres de açúcares, alcançando conversões molares de 50 e 52,83 %, respectivamente.

Introdução

Ésteres de açúcares são surfactantes sintetizados a partir de substratos renováveis e possuem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular. Apresentam características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência [1]. Outra vantagem reside no fato de serem compostos que não são derivados de petróleo, fator importante à medida que os preços do petróleo aumentam.

A síntese desses compostos pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos. Os métodos químicos de acetilação de açúcares apresentam custo elevado e utilizam solventes tóxicos, além de serem baseados no uso de altas temperaturas para promover a esterificação [2]. O processo enzimático consiste em utilizar lipases na síntese desses emulsificantes.

Lipases são biocatalisadores de grande importância em diferentes áreas, podendo catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Este fenômeno é primariamente devido à sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, e quimio-regio e enantiosseletividade. As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, farmacológicas (síntese de naxopreno), agroquímica (inseticidas e pesticidas) e oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) [3], [4].

O presente trabalho teve como objetivo estudar os parâmetros que afetam a esterificação de carboidratos com ácidos graxos utilizando a enzima lipase como biocatalisador. A limitação deste processo é referente à alta polaridade do solvente requerido para dissolução dos açúcares, o que pode ocasionar inativação da preparação enzimática [5], [6]. Os experimentos foram realizados com a lipase pancreática imobilizada em partículas de polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA), em função do bom desempenho demonstrado em trabalhos anteriores desenvolvidos [7], [8].

Materiais e Métodos

Enzima: Todos os experimentos foram efetuados com lipase de pâncreas de porco (Tipo II, Sigma) na forma imobilizada em partículas de polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA), com atividade média de 500 U/mg de suporte [7] (hidrólise do azeite de oliva).

Procedimento geral da síntese: As sínteses foram realizadas em frascos de 50 mL contendo misturas adequadas de carboidrato (frutose-grau analítico, glicose-Química Moderna ou sacarose-grau comercial) e ácido graxo (láurico e palmítico-Merck, oleico-Reagen) dissolvidos em tert-butanol (Merck) e lipase pancreática imobilizada em POS-PVA [8], numa proporção fixa de 10% (m/v) em relação a massa total dos reagentes. As reações foram conduzidas na temperatura de $38 \pm 2^\circ\text{C}$, por um período máximo de 6 h em banho termostaticado com agitação (Modelo 145, MARCONI). O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas (1mL), ao longo da reação e quantificado o teor

de ácido graxo. Os substratos foram previamente desidratados com peneira molecular 0,32 cm de diâmetro (Silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X-BHD Chemicals.

Análise da concentração de ácido graxo: A concentração de ácido graxo foi determinada por titulação de alíquotas dissolvidas em 10 mL de etanol p.a (98°GL, Comercial), empregando-se solução alcoólica de KOH 0,02N (Merck) e fenoftaleína como indicador [9], utilizando bureta digital de 50mL (Hirshmann Techcolor). Os cálculos foram efetuados pela equação 1.

$$AG \text{ (g/L)} = \frac{V * N * M}{m} \quad (1)$$

em que: M = massa molecular do ácido graxo titulado (mol); N = normalidade da solução de KOH (mL); m = massa da alíquota titulada (g).

A conversão do substrato foi expressa em conversão molar do ácido graxo consumido, empregando a equação 2.

$$\% \text{ Molar} = [(C_0 - C) / C_0] * 100 \quad (2)$$

em que: C₀ = concentração inicial do reagente e C = concentração do reagente em um determinado tempo.

Resultados

Em trabalho anterior [7], tert-butanol foi selecionado como solvente mais adequado para efetuar a síntese de oleato de frutose, pois permitiu a solubilização parcial dos materiais de partida (açúcares) sendo, ao mesmo tempo, atóxico e compatível com a preparação de lipase pancreática imobilizada em partículas de polisiloxano-álcool polivinílico [8].

Adotando as condições anteriormente estabelecidas [7] foi verificada a influência do tipo de açúcar e ácido graxo no rendimento da esterificação. Nas Figuras 1 a 3 são apresentados os perfis das curvas de consumo de cada ácido graxo para os três tipos de carboidratos testados. Na Tabela 1 apresenta-se para cada par carboidrato e ácido graxo testado, a conversão máxima de ácido graxo obtida.

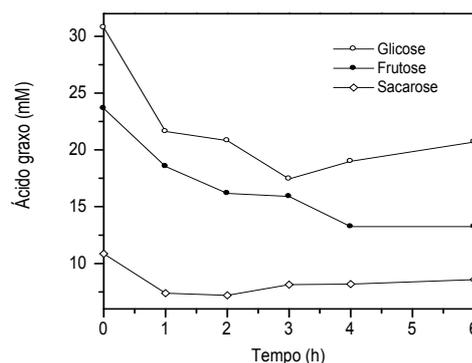


Figura 1: Influência do tipo de carboidrato no consumo do ácido láurico na formação de ésteres de açúcares.

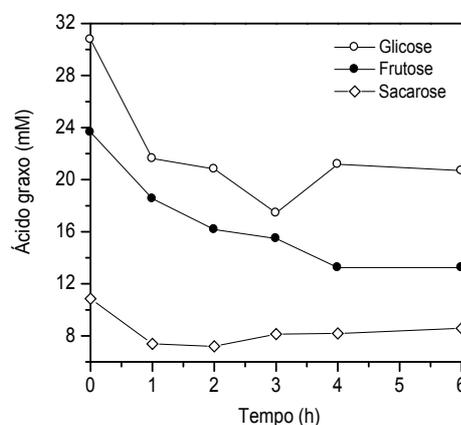


Figura 2: Influência do tipo de carboidrato no consumo do ácido palmítico na formação de ésteres de açúcares.

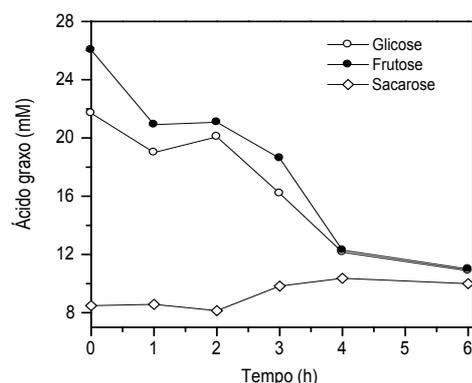


Figura 3: Influência do tipo de carboidrato no consumo do ácido oleico na formação de ésteres de açúcares.

Tabela 1: Influência do carboidrato e ácido graxo no rendimento da esterificação empregando lipase pancreática imobilizada em POS-PVA

Açúcar	Ácido graxo	Máxima conversão (%)	Tempo (h)
Glic	C12	27,33	2
	C16	43,32	3
	C18	49,79	6
Frut	C12	50,00	3
	C16	44,00	4
	C18	52,83	4
Sac	C12	8,37	4
	C16	33,68	2
	C18	4,12	2

Concentração do carboidrato (450 μ M), do ácido graxo (2250 μ M); massa de lipase (0,5 g LPP imobilizada em POS-PVA).

Discussão

De uma maneira geral o ácido palmítico promoveu formação do éster para todos os carboidratos testados, sendo que a reação enzimática ocorreu em ordem crescente (frutose > glicose > sacarose). O ácido oleico foi efetivo para formação do oleato de frutose (52,83%) e oleato de glicose (49,79%) com rendimentos bastante similares. Entretanto, não promoveu conversões eficientes para o carboidrato sacarose, alcançando apenas uma conversão da ordem de 4,12%, possivelmente devido ao tamanho da cadeia deste carboidrato (C12) provocando, nesse caso particular, um impedimento estérico da enzima.

O ácido láurico apresentou um comportamento similar ao obtido pelo ácido oleico, entretanto apenas o laurato de frutose foi obtido com rendimentos elevados (conversão de 50%). Entre todos os sistemas reacionais testados o melhor desempenho foi alcançado pelo par frutose e ácido oleico.

Os resultados obtidos são bastante satisfatórios, quando comparados com aqueles reportados na literatura, conforme mostrado na Tabela 2. Tais resultados podem ser creditados a especificidade da enzima selecionada e suporte de imobilização.

AG	Solvente	Lipase	Máxima conversão (%)	Ref
C14	2-metil-2-butanol	Novozym*	28,5	2
C12	Hexano	Novozym	85 (4 dias)	10
C18	tert-butanol	LPP POS/PVA	52,83 (4 h)	Este trabalho

* preparação comercial de lipase imobilizada (*Candida antarctica*) manufaturada pela empresa

Novozyme (Dinamarca)

Tabela 2: Comparação dos resultados obtidos neste trabalho com dados descritos na literatura para síntese de ésteres de frutose

Conclusões

A conversão do ácido graxo foi dependente do tipo de carboidrato usado. Conversões mais elevadas foram alcançadas quando se empregou frutose como carboidrato (conversão molar > 44%) independente do tipo de ácido graxo. Os sistemas constituídos de frutose e ácidos láurico ou oleico foram os mais efetivos na obtenção de ésteres de açúcares.

Agradecimentos

Os autores agradecem o auxílio financeiro recebido da FAPESP (Processo N ° 03/00654-9).

Referências

- [1] NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades aplicações. **Quim. Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.
- [2] CAO, L., BORNSCHEUER, U. T.; SCHIMID, R. D. Lipase catalyzed solid phase synthesis of sugar ester. Influence of immobilization on the productivity and stability of the enzyme. **J. Mol. Cat. B: Enzym.**, v. 6, 275-285, 1999.
- [3] PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; THOMAZ-SOCCOL, V. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotech. Appl. Biochem.**, v. 29, 119-113, 1999.
- [4] SAXENA, R.K; GHOSH P.K; GUPTA, R; DAVIDSON, W.S; BRADDOO, S; GULATI, R Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. **Cur. Science**, v. 77, 101-115, 1999.
- [5] FABER, K. (1997) *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, 3rd Edition, Springer Produktions-Gesellschaft, Berlin, Cap. 1, 2 e 3.
- [6] BAGI, K.; SIMON, L.M. Comparison of esterification and transesterification of fructose by porcine pancreas lipase immobilized on different supports. **Biotechnol. Techn.** v. 13, p. 309-312, 1999.

[7] PAULA, A.V. (2004). Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. *Relatório final de atividades*. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena. (Projeto FAPESP 03/00654-9, 57 p.)

[8] BRUNO, L. M.; LIMA FILHO, J.L.; MELO, E.H.M.; CASTRO, H.F.; Ester synthesis catalyzed by *Mucor miehe* immobilized onto polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 113/116, p. 189-199, 2004

[9] MACEDO, G.; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na formação de ésteres formadores de aroma. **Cienc. Tecnol. Alim**, v.17, p. 115-119, 1997.

[10] TSITSIMPKOU, C.; DAFLOS, H.; KOLISIS, F.N. Comparative studies on the sugar esters synthesis catalysed by *Candida antarctica* and *Candida rugosa* lipases in hexane. **J. Mol. Cat. B: Enzym.**, v. 3, p. 189-192, 1997.