

Utilização de lipases em reações de esterificação do amido

Lipase in starch esterification reactions

RESUMO

Lipases de *Burkholderiacepacia* foram utilizadas para produção de amido modificado via reações de esterificação. O grau de substituição (relacionado com hidroxilas esterificadas) obtido no presente trabalho foi de 0,65. O amido enzimaticamente modificado apresentou menor temperatura de degradação térmica se comparado ao amido nativo. Filmes foram produzidos com amido nativo e modificado. Tanto a resistência à tração quanto o alongamento na ruptura foram significativamente maiores para os filmes produzidos a partir de blendas de PVA com amido modificado, quando comparado ao filme com amido nativo. O enxerto de grupos ésteres (essencialmente hidrofóbicos) nas cadeias de amido pode provocar um impedimento estérico, respondendo por menor temperatura de degradação, maior flexibilidade e menor solubilidade em água.

PALAVRAS-CHAVE: Amido. Lipase. Modificação enzimática.

Wellington Pintor Menotti
menotti@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Patrícia Salomão Garcia
patriciagarcia@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Milena Martins Andrade
milenaandrade@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Alessandra Machado Baron
alessandrab@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

ABSTRACT

Lipases from *Burkholderiacepacia* were used for the production of modified starch via esterification reactions. The degree of substitution obtained in this work was 0.65. The starch enzymatically modified presented lower thermal degradation when compared to the native starch. Films were produced with native and modified starch. Both the tensile strength and the elongation at break were significantly higher for the films produced from blends of PVA with modified starch when compared to the native starch film. Grafting of ester groups (essentially hydrophobic) on the starch chains can cause steric effect, resulting in lower degradation temperature, greater flexibility and lower solubility in water.

KEYWORDS: Starch. Lipase. Enzymatic Modification.

Recebido: 04 set. 2018.

Aprovado: 04 out. 2018.

Direito autoral:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

O crescente interesse pelo cuidado com o meio ambiente fez crescer a busca por materiais biodegradáveis capazes de substituir polímeros sintéticos derivados de fontes petroquímicas (PEÑA; BOLAÑOS, CASTILLO, 2016). Nesse contexto, o amido se destaca por ser um polímero natural de fácil obtenção, grande disponibilidade e baixo custo. Em contrapartida, filmes produzidos apenas com amido são frágeis e quebradiços, sendo necessário a adição de plastificantes, como glicerol, bem como a formação de blendas poliméricas entre polímeros sintéticos e naturais, melhorando assim suas propriedades (GARCIA et al., 2011; FARIA, VERCELHEZE, MALI, 2012; SUEIRO et al., 2016; VINHAS et al., 2007).

Uma alternativa para melhorar as propriedades dos filmes é realizar a modificação do amido, previamente à mistura com outros polímeros. Essas modificações podem ser químicas, físicas ou enzimáticas, ou uma combinação destas (VINHAS et al., 2007; HENRIQUE, CEREDA, SAMENTO, 2008). Lipases são enzimas que catalisam uma ampla gama de reações, incluindo reações de esterificação.

O objetivo deste trabalho foi realizar a modificação enzimática do amido de mandioca por meio de reações de esterificação com ácido oleico, empregando lipase de *Burkholderiacepacia* como catalisador. O amido modificado foi utilizado para a produção de filmes biodegradáveis com PVA (álcool polivinílico), plastificados com glicerol.

METODOLOGIA

MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO

A modificação do amido por meio de reações de esterificação foi conduzida a partir da metodologia proposta por Xu et al. (2012) com algumas adaptações. Em um béquer contendo 10g de amido de mandioca foram adicionados 15mL de água destilada e 1mL (3 mmol) de ácido oleico. A solução foi homogeneizada e levada ao ultrassom (Sanders Medical-Soni Clean 2PS) a 40°C por 30 minutos. Em seguida, a enzima (1,5g; Atividade da Lipase= 2,7 U mg⁻¹ – Atividade dosada pelo método do pNPP (palmitato de p-nitrofenila) aquoso (WINKLER, U.K.; STUCKMANN, 1979) foi adicionada à solução, e o sistema foi novamente submetido ao ultrassom a 40°C por mais 2h. A enzima, imobilizada em Accurel®, foi retirada e adicionou-se 10mL de hexano ao amido, que foi agitado e centrifugado por 5 minutos, para remoção do ácido que não reagiu. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi separado e repetiu-se o procedimento para extração do ácido oleico não reagente por mais duas vezes, mas utilizando-se 5mL de hexano ao invés de 10mL. Por fim, o amido foi levado à estufa a 45°C por 24h. Da fração orgânica (hexano) retirou-se 100µL para determinar a quantidade de ácido oleico residual pelo método de Lowry-Tinsley (1976). O grau de substituição do amido modificado foi adaptado do trabalho de Zhang et al. (2009).

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada no equipamento da marca Shimadzu modelo TGA-50, para avaliar as propriedades térmicas e possíveis modificações no amido de mandioca. As amostras foram aquecidas de 20 a 600°C



com taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera de nitrogênio (razão de fluxo – 50mL min^{-1}). A estabilidade térmica dos amidos foi avaliada com base nas curvas de TG, no amido nativo e no amido modificado.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FILME

Segundo a metodologia de *casting*, alíquotas de 100g da solução polimérica foram transferidas para placas de polipropileno ($D=150\text{mm}$) e levadas a uma estufa de circulação de ar, a 40°C , por 16 horas, para gelificação incipiente e formação de um filme por evaporação. Foram produzidas duas formulações, uma a partir de amido nativo (Controle) e outra a partir de amido modificado (Modificado). A proporção de amido:PVA foi de 1:1 para as duas formulações. Em ambas, o plastificante empregado foi o glicerol (20% em relação ao amido). Testes de tração foram realizados segundo método da ASTM D882-02 (2002), utilizando um texturômetro modelo TA.TX2 plus (Stable Micro Systems, Inglaterra) de acordo com a metodologia proposta por Garcia et al. (2014). As propriedades avaliadas foram resistência à tração (σ – Mpa) e alongamento na ruptura (ϵ - %). Também foram realizados testes de umidade e solubilidade em água, em que amostras dos filmes (2×2 cm) foram levadas à estufa a 105°C por 24h, depois colocados em erlenmeyers com 20mL de água e deixados sob agitação em um shaker por 24h. Após o tempo de agitação, as amostras foram novamente levadas à estufa a 105°C por 24h, e pode-se então determinar a massa solúvel em água dos filmes produzidos com amido nativo e modificado. Os testes de umidade e solubilidade foram realizados em triplicata.

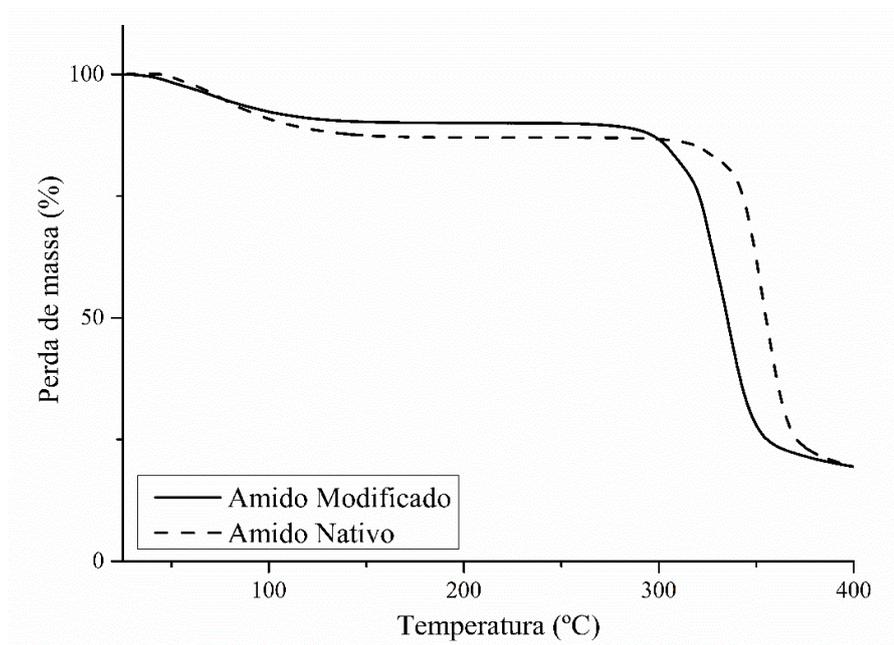
RESULTADOS E DISCUSSÕES

O número máximo possível para o grau de substituição é 3, pois três unidades hidroxilas estão potencialmente disponíveis, e o grau de substituição (GS) obtido do amido foi de 0,65, sendo esse um resultado muito satisfatório, tendo em vista que muitos amidos modificados existentes no comércio apresentam grau de substituição inferior a 0,2 (RUTEMBERG; SOLAREK, 1984). Informações sobre reações de desidratação, oxidação e degradação podem ser obtidas a partir da análise termogravimétrica (TG), caracterizada como a variação de massa da amostra (perda ou ganho) em função da temperatura ou tempo (CANEVAROLO, 2003). A curva de TG, na região de 25 à 400°C , do amido nativo e do enzimaticamente modificado está apresentada na Figura 1.

A perda de massa em temperatura abaixo de 100°C pode ser atribuída à evaporação da água, enquanto de 100°C até a temperatura inicial de decomposição, a perda de massa possa ser em decorrência da volatilização de água e glicerol (JIUGAO et al., 2006). Tanto para o amido nativo quanto para o modificado, a degradação térmica ocorre em uma única etapa, próxima à 300°C .

No entanto, o amido modificado apresentou temperatura de degradação térmica ligeiramente menor que o nativo.

Figura 1 – Curva termogravimétrica (TG) do amido nativo e modificado



Fonte: Autoria própria (2018)

A modificação do amido via esterificação enzimática levou ao enxerto de grupos ésteres em substituição das hidroxilas presentes no amido nativo. A cadeia hidrocarbônica do ácido oleico pode exercer um impedimento estérico que responde pela redução das interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio entre as cadeias de amido, diminuindo assim a estabilidade térmica do amido e comprovando a modificação via catálise enzimática.

O possível impedimento que pode ter favorecido a obtenção de amido com menor estabilidade térmica, justifica a formação de filmes com maior alongamento na ruptura, conforme observado na Tabela 1. Há de se considerar ainda que o enxerto de grupos éster (essencialmente mais hidrofóbico quando comparados à hidroxila) justificam, ainda que sem diferença significativa ($p \geq 0,05$) a produção de filmes com menor solubilidade em água.

Tabela 1 – Propriedades dos Filmes

Filme	W (%)	Sw (%)	T (Mpa)	ϵ (%)
C	14,97 \pm 0,30 ^a	160,63 \pm 74,83 ^a	1,65 \pm 0,07 ^b	72,35 \pm 15,92 ^b
Lip	15,69 \pm 1,99 ^a	105,80 \pm 10,35 ^a	3,54 \pm 0,33 ^a	279,42 \pm 49,74 ^a

Fonte: Autoria própria (2018).

Notas:

W: umidade; Sw: solubilidade em água; T: resistência à tração; ϵ : alongamento na ruptura.

C: filme com amido nativo

Lip: filme com amido enzimaticamente modificado

a,b: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$)



CONCLUSÃO

Apesar do GS apresentar um valor baixo, essa mudança foi suficiente para apresentar notáveis diferenças no amido e no filme. As mudanças obtidas nas propriedades dos filmes foram satisfatórias, e mesmo assim novos estudos serão realizados afim de melhorar ainda mais suas propriedades, aumentando o leque de opções para o uso do filme plástico. Também serão realizados estudos com outros ácidos carboxílicos além do ácido oleico, permitindo avaliar melhor como a estrutura dos grupos ésteres enxertados no amido influenciam em suas propriedades térmicas e mecânicas.



REFERÊNCIAS

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting – D-882-02. In: Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia: ASTM, 2002.

CANEVAROLO JR, S.V. **Técnicas de caracterização**. 1ª Edição. São Paulo: Artiliber, Editora, 2003.

FARIA, Fernando de Oliveira; VERCELHEZE, Ana Elisa Stefani; MALI, Suzana. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. **Química Nova**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.487-492, 2012.

GARCIA, Patrícia Salomão et al. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 9, p.1507-1510, set. 2011.

GARCIA, P. S.; GROSSMANN, M. V. E.; SHIRAI, M. A.; LAZARETTI, M. M.; YAMASHITA, F.; MULLER, C. M. O.; MALI, S..Improving action citric acid as compatibilizer in starch/polyester blow n films. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 305-312, 2014.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, P.; PASCOLI, M.; SARMENTO, B. S. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas-SP, v. 28, n. 1, jan./mar., 2008.

LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. Rapid calorimetric determination off free fatty acids. **J. Am. Oil Chem. Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MENOTTI, W. P. et al. Modificação enzimática do amido de mandioca para desenvolvimento de filmes biodegradáveis. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. Anais eletrônicos. Londrina: UTFPR, 2017.

PEÑA, Sandra Patricia Paz; BOLAÑOS, Pedro Albán; CASTILLO, Héctor Samuel Villada. EFECTO DE ADITIVO MASTERBATCH EN PELÍCULA BIODEGRADABLE DE ALMIDÓN TERMOPLÁSTICO DE YUCA Y ÁCIDO POLILÁCTICO. **Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial**, Popayán, v. 14, n. 1, p.110-118, jun 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v14n1/v14n1a14.pdf>>. Acesso em: 23 ago. 2018.



RUTEMBERG, M.W.; SOLAREK, D. Starch derivatives: production and uses. In:WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.M.; PASCHALL, E.P. (Ed.). Starch: chemistry and technology. 2nd ed. New York: Academic Press, 1984. p. 313-314.

SUEIRO, Ana Claudia et al. BIODEGRADABLE FILMS OF CASSAVA STARCH, PULLULAN AND BACTERIAL CELLULOSE. *Química Nova*, [s.l.], p.1059-1064, 2016.

VINHAS, Glória Maria et al. Evaluation of the types of starch for preparation of LDPE/starch blends. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [s.l.], v. 50, n. 3, p.361-370, maio 2007.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 138, n. 3, pag. 663-670, 1979.

XU, Juan et al. Lipase-coupling esterification of starch with octenyl succinic anhydride. **Carbohydrate Polymers**. [s.l], p. 2137-2144. out. 2011.

ZHANG, L.; XIE, W.; ZHAO, X.; LIU, Y.; GAO, W. Study on the morphology, crystalline structure and thermal properties of yellow ginger starch acetates with different degrees of substitution. **Thermochemica Acta**, 2009.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana e à Universidade Estadual de Londrina, especialmente ao grupo de pesquisa em materiais biodegradáveis (POLIBIOTEC).