

## Efeito do ultrassom na esterificação enzimática do amido

### Effect of ultrasound on the enzymatic esterification of starch

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do ultrassom na esterificação do amido com ácido oleico catalisada por lipases de *Burkholderia cepacia* imobilizadas em Accurel®. Para tal, a reação foi realizada por 2 h em diferentes ciclos de trabalhos (100, 80 e 60%). O amido modificado foi analisado quanto ao grau de substituição (GS), além da análise termogravimétrica (para o amido com maior GS). Os resultados mostraram que o grau de substituição (GS 0,6; 20%) foi maior para o ciclo de trabalho 100%. O amido enzimaticamente modificado apresentou menor temperatura de degradação térmica se comparado ao amido nativo. O amido enzimaticamente modificado apresentou menor temperatura de degradação térmica se comparado ao amido nativo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ultrassom. Amido. Modificação enzimática.

**Gustavo Henrique Marin dos Santos**  
[gustavoh-vitor@hotmail.com](mailto:gustavoh-vitor@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Alessandra Machado Baron**  
[alessandrab@utfpr.edu.br](mailto:alessandrab@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Patrícia Salomão Garcia**  
[p.salomaogarcia@gmail.com](mailto:p.salomaogarcia@gmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Welington Pintor Menotti**  
[menotti@alunos.utfpr.edu.br](mailto:menotti@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

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



#### ABSTRACT

The objective of this work was to study the effect of ultrasound on the esterification of starch with oleic acid catalyzed by *Burkholderia cepacia* lipases immobilized on Accurel®. For this, the reaction was performed for 2 h in different work cycles (100, 80 and 60%). Modified starch was analyzed for degree of substitution (DS), in addition to thermogravimetric analysis (for starch with higher DS). The results showed that the degree of substitution (DS 0.6; 20%) was higher for the 100% duty cycle. Enzymatically modified starch presented lower thermal degradation temperature compared to native starch. Enzymatically modified starch presented lower thermal degradation temperature compared to native starch.

**KEYWORDS:** Ultrasound. Starch. Enzyme Modification.

## INTRODUÇÃO

O amido por ser um polímero natural de fácil obtenção, destaca-se pelo crescente interesse pelo cuidado ambiental, já que suas propriedades são capazes de substituir polímeros derivados de fontes petroquímicas. Em contrapartida, filmes produzidos apenas com amido são frágeis e quebradiços, sendo necessário a adição de plastificantes (PEÑA; BOLAÑOS, CASTILLO, 2016; FARIA, VERCELHEZE, MALI, 2012). Uma alternativa para melhorar as propriedades dos filmes é realizar a modificação do amido, sendo essas químicas, físicas, enzimáticas ou uma combinação destas (VINHAS et al., 2007; HENRIQUE, CEREDA, SAMENTO, 2008).

As reações enzimáticas assistidas por ultrassom apresentam várias vantagens em comparação com os métodos convencionais, como redução do tempo de reação, redução da quantidade de reagentes usados, maior rendimento e quimio-regio e estereosseletividade de reações que normalmente não ocorreriam sob condições normais. O ultrassom contribui principalmente para alterar a temperatura e pressão do microambiente como resultado do efeito cavitacional (LERIN et al., 2014; CHIPLUNKAR et al., 2018). Entretanto, a irradiação ultrassônica produz alta temperatura local e, conseqüentemente, a irradiação constante pode causar desnaturação da enzima (GALGALI, et al., 2018).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar enzimaticamente, a esterificação do amido assistida por diferentes ciclos de trabalho no ultrassom.

## METODOLOGIA

### MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO AMIDO

O amido de mandioca foi inicialmente seco (105°C, 24 h) e a esterificação enzimática foi realizada segundo Xu et al. (2012) com adaptações. Em um béquer, contendo 1 g de amido de mandioca, foram adicionados 1,5 mL de água destilada e 100 µL de ácido oleico (0,3 mmol). A solução foi homogeneizada e levada ao ultrassom (Sanders Medical-Soni Clean 2PS) a 40°C por 30 minutos. Em seguida, 0,15 g de lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel® foi adicionada à solução, e o sistema foi submetido ao ultrassom a 40°C por 2 h em diferentes ciclos de trabalho: 100 % (2 h de ultrassom ligados); 80 % (8 min ligados e 2 desligados, para um total de 2 h) e 60% (6 min ligados e 4 desligados, num total de 2 h). Para a extração do ácido oleico residual, adicionou-se 2 mL de hexano ao amido, que foi agitado e centrifugado. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi separado e repetiu-se o procedimento por mais duas vezes, utilizando duas porções de 1 mL de hexano. As porções foram unidas e uma alíquota de 100 µL foi retirada para determinar a quantidade de ácido oleico residual (LOWRY-TINSLEY, 1976) e determinação do grau de substituição (GS). A quantificação foi realizada em triplicata. O amido foi filtrado e seco em dessecador por 24 h.

### DOSAGEM DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A dosagem da atividade da enzima imobilizada foi realizada através da reação de hidrólise do Palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) em meio aquoso (WINKLER; STUCKMANN, 1979). O meio reacional é formado por 0,5 mL de solução A (3 mg de palmitato de *p*-nitrofenila mL<sup>-1</sup> de isopropanol) e 4,5 mL da

solução B (2 g de Triton X-100; 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0). Desta solução, foram colocados 4,5 mL da solução B e 0,5 mL da solução A. A reação foi iniciada adicionando-se 1 mg da enzima imobilizada em um erlenmeyers de 25 mL. As reações foram realizadas a pH 7,0 e na temperatura de 40 °C, em banho termostatzado, sob agitação manual. em uma cubeta. Estabilizada na temperatura a 40°C, adicionou-se 0,1 mL da solução enzimática ou de tampão (branco). A cinética das reações foi seguida em diferentes intervalos de tempo (1 a 5 min) transferindo-se alíquotas de 1 mL para uma cubeta e simultânea leitura das absorbâncias a 410 nm. As reações foram feitas em triplicata.

#### ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

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°C min<sup>-1</sup> sob atmosfera de nitrogênio (razão de fluxo – 50 mL min<sup>-1</sup>). A estabilidade térmica dos amidos foi avaliada com base nas curvas de TG, no amido nativo e no amido modificado.

#### RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após secagem do amido de mandioca (umidade de 12,5 ± 0,1%), a dosagem da atividade enzimática foi determinada (4,3 ± 0,2 Umg<sup>-1</sup>). A dosagem de atividade é importante, pois a eficiência catalítica de enzimas pode mudar com o tempo de armazenamento. As reações devem ser realizadas sempre com a mesma quantidade em unidades enzimáticas. Para o referido trabalho, significa que a lipase de *B. cepacia* hidrolisa 4,3 µmol de pNPP por min e por mg de enzima.

O número máximo possível para o grau de substituição é 3, pois três unidades hidroxilas estão potencialmente disponíveis no amido, e o grau de substituição (GS) obtido do amido foi de 0,6 (20%); 0,15 (5%) para ciclo de trabalho do ultrassom de 100 e 80% respectivamente. Para o ciclo de trabalho de 60%, não houve substituição (Tabela 1).

Tabela 1 – Influência do ciclo de trabalho do ultrassom na esterificação do amido com ácido oleico por lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em Accuerl®.

Taxa (%) ultrassom	GS	GS (%)
60	-	-
80	0,15 ± 0,01	5
100	0,6 ± 0,047	20

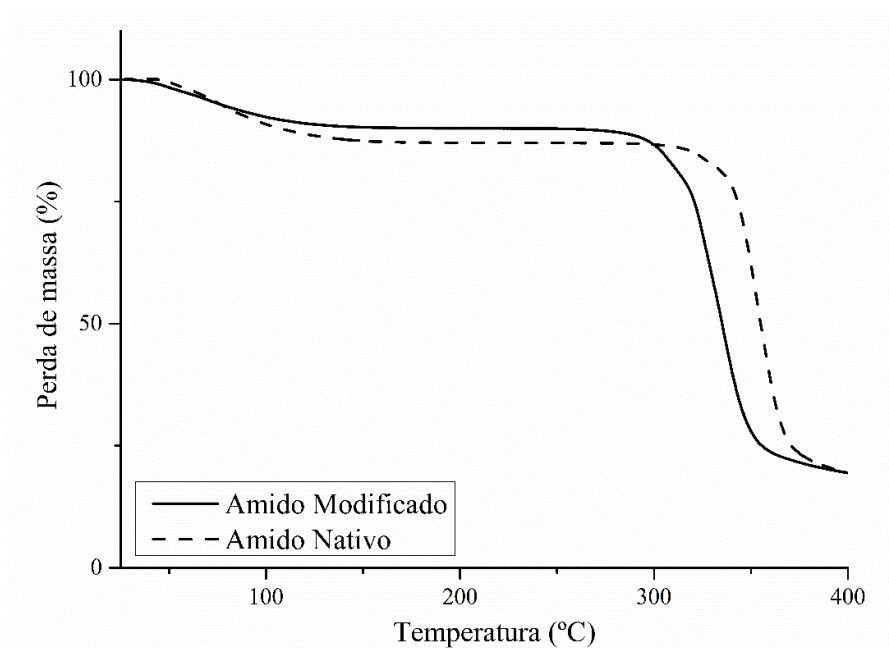
Fonte: Autoria Própria (2019).

Como já comentado, a irradiação constante pode causar desnaturação da enzima e, portanto, é importante estudar a irradiação de ultrassom em modo de pulso. Entretanto, a taxa de conversão, neste trabalho foi maior quando a irradiação ocorreu em modo constante, indicando que a enzima não sofreu desnaturação na primeira utilização.

Os resultados podem ser considerados 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 (ciclo de trabalho do ultrassom de 100%) está apresentada na Figura 1.

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.

## CONCLUSÃO

Foi possível modificar o amido por esterificação catalisada por lipases de *B. cepacia* imobilizada em Accurel® e o ciclo de trabalho do ultrassom influenciou na taxa de conversão do amido, sendo maior para o modo constante (GS 0,6) (ultrassom ligado durante 2 h).

## REFERÊNCIAS

- CHIPLUNKAR, P. P.; ZHAO X, Tomke P.D.; NORO J.; Xu B; WANG Q; Silva C.; PRATAP A. P.; CAVACO-PAULO A. Ultrasound-assisted lipase catalyzed hydrolysis of aspirin methyl ester. *Ultrasonics Sonochemistry*. v 40, p. 587-593, 2018.
- FARIA, F. O.; VERCELHEZE, A. E. S.; MALI, S. 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.
- GALGALI A.; GAWAS S. D.; RATHOD V. K. Ultrasound assisted synthesis of citronellol laurate by using Novozym 435. *Catalysis Today*. v 309, p. 133-139, 2018.
- 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.
- LERIN L.A.; LOSS R.A.; REMONATTO D.; ZENEVICZ M.C.; BALEM M.; NETTO V.O.; NINOW J.L.; TRENTIN C.M.; OLIVEIRA J.V.; de OLIVEIRA D. A. Review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014.
- LOWRY, R.R.; TINSLEY, J.I. Rapid calorimetric determination off free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Society*, v. 53, p. 470-472, 1976.
- PEÑA, S. P. P.; BOLAÑOS, Pedro A.; CASTILLO, H. S. V. 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.
- VINHAS, G. M. 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, J. et al. Lipase-coupling esterification of starch with octenyl succinic anhydride. *Carbohydrate Polymers*. [s.l.], p. 2137-2144. out. 2011.