

MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO AMIDO ASSISTIDA POR ULTRASSON

ENZYMATIC MODIFICATION OF STARCH ASSISTED BY ULTRASOUND

RESUMO

Em busca de substituir polímeros de fonte petroquímica, tem-se em destaque o amido que se caracteriza como um polímero natural; o objetivo deste trabalho foi estudar a esterificação do amido com (1) ácido oléico e (2) itacônico, catalisada por lipase e assistida por ultrassom. Para tal, a reação (1) foi realizada por 2 h em diferentes ciclos de trabalhos no ultrassom (100, 80 e 60 %) e a (2) foi realizada apenas no ciclo 100 %. Os resultados mostraram que o grau de substituição (GS 0,6; 20 %) foi maior para o amido modificado com ácido oleico com o ciclo de trabalho 100 % e não foi observado GS para a modificação com ácido itacônico. A estabilidade térmica para o amido com maior GS, analisada por termogravimetria (TG), foi menor para o amido modificado em relação ao nativo.

PALAVRAS-CHAVE: Amido. Lipase. Esterificação.

ABSTRACT

In search of replacing polymers from a petrochemical source, starch stands out as a natural polymer; this work studied the esterification of starch with (1) oleic acid and (2) itaconic, catalyzed by lipase and assisted by ultrasound. For this, the reaction (1) was carried out for 2 h in different cycles of work in the ultrasound (100, 80 and 60 %) and the (2) was carried out only in the 100 % cycle. The results showed that the degree of substitution (GS 0.6; 20 %) was higher for starch modified with oleic acid with the 100 % duty cycle and GS was not observed for the modification with itaconic acid. The thermal stability for the starch with higher GS, analyzed by thermogravimetry (TG), was lower for the modified starch in relation to the native.

KEYWORDS: Starch. Lipase. Esterification.

Gustavo Henrique Marin dos Santos

gustavoh-vitor@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Alessandra Machado Baron

alessandrab@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Patrícia Salomão Garcia

patriciaagarcia@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

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



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 necessária a adição de plastificantes (PEÑA et al., 2016; FARIA et al., 2012). Uma alternativa para melhorar as propriedades dos filmes é realizar a modificação do amido, sendo essas químicas, físicas, enzimáticas ou uma combinação destas, permitindo que se obtenha macromoléculas com propriedades de maior valor agregado (VINHAS, 2007; HENRIQUE et al., 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 a esterificação do amido catalisada por lipase *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel® e assistida por ultrassom.

METODOLOGIA

LIPASE E DOSAGEM DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática da lipase de *B. cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel® foi realizada antes de iniciar as reações de esterificação, através da reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) em meio aquoso (WINKLER et al., 1979). O meio reacional é formado por 0,5 mL de solução A (3 mg de *p*NPP por mL 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⁻¹, pH 7,0). A reação foi iniciada adicionando-se 1 mg da enzima imobilizada em um Erlenmeyers de 25 mL contendo 5 mL do meio reacional. As reações foram realizadas a pH 7,0 e 40°C, em banho termostatizado, sob agitação manual. A cinética das reações foi seguida de 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.

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. Realizou-se duas metodologias, em ambas se utilizou de um béquer contendo 1 g de amido de mandioca, 1,5 mL de água destilada e 0,3 mmol de ácido carboxílico (metodologia A: 100 µL de ácido oleico e a metodologia B: 0,04 g de ácido itacônico). 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 foi adicionada ao meio reacional e o sistema foi submetido ao ultrassom a 40°C por 2 h. Para a metodologia A realizou-se 3 diferentes taxas no ultrassom 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), enquanto que para a metodologia B utilizou-se apenas o ciclo 100 %. Após a reação, a lipase foi separada por filtração e adicionou-se 2 mL de *n*-hexano ao meio reacional para a extração do ácido carboxílico residual. Em seguida, o meio reacional foi transferido para tubos de centrifuga (CENTRIFUGA CLINICA ÂNGULO FIXO - 12 TUBOS 15 mL 4000 RPM USA MOD 80-2B) de 15 mL, agitados em vórtex por 1 min e centrifugado por 5 min a 3000 rpm. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi separado e o procedimento de extração foi repetido por mais duas vezes, utilizando 1 mL de hexano. As porções foram unidas e uma alíquota de 100 µL foi retirada para determinar a quantidade de ácido carboxílico residual e determinação do grau de substituição (GS) (LOWRY; TINSLEY, 1976). A quantificação foi realizada em triplicata. O amido foi seco em dessecador por 24 h e armazenado a 4°C para análise termogravimétrica (TG).

ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

A análise termogravimétrica (TG) 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⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio (razão de fluxo – 50 mL min⁻¹). 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 U mg⁻¹). 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 *p*NPP por min e por mg de enzima imobilizada.

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 utilizando o ácido oleico 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% e para metodologia B (ácido itacônico), não houve substituição (Tabela 1).

Tabela 1 – Influência do ciclo de trabalho do ultrassom na esterificação do amido catalisada por lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accuerl®.

Metodologia	GS	GS(%)
Met. A - taxa (%) ultrassom:		
60	-	-
80	0,15 ± 0,01	5
100	0,6 ± 0,047	20
Met. B	-	-

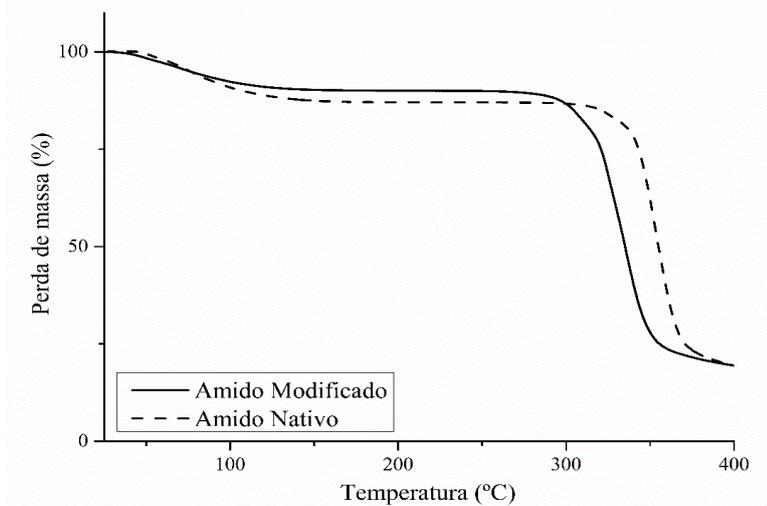
Fonte: Autoria Própria (2020).

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 lipase não sofreu desnaturação na primeira utilização.

Os resultados podem ser considerados satisfatórios, tendo em vista que muitos amidos modificados existentes no comércio apresentam grau de substituição inferior a 0,2 (RUTEMBERG et al., 1984). Entretanto, comparando as substâncias utilizadas responsáveis pelo grupo carboxila (Metodologia A – ácido oleico e Metodologia B – ácido itacônico), verificou-se que não houve substituição quando se utilizou o ácido itacônico, para as condições utilizadas.

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 a 400°C, do amido nativo e do enzimaticamente modificado com ácido oleico (ciclo de trabalho do ultrassom de 100 %) está apresentada na Figura 1.

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



Fonte: MENOTTI et al (2018).

A modificação do amido via esterificação por lipase levou ao enxerto de grupos ésteres em substituição das hidroxilas presentes no amido nativo. Ácidos de cadeias longas saturadas são responsáveis por dar características de um amido termoplástico após a modificação (KUMAR et al., 2014; RAJAN et al., 2008). Entretanto, para os amidos que contêm cadeias longas insaturadas como as oriundas do ácido oléico (18:1), por exemplo, a insaturação em C9 provoca uma curvatura na cadeia e a diminuição das interações de van der Waals intracadeias diminuindo consequentemente à estabilidade térmica do amido modificado.

Outros trabalhos (Quadro 1) relatam a modificação enzimática do amido utilizando condições, lipases e origem do amido diferentes das empregadas neste trabalho, por isso algumas considerações serão feitas, mas a comparação deve ser evitada. Observou-se, por exemplo, que nenhum dos trabalhos utilizou o

ultrassom como metodologia para auxiliar na esterificação. Além disso, é possível que o GS aumente com o tempo de reação, pois Kumar et al. (2014) obtiveram o maior GS (1,68) em um tempo de reação (18 h) muito superior ao empregado neste trabalho (2 h).

Para os casos onde o TG foi realizado, observa-se (Quadro 1) que a estabilidade térmica do amido modificado aumentou quando comparada à do amido nativo (RAJAN et al., 2008; KUMAR et al., 2014). Para os dois casos, o ácido usado na esterificação foi o palmítico (18:0) que não possui insaturação.

Quadro 1 – Tipografia das seções

Lipase	Condições	Principais resultados	Ref.
Novozym 435	25 g de amido de milho ceroso, 9,5 mM AOS; 5 a 11,25 mL de água, 250 µL de NaOH, 0,15 g de lipase, <i>shaker</i> , 40°C, 30 min.	GS 0,0195	XU et al., 2012
<i>Rhizopus oryzae</i>	200 mM de amido de mandioca, 100 mM de ácido palmítico, 200 mg de lipase, <i>shaker</i> , 45°C, 18 h. TDAN: 280°C; TDAM: 496,2°C	GS 1,68; (56%)	KUMAR et al., 2014
Lipase AYS	1 g de amido de mandioca, 0,4 mM de ácido palmítico, 2 g de lipase, 10 mL de DMSO, banho termostático, 70°C, 4 h. TDAN: 280°C; TDAM: 390°C	GS 1,05 (35%)	RAJAN et al., 2008
<i>B. cepacia</i> imobilizada em Accurel	1 g de amido de mandioca, 1,5 mL de água, 100 µL de ácido oleico (0,3 mmol), 150 mg de lipase, ultrassom, 40°C, 2 h, ciclo de trabalho 100 %. TDAN: 330°C; TDAM: 300°C	GS 0,6 (20%)	Este trabalho

AOS: Anidrido Octenil succínico; TDAN: Temperatura de degradação do amido nativo; TDAM: Temperatura de degradação do amido modificado.

Fonte: Autoria própria (2020).

CONCLUSÕES

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, assim como o grupo carboxila empregado, sendo maior para o modo constante (ultrassom ligado durante 2 h) e utilizando o ácido oleico. A estabilidade do amido modificado diminuiu em relação à do amido nativo devido à insaturação presente no ácido oléico.

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.
- KUMAR, V.; YADAV, S.; JAHAN, F.; SAXENA, R. K. Organic synthesis of maize starch based polymer using *Rhizopus oryzae* lipase, scale up, and its Characterization. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, p. 321-331, 2014.
- LERIN, L. A.; LOSS, R. A.; REMONATTO, D.; ZENEVICZ, M. C.; BALEN, 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 and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 12, p. 2381-2394, 2014.
- LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid calorimetric determination off free fatty acids. **Journal of Americam Oil Chemistry Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.
- MENOTTI, W. P. et al. Utilização de lipases em reação de esterificação do amido. In: **SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR**, 2018, Apucarana. Anais eletrônicos. Apucarana: UTFPR, 2018.
- PEÑA, S. P. P.; BOLAÑOS, P. 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.
- RAJAN, A.; SUDHA, J. D.; ABRAHAN, E. Enzymatic modification of cassava starch by fungal lipase. **Industrial crops and products**, v. 27, p. 50-59, 2008.

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.

VINHAS, G. M.; Lima, S. M. de; Santos, L. A.; Lima, M. A. G. de A.; Almeida, Y. M. B. de. 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*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

XU, J.; ZHOU, C.; WANG, R.; YANG, L.; DU, S.; WANG, F.; RUAN, H.; HE, G. Lipase-coupling esterification of starch with octenyl succinic anhydride. **Carbohydrate Polymers.**, v. 87, n. 3, p. 2137-2144, 2012.