

# SÍNTESE DO MIRISTATO DE ISOPROPILA CATALISADA POR LIPASE DE *Candida rugosa* IMOBILIZADA EM PARTÍCULAS MAGNETIZADAS DE ESTIRENO E DIVINILBENZENO

C. A. P. Souza<sup>1</sup>, M. V. C. SILVA<sup>1</sup>, L. Freitas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena  
E-mail para contato: caioprudente@gmail.com

**RESUMO** – As melhores condições da síntese do miristato de isopropila empregando lipase de *Candida rugosa* imobilizada por adsorção física em partículas magnéticas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) foi determinada empregando a técnica do planejamento de experimentos. O suporte foi sintetizado via polimerização em suspensão e magnetizado pela adição de íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ . A influência da razão molar entre o ácido e o álcool e da temperatura foi avaliada em experimentos realizados segundo um planejamento experimental 2<sup>2</sup> estrela rotacional com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central. A partir da análise estatística (95% de confiança), verificou-se que somente a razão molar foi significativa, apresentando influência marcante na síntese do éster, obtendo-se 83% de rendimento teórico em 9h de reação.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta, porém a utilização de recursos não sustentáveis ainda contempla grande parte da sua economia. Assim, é necessário que haja um avanço nas pesquisas sustentáveis, sendo a biotecnologia, apresentada como uma alternativa para essa mudança no panorama econômico brasileiro. Estima-se que no ano de 2020, 20% dos produtos químicos serão resultantes de processos biotecnológicos (Gonçalves, 2013).

Uma importante área da biotecnologia é a implementação de processos enzimáticos, que vem se destacando como uma alternativa promissora para a substituição de processos convencionais. No entanto, tais processos apresentam algumas desvantagens como a dificuldade de recuperação da enzima, solubilidade em alguns meios reacionais e instabilidade concernente a temperatura e pH. Para solucionar esses problemas a técnica de imobilização de enzimas vem sendo cada vez mais estudada e utilizada (De Castro *et al.*, 2010).

Atualmente, diversos materiais são utilizados como suporte para imobilização de enzimas. Dentre eles, destaque especial pode ser dado ao copolímero de estireno e divinilbenzeno magnetizado, por apresentar algumas vantagens em relação aos demais suportes, tais como: elevada área superficial para imobilizar a enzima, maior estabilidade com relação a temperatura e ao pH e facilidade de recuperação do biocatalizador (Ren *et al.*, 2011).

A esterificação de ésteres de cadeia longa é uma das diversas reações as quais as lipases podem catalisar. Estes ésteres são classificados como ésteres emolientes e são vastamente utilizados nas indústrias de cosméticos, de alimentos e de lubrificantes. O miristato de isopropila apresenta excelente espalhabilidade e uma boa absorção pela pele, sendo muito utilizado em composições cosméticas em aplicações *skincare* (Raajeshkumar; Annamma; Arvind, 2015).

Convencionalmente o miristato de isopropila é obtido sob altas temperaturas, tendo como resultado um produto com cor e odor indesejável, necessitando de etapas de purificação e refinamento (Khan *et al.*, 2015). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a influência da temperatura e da razão molar entre os materiais de partida na síntese do miristato de isopropila catalisada pela lipase de *Candida rugosa* imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado, sendo os resultados avaliados por análise estatística.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

Foi usada a lipase microbiana de *Candida rugosa* (tipo VII, Sigma-Aldrich®) na forma imobilizada através do método de adsorção física em poli (estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STY-DVB-M). A atividade hidrolítica da lipase livre foi de  $16372,61 \pm 42,51$  U·g<sup>-1</sup>. Como materiais de partida foram empregados ácido mirístico (Cromoline) e isopropanol (Cromoline) em meio heptano (Cromoline). Para a realização das dosagens de atividade enzimática foram utilizados azeite de oliva comercial com baixo teor ácido (Carbonell) e goma arábica em pó pura (Synth).

### 2.2. Síntese do suporte polimérico magnetizado (STY-DVB-M)

O suporte de STY-DVB foi sintetizado através da técnica de polimerização em suspensão de acordo com Bento *et al.* (2017), sendo adicionada 10% (m/m) de magnetita obtida pelo método de co-precipitação dos íons Fe<sup>+2</sup> e Fe<sup>+3</sup> em meio básico. A magnetita foi previamente tratada com ácido oleico segundo a metodologia descrita por Lee *et al.* (2003). As partículas obtidas foram peneiradas e as retidas entre as peneiras de 24 e 80 Mesh (Tyler) foram escolhidas para a realização da imobilização.

### 2.3. Imobilização da lipase de *Candida rugosa* no suporte polimérico

A imobilização foi realizada via adsorção física, em uma proporção mássica de 1:4 (enzima:suporte) em meio heptano, juntamente com solução aquosa 5 g·L<sup>-1</sup> de polietilenoglicol (100 µL por grama de suporte) por 24 h a 4 °C. O biocatalisador foi recuperado por filtração à vácuo seguido de lavagens com heptano até umidade inferior a 10% (Bento *et al.*, 2017)

### 2.4. Dosagem da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica do biocatalisador foi quantificada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com Soares *et al.* (1999). O rendimento de imobilização ( $\eta\%$ ) foi calculado pela relação de unidades de atividade oferecidas para imobilização e a quantidade recuperada pelo derivado imobilizado.

## 2.5 Síntese do miristato de isopropila

O substrato foi preparado utilizando ácido mirístico e álcool isopropílico em meio heptano, empregando peneira molecular (tipo pellets, Sigma-Aldrich®) ativada em mufla numa relação de 10% (m/v) e armazenado em refrigerador na temperatura de 4-8°C por 18 horas.

Os experimentos foram realizados de acordo com o planejamento estatístico 2<sup>2</sup> estrela rotacional com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central, conforme indicado nas Tabelas 1 e 2. As reações de esterificação foram conduzidas em *Shaker* sob agitação de 200 rpm e temperaturas variadas, em frascos de vidro contendo 20 ml de substrato e 12,5% (m/v) de biocatalisador. Em tempos pré-determinados, foram retiradas alíquotas para quantificar o consumo do ácido por meio da titulação com hidróxido de potássio 0,02 mol·L<sup>-1</sup>.

**Tabela 1** – Variáveis e níveis utilizados no planejamento de experimentos 2<sup>2</sup> estrela rotacional para a síntese do miristato de isopropila.

Variáveis		Níveis				
Reais	Codificadas	- $\alpha$ (-1,414)	-1	0	1	+ $\alpha$ (1,414)
Temperatura (°C)	A	35,9	38	43	48	50,1
Razão molar (ácido:álcool)	B	1:2,20	1:1,25	1,65:1	2,5:1	2,85:1

**Tabela 2** – Matriz experimental do planejamento de experimentos 2<sup>2</sup> estrela rotacional para a síntese do miristato de isopropila.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão Molar (Ácido/ Álcool)
1	48,0	1:1,25
2	38,0	1:1,25
3	43,0	1:2,20
4	48,0	2,50:1
5	38,0	2,50:1
6	43,0	2,85:1
7	50,1	1,65:1
8	35,9	1,65:1
9	43,0	1,65:1
10	43,0	1,65:1
11	43,0	1,65:1

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Atividade hidrolítica e rendimento da imobilização

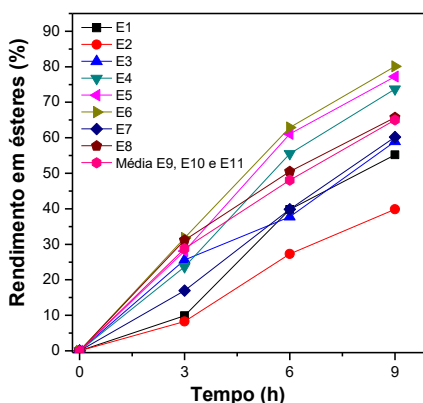
O derivado imobilizado apresentou valor elevado de atividade hidrolítica ( $3536,457 \pm 154,722 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ) e de rendimento de imobilização (95,94%), demonstrando viabilidade de aplicação do suporte magnético sintetizado e a eficácia do método de imobilização proposto.

#### 3.2 Estudo da influência da temperatura e da razão molar na síntese do miristato de isopropila

Visando verificar a influência dos fatores: temperatura e razão molar na síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STY-DVB-M, foi realizado um planejamento experimental  $2^2$  estrela rotacional com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central, tendo como variável resposta o rendimento teórico da reação, ou seja, considerando que todo o reagente limitante foi convertido à éster. A Figura 1 ilustra o perfil dos rendimentos teóricos obtidos nos ensaios efetuados.

Nota-se que os melhores rendimentos foram obtidos para os ensaios 5, 6 e 7, atingindo um máximo de 80% em 9h de reação. Estes testes foram realizados com as razões molares mais elevadas previstas no planejamento estatístico e sob temperaturas variadas, indicando que o excesso do ácido graxo favoreceu a síntese do éster.

**Figura 1** - Perfil dos rendimentos teóricos obtidos para os ensaios realizados a partir do planejamento de experimentos  $2^2$  estrela rotacional para a síntese do miristato de isopropila.

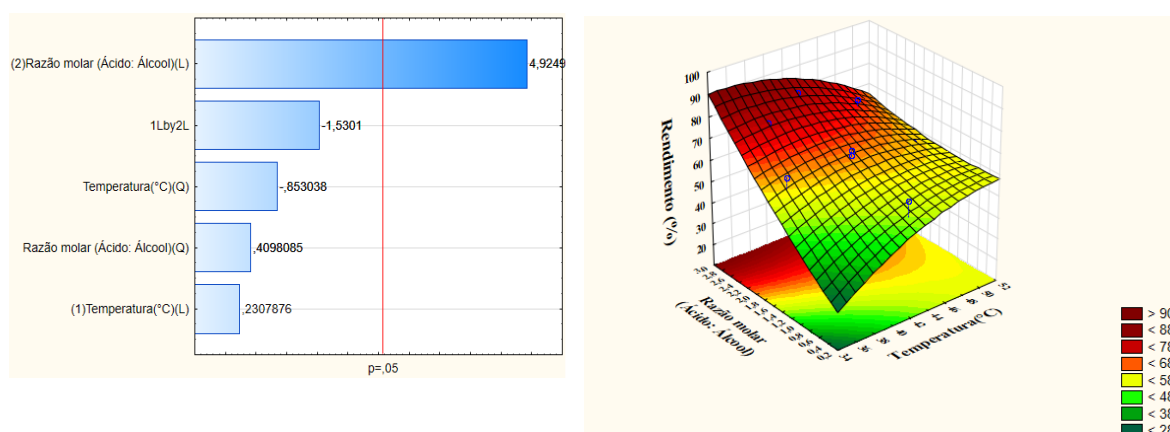


Para a realização da análise estatística foram empregados os softwares Statistica versão 12 (StatSoft Inc., USA) e Design-Expert 10.0 (Stat-Ease Corporation, USA). A Figura 2a mostra o gráfico de Pareto obtido pela análise estatística, apresentando como efeito significativo apenas o termo linear da razão molar (4,92), confirmando que a temperatura não é significativa para a síntese do miristato de isopropila. Esse fato pode ser explicado devido à maior estabilidade conferida à enzima pelo processo de imobilização, tornando-a mais estável termicamente.

A Tabela 3 apresenta a análise de variância (ANOVA), cujo modelo estatístico

proposto (Equação 1), mostrou-se significativo ao nível de 95% de confiança, não sendo constatada falta de ajuste. A Figura 2b ilustra a superfície de resposta gerada a partir dos dados estatísticos obtidos, na qual é possível notar que os maiores valores de rendimento teórico encontram-se na região com razões molares (ácido:álcool) maiores que 2:1 e temperaturas mais amenas.

**Figura 2** - a) Gráfico de pareto e b) Superfície de resposta obtido pela análise estática do planejamento de experimentos  $2^2$  estrela rotacional para a síntese do miristato de isopropila.



**Tabela 3** - ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento  $2^2$  estrela rotacional.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	P
<b>Modelo</b>	1058,51	5	211,70	5,57	0,0413*
<b>A-Temperatura</b>	2,02	1	2,02	0,05	0,8266
<b>B- Razão Molar</b>	921,65	1	921,65	24,26	0,0044*
<b>AB</b>	88,96	1	88,96	2,34	0,1865
<b>A<sup>2</sup></b>	27,65	1	27,65	0,73	0,4326
<b>B<sup>2</sup></b>	6,38	1	6,38	0,17	0,6989
<b>Resíduo</b>	189,99	5	38,00		
<b>Falta de Ajuste</b>	177,96	3	59,32	9,86	0,0935
<b>Erro Puro</b>	12,03	2	6,02		
<b>Cor Total</b>	1248,50	10			

\*p<0,05

$$Y = -197.47160 + 9.49469*A + 55.48197*B - 1.10964*A*B - 0.087947*A^2 + 1.47605*B^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que Y representa o rendimento teórico da reação, A é o valor codificado da variável temperatura (°C) e B é o valor codificado da variável razão molar.

Com o auxílio do programa estatístico Design-Expert 10.0, foi possível encontrar a condição ótima de razão molar e temperatura para a obtenção do maior rendimento em éster, dentro da faixa do estudo realizado. As condições experimentais ótimas indicadas foram: razão molar (ácido: álcool) de 2,79:1 e temperatura de 39,0 °C, tendo como resposta, um rendimento de 84,57%. Para a confirmação do modelo, foi realizado um ensaio nessas

condições, que atingiu 83,10% de rendimento em 9 horas de reação, apresentando um desvio em relação ao valor predito do modelo de 1,74%, considerado plenamente satisfatório.

## 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em poli (estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado apresenta potencial de aplicação industrial na síntese de ésteres emolientes, atingindo rendimentos superiores a 80% empregando temperaturas amenas (39 °C). Pela análise estatística, foi possível constatar que apenas a razão molar do substrato foi significativa e influenciou de forma positiva a síntese do miristato de isopropila, sendo os maiores rendimentos obtidos em níveis mais elevados de razão molar (2,79:1). Além disso, o derivado imobilizado apresentou elevada atividade hidrolítica ( $3536,457 \pm 154,722 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ) e alto rendimento de imobilização (95,94%).

## 5. REFERÊNCIAS

- BENTO, H.B.S.; DE CASTRO, H.F; OLIVEIRA P.C.; FREITAS, L. Magnetized poly(STY-co-DVB) as a matrix for immobilizing microbial lipase to be used in biotransformation. *J. Magn. Magn. Mater.*, v. 426, p. 95-101.
- DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C. Modificação enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício. In: *Biocatálise e Biotransformação – Fundamentos e Aplicações*. 1 ed. São Paulo: Schoba, 2010, v.1, p.275-337.
- GONÇALVES, C. G. S.; MARSAIOLI, A. J. Fatos e Tendências da biocatálise. *Quim. Nova*, v. 36, n. 10, p.1587-1590, 2013.
- KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. *Process Biochem.*, v. 50, p. 1793-1806, 2015.
- LEE, Y.; RHO, J.; JUNG, B. Preparation of Magnetic Ion-Exchange Resins by the Suspension Polymerization of Styrene with Magnetite. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 89, p. 2058–2067, 2003.
- SOARES, C.M.F.; DE CASTRO, H.F.; MOARES, F.F.; ZANIN, G.M., Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 77, p. 745–757, 1999.
- RAJESHKUMAR, N. V.; ANNAMMA, A. O., ARVIND, M. L. Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium Part II: Packed bed reactor (PBR) studies. *Biotechnol. rep.*, v. 8, p. 105-109, 2015.
- REN, Y.; RIVERA, J. G.; HE, L.; KULKARNI, H.; LEE, D.; MESSERSMITH, P. B. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC Biotechnol.*, 11, 1-8, 2011.