

SÍNTESE DE PALMITATO DE ISOAMILA VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA POR LIPASES DE *RHIZOPUS ORYZAE* LIGADAS AO MICÉLIO

A. Ouro Preto¹, W. S. M. Reis², A. K. F. Carvalho¹, E. B. Pereira¹

¹Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Brasil (ouropretoarthur@gmail.com)

²Universidade de São Paulo, Lorena, Brasil

O palmitato de isoamila é um éster que se destaca devido ao seu caráter biolubrificante, sendo ele produzido a partir de reações de esterificação entre o ácido palmítico e o álcool isoamílico. Neste trabalho, foi verificada a atuação de lipases ligadas ao micélio de *Rhizopus oryzae* como catalisadoras da reação e a influência da concentração de álcool no processo. Os resultados indicaram uma conversão de até 83% em 24 horas nas amostras contendo a enzima.

Palavras-chave: Palmitato de isoamila; Esterificação; Lipases ligadas ao micélio; *Rhizopus oryzae*.

INTRODUÇÃO

O constante avanço tecnológico está diretamente relacionado com o crescimento da sociedade como um todo. Afinal, o desenvolvimento de novas tecnologias é fundamental para a síntese de produtos essenciais à vida e para a elaboração de metodologias mais viáveis, tanto economicamente, quanto ambientalmente, voltadas para a sua produção. Nesse sentido, pesquisas abordando a síntese artificial de compostos orgânicos têm sido cada vez mais requeridas, em especial nas indústrias cosméticas e farmacêuticas, devido ao seu baixo custo de produção em larga escala, quando comparado à extração de substâncias orgânicas naturais (Nyari et al., 2019).

Um exemplo desses produtos são os ésteres, os quais despertam um grande interesse no mercado, devido a suas propriedades emolientes, emulsificantes e aromáticas. Estes podem ser produzidos através de reações de esterificação, que ocorrem entre um ácido carboxílico e um álcool (Rajendran et al., 2009).

O palmitato de isoamila é um éster que pode ser obtido a partir da esterificação ocorrida entre o ácido palmítico, extraído do óleo de palma (*Elaeis guineensis*) e o álcool isoamílico. Sua produção é interessante do ponto de vista comercial tendo em vista suas propriedades biolubrificantes, podendo ser empregado para a lubrificação de peças de maquinarias, sem causar consideráveis danos ambientais, devido ao seu caráter biodegradável (Okura et al., 2020).

Visando-se obter um produto com a melhor qualidade possível e minimizar os gastos, mostra-se interessante a utilização de um catalisador para que essas reações

ocorram com o melhor rendimento e no menor tempo possível. Esses catalisadores podem ser de origem química, como, por exemplo, ácidos inorgânicos, ou de origem biológica, como as enzimas. Pensando em uma alternativa mais biosustentável, de menor impacto ambiental, foi optada a utilização de lipases para tal fim, visto que essas enzimas são capazes de catalisar reações envolvendo o consumo de ácidos graxos, tal como o ácido palmítico. No entanto, apesar de seu caráter promissor, a catálise enzimática também pode apresentar alguns empecilhos, sendo o principal deles o alto custo envolvido na utilização de enzimas imobilizadas (Nyari et al., 2019).

Segundo Cortez et al. (2017), existem fungos filamentosos, tais como o *Rhizopus oryzae* e o *Mucor circinelloides*, capazes de produzir lipases ligadas ao seu micélio que apresentam alto poder catalítico, dispensando a necessidade de imobilizá-las, evitando, assim, o alto custo envolvido no processo.

Baseado nisto, o presente estudo teve como principal objetivo a síntese de palmitato de isoamila, a partir da esterificação entre o ácido palmítico e o álcool isoamílico, catalisada por lipases ligadas ao micélio de *Rhizopus oryzae* da cepa CCT3759, além de verificar a influência do aumento da proporção álcool/ácido no processo, a fim de se obter um melhor rendimento possível.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

- Linhagem de *Rhizopus oryzae*, cepa CCT3759 da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello;

- Peptona de soja da HIMEDIA ®
- Fosfato de potássio monobásico da Dinâmica ®;
- Nitrato de sódio da Vetec ®;
- Sulfato de magnésio heptahidratado da Vetec ®;
- Azeite de oliva da Carbonell ®;
- Goma arábica da Dinâmica ®;
- Fosfato de sódio monobásico da Dinâmica ®;
- Fosfato de sódio bibásico da Dinâmica ®;
- Hidróxido de sódio da Vetec ®;
- Álcool etílico 70% da Vetec ®;
- Acetona da Synth ®;
- Fenolftaleína da Synth ®;
- Álcool isoamílico da Dinâmica ®;
- Ácido palmítico da HIMEDIA ®;
- Heptano da Synth ®.

Meio de cultivo

Segundo a metodologia adaptada de Andrade et al. (2014), o meio de cultivo utilizado para o crescimento do fungo foi constituído por 70 g/L de peptona de soja, que atuou como fonte de carboidratos e proteínas; 1 g/L de fosfato de potássio monobásico, 1 g/L de nitrato de sódio e 0,5 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado, que atuaram como agentes de tamponamento e cofatores enzimáticos; e 30 g/L de azeite de oliva, que atuou como fonte de lipídios e indutor da enzima lipase.

Todos os reagentes, com excessão do azeite de oliva, foram pesados com o auxílio de uma balança analítica e dissolvidos em 1 litro de água destilada. Em seguida, transferiu-se 100 mL do meio para erlenmeyers de 250 mL, os quais foram devidamente vedados e autoclavados a 121°C/15 min.

Após a autoclavagem, os erlenmeyers foram resfriados e levados para uma capela de fluxo laminar, onde foram inoculados o azeite de oliva estéril e 1×10^6 esporos, sendo esta contagem realizada com o auxílio de um microscópio binocular e uma câmara de Neubauer.

Após o inóculo, os meios foram incubados em um equipamento *Shaker*, com temperatura a 30°C e agitação orbital a 200 rpm, por 72 horas, onde as células realizaram o processo de fermentação submersa (Reis et al., 2021)

Filtração do meio

Após as 72 horas, os meios de cultivo foram filtrados à vácuo, obtendo-se, no final do processo, a biomassa

contendo as lipases ligadas ao seu micélio. Essa biomassa foi lavada três vezes com acetona e água para remover o excesso de óleo contido em sua superfície, visto que este poderia afetar negativamente a atividade das enzimas.

Determinação da umidade presente na biomassa

A umidade presente na amostra foi quantificada a partir da metodologia proposta por Pereira, Kilikian (2001), na qual 0,25 g da biomassa úmida é pesada e levada a um equipamento microondas a 70% de potência por 5 minutos. Em seguida, a biomassa seca foi pesada, sendo este procedimento repetido até que a massa permaneça constante.

A umidade foi, então, calculada, através da equação 1, onde M_s representa a massa seca (final), M_u representa a massa úmida (inicial) e U representa a umidade em frações decimais.

$$M_s = (1 - U) * M_u \quad (1)$$

Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica determina o poder de catálise que uma enzima possui em relação à conversão de ácidos graxos. Para determiná-la, utilizou-se o método de hidrólise da emulsão de azeite de oliva (Marotti et al., 2017). Seguindo essa metodologia, foi preparada 45 g de uma solução de goma arábica 3% em água destilada, à qual foi posteriormente acrescentado 5 g de azeite de oliva. Com o auxílio de um aparelho *mixer*, a solução foi homogeneizada, formando uma emulsão.

À essa emulsão, foi adicionada 40 g de solução-tampão fosfato, preparada com fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico, pH igual a 6,0, com o intuito de otimizar a reação, visto que estudos realizados por Reis et al. (2021) comprovaram que este é o pH ótimo de atuação dessas enzimas.

Essa emulsão foi dividida em 6 *erlenmeyers* de 125 mL, contendo 9 mL em cada. Em três deles, adicionou-se 0,3 g de biomassa seca, devidamente picotadas em pedaços menores, a fim de se aumentar a superfície de contato, enquanto que, os outros três atuaram como brancos, sem conter a biomassa. Todos foram colocados em um banho-maria com *shaker* a 40°C, sob agitação orbital de 200 rpm.

Após 5 minutos, as amostras foram retiradas, parando todas as reações com a adição de 10 mL de uma solução acetona/álcool etílico 70% 1:1 em cada *erlenmeyer*. Em seguida, realizou-se uma titulação com uma solução de NaOH 0,02 M para cada amostra, medindo o volume de NaOH necessário para neutralizar cada solução.

A partir do volume encontrado para cada amostra contendo a biomassa (V_a) e da média dos volumes dos brancos (V_b), foi possível determinar a atividade lipolítica em U/g para cada solução, utilizando para tal fim a equação 2:

$$Atividade = \frac{(V_a - V_b) * [NaOH] * 10^3}{t(\text{min}) * M_s(\text{g})} \quad (2)$$

Esterificação

Uma vez verificada a viabilidade da enzima a ser trabalhada através da determinação da atividade lipolítica, foi, enfim, realizado o processo de esterificação em si. Para isso, foram preparadas quatro soluções de ácido palmítico/álcool isoamílico 1:1, adicionando-se 0,01 mol de cada reagente em um frasco de Duran. Em seguida, foi acrescentado 20 g de heptano a cada frasco, para que este atuasse como solvente da reação.

Em duas dessas soluções foram introduzidas 0,3 g de biomassa seca, enquanto que as outras duas atuaram como brancos, a fim de se verificar a influência da enzima no processo de esterificação.

Todos os reatores foram posicionados em um banho-maria contendo *shaker* a 40°C, sob agitação orbital de 200 rpm por 24 horas. Alíquotas, em triplicatas, foram retiradas de cada solução e adicionadas a erlenmeyers de 125 mL, contendo 10 ml de uma solução acetona/álcool etílico 1:1, visando a parada da reação. Em seguida, todas as amostras foram tituladas com uma solução de NaOH a 0,02 M. Os volumes necessários para a neutralização foram anotados e, a partir deles, foi possível determinar a porcentagem de conversão de ácido e álcool em ésteres. Este procedimento foi realizado nos tempos 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 24h.

O cálculo do rendimento de esterificação para cada um dos tempos foi calculado utilizando a equação 3, sendo V_i o volume obtido no tempo 0h (Volume inicial) e V_f o volume obtido nos demais tempos (Volume final).

$$Esterificação(\%) = \frac{V_i - V_f}{V_i} * 100 \quad (3)$$

Após verificar a viabilidade da enzima no processo de esterificação, conforme será discutido na apresentação dos resultados, o experimento foi repetido, utilizando diferentes proporções álcool/ácido com o intuito de verificar se a alteração dessa proporção pode aperfeiçoar os resultados obtidos anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de palmitato de isoamila na proporção ácido palmítico/álcool isoamílico 1:1

Os resultados obtidos no primeiro experimento, no qual a proporção álcool/ácido era 1:1, estão descritos na Tabela 1 e na Figura 1.

Tabela 1. Porcentagem de esterificação para ácido palmítico/álcool isoamílico 1:1 na presença e na ausência de lipases ligadas ao micélio de *Rhizopus oryzae* ao longo do tempo.

Tempo	Controle	Com a enzima
0h	0,00	0,00
1h	16,87	45,20
2h	17,68	49,27
4h	29,06	65,24
6h	26,22	70,93
8h	24,39	70,93
10h	25,81	71,14
24h	30,08	74,84

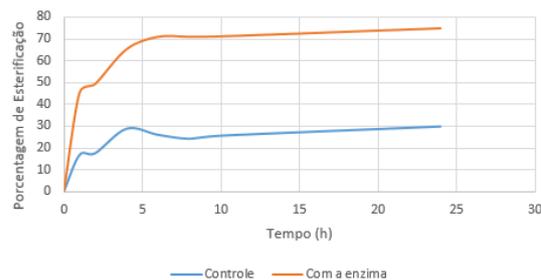


Figura 1. Porcentagem de esterificação para ácido palmítico/álcool isoamílico 1:1 na presença e na ausência de lipases ligadas ao micélio de *Rhizopus oryzae* ao longo do tempo.

A partir da análise da Tabela 1 e da Figura 1, foi possível concluir que, após 24 horas, o rendimento de esterificação das amostras que continham a biomassa (74,84%) se mostrou, aproximadamente, 2,5 vezes maior do que o das amostras que não a continham (30,08%). Com isso, pôde-se confirmar a viabilidade dessas enzimas no processo.

Dessa forma, foram realizados estudos variando a proporção ácido palmítico/álcool isoamílico para 1:1,25, 1:1,5 e 1:2, com o intuito de verificar se as alterações nessas proporções gerariam resultados diferentes. Para isso, além de duplicatas para cada nova proporção, também foram feitos dois novos ensaios para ácido palmítico/álcool isoamílico 1:1, tal como um novo controle (cont).

Os resultados obtidos estão detalhados na Tabela 2 e na Figura 2:

Tabela 2. Porcentagem de esterificação para ácido palmítico/álcool isoamílico, utilizando diferentes concentrações de reagentes.

Tempo	1:1	1:1,25	1:1,5	1:2,0	Cont
0h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1h	2,10	6,41	6,88	9,54	3,14
2h	9,28	8,54	12,86	13,16	3,14
4h	27,85	29,71	29,02	30,02	8,13
6h	35,38	32,21	39,82	40,92	5,91
8h	45,71	43,77	46,52	47,84	4,99
10h	54,29	56,58	57,28	57,56	10,35
24h	79,50	81,50	83,11	79,50	10,91

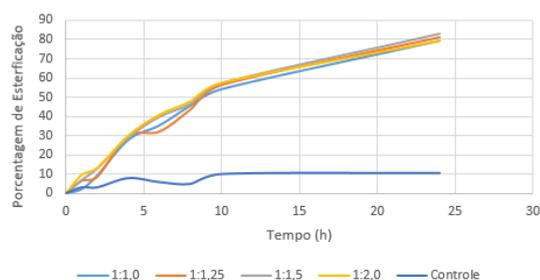


Figura 2. Porcentagem de esterificação para ácido palmítico/álcool isoamílico em diferentes concentrações de álcool.

Analisando a Tabela 2 e a Figura 2, pode-se inferir que, neste novo experimento, as amostras que continham a enzima apresentaram um rendimento (79 a 83%) extremamente maior do que as que não a continham (10,91%), ao passar das 24 horas, sendo este cerca de oito vezes superior.

Também foi percebido uma leve discrepância entre as soluções que continham a biomassa, sendo que, de maneira geral, as amostras que continham maiores concentrações de álcool apresentaram resultados levemente superiores do que as que continham menores concentrações. Com isso, pode-se inferir que o aumento da concentração do álcool tende a deslocar o equilíbrio da reação para a formação dos produtos, sendo este, portanto, um fator que interfere na porcentagem de esterificação. No entanto, após 24 horas de reação, as porcentagens de esterificação se mostraram praticamente iguais para todas as amostras, o que indica que utilizar concentrações menores de álcool gera o mesmo rendimento no final do processo, podendo, portanto, esta ser uma técnica requerida, visando a economia de reagentes.

CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que as lipases ligadas ao micélio de *Rhizopus oryzae* desempenham uma ótima função catalítica, quando comparamos seu rendimento com amostras que não contém o catalisador, sendo esse desempenho até oito vezes superior (79 a 83%).

Também pode-se verificar que, apesar de não ser muito significativo, o leve aumento da concentração de álcool isoamílico tende a deslocar o equilíbrio para a formação dos produtos, facilitando, assim, a ocorrência da reação.

Em trabalhos futuros, seria interessante que fosse elevada ainda mais a concentração do álcool, almejando atingir um rendimento ainda maior.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Alfenas (Bolsa de IC – PIBIC/CNPq) pelo apoio financeiro recebido, assim como aos meus orientadores Ernandes Benedito Pereira e Ana Karine Furtado de Carvalho por sempre me incentivarem com meu trabalho. Por fim, agradeço à minha mãe, pois, sem ela, nada disso seria possível.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, G. S. S. *et al.* *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess Biosyst Eng.**, v. 37, n. 12, p. 2539-2548, 2014. Disponível em: https://docksci.com/mucor-circinelloides-whole-cells-as-a-biocatalyst-for-the-production-of-ethyl-es_5ad1cb82d64ab202a5ac4c6d.html. Acesso em 15 ago. 2021.
- ARAGÃO, V. C. *et al.* Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, vol. 32, n. 9, pp. 2268-2272, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/Vwx5Qk7h7pKgGVpYBvkvh9L/?lang=pt>. Acesso em 15 ago. 2021.
- CORTEZ, D. V. *et al.* Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p. 85-96, 2017. Disponível em: http://quimicanova.sbg.org.br/detalhe_artigo.asp?id=6518. Acesso em: 16 ago. 2021.
- MAROTTI, B. S. *et al.* Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Química Nova**, v. 40, n. 4, p. 427-435, 2017.
- MÉNDEZ, J. J. *et al.* Kinetic study of palmitic acid esterification catalyzed by *Rhizopus oryzae* resting cells. **Acta Biológica Colombiana**, v. 14, n. 1, p. 161-172, 2009. Disponível em:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-548X2009000100011&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 16 ago. 2021.

NYARI, N. L. *et al.* Esterification of acetic acid with alcohol isoamyl in the presence of enzymatic catalyst. **Evidência**, v. 19, n. 2, p. 225-242, 2019. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7253509>. Acesso em: 15 ago. 2021.

OKURA, N. S. *et al.* Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion exchange plus hydrophobic interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 163, p. 550-561, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020337661>. Acesso em 28 mar. 2022.

PEREIRA, D. G.; KILIKIAN, B. V. Effect of Yeast Extract on Growth Kinetics of *Monascus purpureus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 311-316, 2001.

RAJENDRAN, Aravindan. *et al.* Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. **Brazilian Archives of Biology and technology**, v. 52, n. 1, p. 207-219, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/babt/a/tRRWvHbTyMLXpL8qtV4gLrG/abstract/?lang=en>. Acesso em: 15 ago. 2021.

REIS, W. S. M.; FERREIRA, R. D. M.; PEREIRA, E. B. Immobilization of commercial lipase onto different supports: characterization and application in esterification reaction. **Int J Eng Res Sci**, v. 6, p. 15-24, 2020. Disponível em: <https://issuu.com/ijerresearchjournal/docs/ijer-jan-2020-4>. Acesso em: 15 ago. 2021.

REIS, W. S. M. *et al.* Production and Characterization of Whole-Cell *Rhizopus oryzae* CCT3759 to be Applied as Biocatalyst in Vegetable Oils Hydrolysis. **Catalysis Letters**, p. 1-11, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10562-021-03622-8>. Acesso em: 15 ago. 2021.