

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Síntese enzimática do éster acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado

**Juliana Ribeiro Machado¹, Priscila dos Santos Oliveira¹, Gabriela Nayana Pereira¹,
Mara Cristina Picoli Zenevich¹, Débora de Oliveira¹, Jorge Luiz Ninow¹**

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química e Alimentos
Caixa Postal 5040 – 88.040-970 Florianópolis – SC - E-mail: debora@enq.ufsc.br

RESUMO

O acetato de eugenila é um composto obtido através da reação de acetilação entre o eugenol e o anidrido acético via catálise química ou enzimática. Os reatores de leito fixo empacotado vêm sendo empregados como uma alternativa para a síntese de ésteres utilizando solventes orgânicos e enzimas imobilizadas como catalisadores. Porém, é necessário o conhecimento dos efeitos da razão molar de substrato, da temperatura de reação e da vazão de alimentação para obter elevados valores de conversão do produto. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da temperatura de reação e da vazão de alimentação na síntese do éster acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado utilizando a enzima Lipozyme TL IM como catalisador. A maior conversão de éster foi de 96,9 % com vazão de alimentação de 0,8 mL/min e temperatura de reação de 55°C.

Palavras-chave: *Lipozyme TL IM*, acetato de eugenila, lipases

INTRODUÇÃO

Ésteres acetilados derivados do eugenol, principal composto do óleo essencial de cravo-da-índia, vêm sendo pesquisados devido às suas propriedades antimicrobianas e larvicidas (SILVA et al., 2015, CHIARADIA et al. 2012, PANDEY et al., 2013). O acetato de eugenila é um derivado acetilado que pode ser obtido através da reação de acetilação do eugenol com anidrido acético via catálise química ou enzimática. Lipases imobilizadas são enzimas que vem sendo estudadas na síntese de ésteres em sistemas livres de solvente, devido à maior estabilidade e a resistência dos suportes aos solventes orgânicos (STERGIOU et al., 2013).

Os reatores de leito fixo empacotados são uma alternativa para a síntese de ésteres empregando solventes orgânicos e enzimas imobilizadas. Isso porque garantem a estabilidade, possibilitam o reuso do catalisador e não necessitam de etapas complexas de purificação e separação do produto ao final do processo (BALCÃO, PAIVA; MALCATA, 1996). Desta forma, para a garantia de uma síntese de ésteres é necessário o conhecimento de alguns parâmetros como: razão molar de substrato, molaridade, temperatura de reação e tempo de residência (ZHAO et al., 2014, GANGULY; NANDI, 2015). O objetivo do trabalho é avaliar os efeitos da temperatura de reação e vazão de alimentação na síntese do éster acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado empregando a enzima Lipozyme TL IM como catalisador.



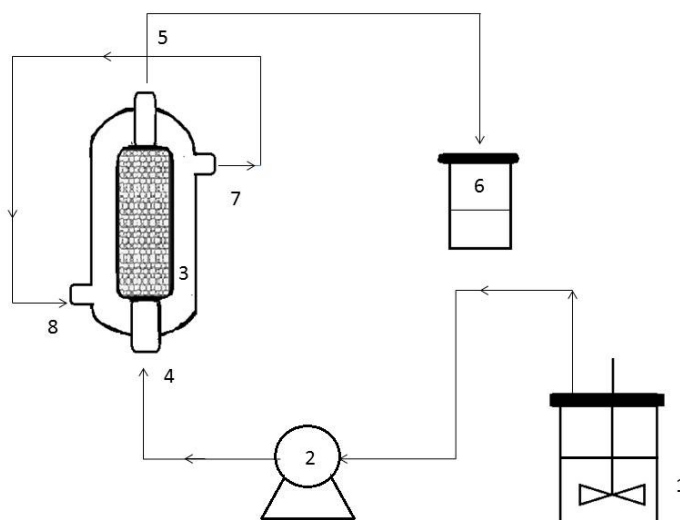
XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

Síntese enzimática do acetato de eugenila

A síntese enzimática do acetato de eugenila foi realizada em reator de leito fixo empacotado com capacidade nominal de 10 mL. Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando a enzima Lipozyme TL IM de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em sílica gel, pela Novozymes Brasil/Araucária – PR. A mistura reacional foi composta por óleo essencial de cravo folha (*Eugenia caryophyllus*) contendo aproximadamente 86 % de eugenol e anidrido acético (Ac_2O) ou $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$ (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$ pureza). A razão molar foi fixada para todos os ensaios em 1 mol de eugenol para 3 moles de anidrido acético, esse valor foi fixado baseado em trabalhos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa. A Figura 1 apresenta o esquema do aparato experimental utilizado na síntese enzimática do acetato de eugenila.

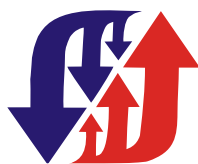
Figura 1. Esquema do aparato experimental utilizado na síntese do acetato de eugenila (1) Recipiente contendo a mistura do substrato; (2) bomba peristáltica; (3) reator de leito fixo empacotado (4) entrada do substrato (5) saída de produto (6) coleta de amostra; água (7 e 8) resfriamento / aquecimento.



A temperatura variou de 55 à 65°C conforme as condições determinadas para cada ensaio. A solução de alimentação foi bombeada com o auxílio de uma bomba peristáltica (ATTA INSTRUMENT) com fluxo ascendente com vazão de alimentação estabelecida para cada ensaio (0,1, 0,8 e 1,35 mL/min). O cálculo do tempo de residência foi feito considerando a razão entre a vazão de alimentação e o volume útil do reator. As amostras foram coletadas a cada tempo de residência.

Determinação da conversão do éster

A quantificação do éster produzido foi realizada por cromatografia gasosa (Shimadzu GC-2010) segundo Chiaradia et al., 2012 com modificações. Sendo analisada a mistura



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

reacional sem o catalisador (branco) e a área do pico comparado com a da reação, conforme a Equação 1:

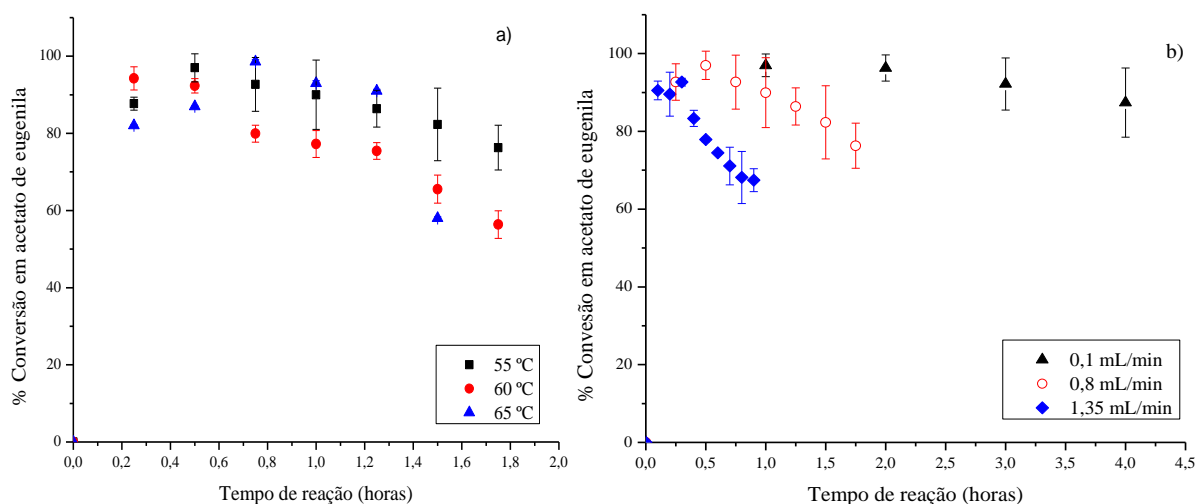
$$AE\% = \frac{100 - (100 * A_{reação})}{A_{branco}} \quad (1)$$

Onde: AE (%) é a quantidade convertida em acetato de eugenila, $A_{reação}$ é a área do pico da reação e A_{branco} é a área do pico do branco. Como padrão químico para identificação do pico correspondente ao éster produzido foi empregado acetato de eugenila (98% de pureza) (Sigma-Aldrich).

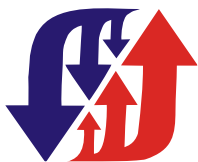
RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 2a apresenta o efeito da temperatura na conversão do acetato de eugenila produzido em reator de leito fixo empacotado. Na temperatura de 55°C ocorreu uma produção elevada do éster alcançando o valor de $96,9 \pm 3,64$ % de conversão em 30 minutos. A temperatura de 60°C e esse tempo de reação foi menor porém com queda da conversão para $94,2 \pm 3,02$ % , a 65 ° C o maior valor de conversão obtido foi de $98,6 \pm 2,5$ % em 45 minutos de reação. A queda da atividade catalítica da enzima pode ocorrer por causa da desnaturação por altas temperaturas elevadas ou pela saturação com o substrato inibindo o sítio ativo (LAFUENTE- FERNANDEZ, 2010). Levando em consideração a economia de energia durante o processo e manutenção da estabilidade da enzima podemos verificar que com menor valor de temperatura empregado 55°C a conversão em acetato de eugenila apresentou valores semelhantes aos ensaios com temperaturas maiores alcançando um valor de $96,9 \pm 3,64$ %.

Figura 2: Efeito da temperatura e da vazão de alimentação na conversão do acetato de eugenila em reator de leito fixo empacotado operando em sistema contínuo. Condições da reação de acetilação: razão molar eugenol: anidrido acético (1:3) e vazão de alimentação de 0,8 mL/min (2a): razão molar eugenol: anidrido acético (1:3) e temperatura de 55°C (2b).



O efeito da vazão de alimentação retirando amostras em diferentes tempos de residência 100 min (0,1 mL/min), 12,5 min (0,8 mL/min), 7,4 min (1,35 mL/min) como está demonstrado na Figura 2b. O ensaio com vazão de 0,1 mL/min apresentou valores de $97 \pm 2,92$ % de conversão em acetato de eugenila em 1 hora de reação. Além disso, observou-se a manutenção da estabilidade da enzima durante 4 horas de reação com os valores de conversão



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

superiores a 90 %. Valores superiores a 90 % de conversão de éster foram alcançados com vazão de alimentação maiores como 0,8 mL/ min $96,9 \pm 3,64$ % em 30 minutos de reação e $92,68 \pm 0,98$ % com 1,35 mL/min em 15 minutos. Porém, os ensaios nos ensaios com maiores valores de vazão de alimentação, ocorreu a uma rápida queda da conversão do éster, esse comportamento pode ter ocorrido devido ao tempo de contato entre o substrato e a enzima ser inferior ao necessário, inibindo a ação catalítica. Além disso o aumento da tensão de cisalhamento dos fluidos pode alterar a estrutura da lipase, o que implica na diminuição da conversão (Zhao et al., 2014).

CONCLUSÕES

A maior conversão de éster foi de $97 \% \pm 2,92$ em 1 hora de reação obtida com vazão de alimentação de 0,1 mL/min e temperatura de 55°C. O reator de leito fixo empacotado empregando enzimas comerciais imobilizadas mostrou-se uma alternativa promissora para obtenção de ésteres de eugenol.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balcao VM, Paiva AL, Malcata FX. 1996. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme Microb Technol* 18:392-416.
- Chiaradia V, Paroul N, Cansian RL, Júnior CV, Detofol MR, Lerin LA, Oliveira JV, Oliveira, D. 2012. Synthesis of Eugenol Esters by Lipase-Catalyzed Reaction in Solvent-Free System. *Appl Biochem Biotechnol* 168:742-751.
- Ganguly S, Nandi S. 2015. Process optimization of lipase catalyzed synthesis of diesters in apacked bed reactor. *Biochem Eng J* 102:2-5.
- Lafuente-Fernandez R. 2010. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J Mol Catal B: Enzym* 62:197-212.
- Pandey SK, Tandon S, Ahmad A, Singh AK, Tripathi AK. 2013. Structure-activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Pest Manag Sci* 69:1235-1238.
- Silva MJA, Loss RA, Laroque DA, Lerin LA, Pereira GN, Thon É, Oliveira JV, Ninow JL, Hense H, Oliveira D. 2015. Lipozyme TL IM as Catalyst for the Synthesis of Eugenyl Acetate in Solvent-Free Acetylation. *Appl Biochem Biotechnol* 176:782-795.
- Stergiou PY, Foukis A, Filippou M, Koukouritaki M, Parapouli M, Theodorou LG, Hatziloukas E, Afrendra A, Pandey A, Papamichael EM. 2013. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol Adv* 31:1846-1859.
- Zhao H, Liu J, Lv F, Ye R, Bie X, Zhang C, Lu Z. 2014. Enzymatic synthesis of lard-based ascorbyl esters in a packed-bed reactor: Optimization by response surface methodology and evaluation of antioxidant properties. *LWT - Food Sci Technol* 57:393-399.