

Síntese de poliésteres de ácidos dicarboxílicos e 1,4-butanodiol catalisada por lipase B de Candida antarctica**Feel of polyesters of dicarboxylic acids and 1,4-butanediol catalyzed by lipase B of Candida antarctica**

DOI:10.34117/bjdv6n10-717

Recebimento dos originais: 13/09/2020

Aceitação para publicação: 30/10/2020

Ivone Sampaio Pereira Campisano

Doutor em Engenharia Química

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: sampaioivone@gmail.com

Erika de Queiros Eugenio

Mestre em Engenharia Química

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil

Faculdade de Tecnologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: erikaqe@fat.uerj.br

Danielle Simas de Queiroz

Bacharel em Engenharia Química

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: danisimas5@hotmail.com

Cláudia de Oliveira Veloso

Doutor em Engenharia Química

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: co.veloso@hotmail.com

Aline Machado de Castro

Doutor em Engenharia Química

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES)/

Petrobras, Rio de Janeiro, Brasil.

E-mail: alinebio@petrobras.com.br

Marta Antunes Pereira Langone

Doutor em Engenharia Química

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: marta.langone@gmail.com

RESUMO

Os polímeros biodegradáveis são amplamente utilizados nas áreas biomédica e ambiental e seu uso cresceu devido a questões ambientais. Esses polímeros são sintetizados através de rotas químicas, mas elevadas temperaturas de reação e catalisadores contendo metais são desvantagens dessas rotas. O uso de lipases como catalisadores para a síntese de poliésteres biodegradáveis é uma alternativa ambientalmente favorável. Neste trabalho, a síntese de poli(sebacato de butila), poli(adipato de butila) e poli(succinato de butila) foi investigada na presença da enzima comercial Novozym®435 (lipase B de *Candida antarctica* imobilizada). Os efeitos da concentração da enzima, da temperatura de reação e do tempo foram estudados. Para estas reações, o consumo dos grupos carboxila presentes no meio reacional foi ligeiramente influenciado pela temperatura e pelo tempo da reação. Por outro lado, o aumento da concentração da enzima levou a um aumento do consumo dos grupos carboxila e da massa molar do polímero na reação com o ácido sebácico. A massa molecular média (M_w) de 8.307 g mol^{-1} foi obtida na reação do ácido sebácico e 1,4-butanodiol a 90° C utilizando 15% m/m de Novozym 435.

Palavras chave: poliésteres, ácido sebácico, ácido adípico, ácido succínico, 1,4-butanodiol, lipase.

ABSTRACT

Biodegradable polymers are widely used in biomedical and environmental areas, and their use has grown due to environmental issues. These polymers are synthesized through chemical routes, but high reaction temperatures and catalysts containing metals are disadvantages of these routes. The use of lipases as catalysts for the synthesis of biodegradable polyesters is an environmentally benign alternative. The synthesis of poly(butyl sebacate), poly(butyl adipate), and poly(butyl succinate) was investigated in the presence of the commercial enzyme Novozym®435 (immobilized *Candida antarctica* lipase B). The effects of enzyme concentration, reaction temperature, and time were studied. For these reactions, the consumption of carboxyl groups present in the reaction medium was slightly influenced by the reaction temperature, and time. On the other hand, the increase in enzyme concentration led to an increase in carboxyl groups' consumption and polymer molecular mass, as observed in the reactions with sebacic acid. An average molecular weight (M_w) of $8,307 \text{ g mol}^{-1}$ was obtained in the reaction of sebacic acid and 1,4-butanediol at 90° C using 15 wt. % of Novozym 435.

Keywords: polyesters, sebacic acid, adipic acid, succinic acid, 1,4-butanediol, lipase.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o interesse em polímeros biodegradáveis cresceu devido a problemas ambientais [1,2]. Poliésteres alifáticos são polímeros biodegradáveis amplamente utilizados nas áreas biomédica e ambiental [1,3]. Eles são adequados para substituir termoplásticos convencionais, pois possuem boa força mecânica e temperaturas de fusão variáveis [1]. Os poliésteres alifáticos possuem características interessantes, uma vez que seus produtos de degradação hidrolítica não são tóxicos e são facilmente suscetíveis a ataques biológicos [2].

Os poliésteres alifáticos biodegradáveis são obtidos pela combinação de dióis, como o 1,2-etanodiol (etilenoglicol), 1,3-propanodiol ou 1,4-butanodiol, e ácidos dicarboxílicos, como o ácido adípico, sebácico ou succínico. As propriedades e biodegradabilidade desses produtos dependem da estrutura, isto é, da combinação de diácidos e dióis utilizados [4,5].

Em geral, estes polímeros são sintetizados quimicamente por reações de policondensação usando uma variedade de catalisadores químicos. No entanto, estas reações são realizadas a elevadas temperaturas (180 a 280° C), promovendo reações secundárias indesejáveis [6,7]. Materiais de elevada massa molar foram sintetizados empregando catalisadores organometálicos. Desta forma, torna-se evidente o crescente interesse por rotas alternativas, já que os metais podem permanecer no produto final, tornando-o prejudicial para o meio ambiente e tóxico para aplicações biomédicas.

Em comparação com a via química, a policondensação enzimática, especialmente a polimerização catalisada por lipases (triacilglicerol acilhidrolase, EC 3.1.1.3) tem muitas vantagens [1,8,9], incluindo a elevada atividade catalítica, o emprego de condições brandas de reação, alta seletividade, a não necessidade de exclusão rigorosa de ar e/ou umidade, além da não necessidade da remoção completa e rigorosa do biocatalisador dos produtos devido à natureza proteica e não tóxica das enzimas e à fácil separação do biocatalisador dos produtos para reutilização, se for empregada a enzima imobilizada [10,11]. Logo, a polimerização enzimática tem sido considerada como um processo ambientalmente amigável para a síntese de materiais poliméricos [11-15].

Dentre as lipases empregadas em reações de síntese, destaca-se a lipase B de *Candida antarctica* (CALB), que apresenta alta atividade catalítica para a esterificação de ácidos dicarboxílicos [10,16-18]. A CALB imobilizada comercial mais utilizada é a Novozym®435 que é preparada pela adsorção física da enzima CALB sobre uma resina acrílica macroporosa. Sua elevada atividade, estabilidade térmica, seletividade e especificidade a tornam um catalisador versátil para reações orgânicas.

Binns *et al.* [18] estudaram a polimerização enzimática de ácido adípico e 1,4-butanodiol, empregando a lipase de *Candida antarctica*, em um sistema sem solvente e outro com tolueno. As polimerizações em tolueno resultaram em produtos com valores de dispersidade ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$) maior. A

massa molar ponderal média (M_w) para as polimerizações em meio sem solvente e na presença de tolueno foi de 2.227 e de 1.341 g/mol, enquanto que a dispersidade ($DM=M_w/M_n$) foi de 1,5 e de 2,3, respectivamente.

Resultados similares foram encontrados por Mahapatro *et al.* [19]. Os autores também investigaram os efeitos do comprimento da cadeia do diácido e do diol na massa molar final do polímero. Os resultados mostraram que os sistemas com diácidos (ácido sebácico e adípico) e dióis (1,8-octanodiol e 1,6-hexanodiol) de comprimentos maiores apresentaram maior reatividade do que os sistemas com diácidos de comprimentos de cadeias menores (ácidos succínico e glutárico) e 1,4-butanodiol. Ribeiro *et al.* [20] estudaram a polimerização da glicerina com diácidos de tamanho de cadeia diferentes utilizando um catalisador químico, o ácido p-toluenosulfônico, e observaram que o diácido com cadeia de maior tamanho resultou em um poliéster com maior massa molar e dispersidade.

Considerando a viabilidade das reações catalisadas por lipases em um sistema isento de solventes, o principal objetivo deste estudo foi investigar a influência que a temperatura e a concentração de enzima exercem na poliesterificação de ácidos dicarboxílicos com 1,4-butanodiol.

2 EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAIS

Ácido sebácico 99%, ácido adípico 99,5% e ácido succínico 99% foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O 1,4-butanodiol P.A. foi obtido da Tedia High Pure Solvents (Brasil). Novozym®435 (N435) foi fornecida pela Novozymes Latin America Ltda (Brasil) e consiste na lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica macroporosa Lewatit VPOC 1600.

2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da esterificação foi determinada pelo consumo de ácido oleico na reação de esterificação com butanol (razão molar ácido oleico/butanol igual a 1), empregando 3% m/m do biocatalisador a 45° C, de acordo com a metodologia descrita por Souza *et al.* [21]. Uma unidade de esterificação (U) foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μ mol de ácido oleico por minuto nestas condições experimentais. A atividade de esterificação da lipase comercial imobilizada Novozym®435 foi de 4.500 U g⁻¹.

2.3 REAÇÕES DE POLICONDENSAÇÃO CATALISADAS POR LIPASE

O poli(sebacato de butila), o poli(adipato de butila) e o poli(succinato de butila) foram sintetizados pela esterificação do ácido dicarboxílico e 1,4-butanodiol. A síntese foi realizada num

reator batelada de 15 mL dotado de agitação magnética e acoplado a um condensador. A temperatura foi mantida constante pela circulação de etilenoglicol pela camisa do reator.

O progresso da reação foi monitorado pela amostragem de alíquotas de 100 μL em vários intervalos de tempo. Essas alíquotas foram pesadas, dissolvidas em uma mistura de etanol e acetona (40 mL) e o consumo de grupos carboxila foi determinado por volumetria de neutralização com hidróxido de sódio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando um titulador Mettler Toledo T50. A quantidade inicial de grupos carboxila foi calculada a partir da massa de ácido empregada na reação.

Os efeitos da temperatura (80 e 90°C) e da concentração de enzima (5, 10 e 15% m/m) foram investigados a fim de obter um maior consumo dos grupos carboxila e uma maior massa molar do polímero.

2.4 CROMATOGRAFIA DE PERMEACÃO EM GEL

As massas molares médias numérica (M_n) e ponderal (M_w) dos polímeros foram determinadas por cromatografia de permeação em gel (GPC) utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC20 equipado com detector de índice de refração (RID-20A) e coluna Shodex (GPC HFIP 805). O eluente utilizado foi o hexafluor-2-propanol (HFIP) contendo $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de trifluoroacetato de sódio a uma vazão de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Concentrações de 0,2% m/m e volumes de injeção de 10 μL foram utilizados nas injeções.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito da temperatura (80 e 90°C) e do tempo de reação (24, 48, 72 e 96 h) nas reações de policondensação dos ácidos dicarboxílicos (A) com 1,4-butanodiol (B) foram estudados. Para tal, 5% m/m de Novozym®435 (N435) e uma razão molar ácido/1,4-butanodiol igual a 1 foram empregados, uma vez que esta é a proporção adequada para a obtenção de um poliéster de elevada massa molar [9, 19, 22] na reação policondensação AA+ BB. Os ácidos succínico, adípico e sebácico apresentam baixa solubilidade em 1,4-butanodiol nas condições reacionais testadas. Para ambas as temperaturas testadas, observou-se que, durante o tempo de reação, a baixa homogeneidade inicial do meio diminuiu, como indicado pela literatura [18], à medida em que a reação prosseguiu e os oligômeros foram formados. Geralmente, um solvente (como éter difenílico) é adicionado à mistura reacional para promover a difusão dos reagentes durante a poliesterificação. No entanto, o solvente costuma ser tóxico e deve ser completamente removido do produto.

O aumento da temperatura melhora a solubilidade dos substratos, bem como reduz a viscosidade, diminuindo, portanto, as limitações à transferência de massa. No entanto, temperaturas elevadas também podem ocasionar a desativação da enzima devido ao processo de desnaturação.

Conforme relatado na literatura [19, 23], a N435 é termoestável e apresenta atividade catalítica mesmo a 90° C.

As Figuras 1 e 2 mostram o consumo de grupos carboxila obtidos para a reação entre o ácido sebácico, adípico e succínico com o 1,4-butanodiol nas temperaturas de 80 e 90° C, respectivamente. Em geral, para os ácidos testados, observou-se que tanto o tempo quanto a temperatura da reação influenciaram ligeiramente o consumo dos grupos carboxílicos. O maior consumo destes grupos foi observado a 90° C.

Um experimento de controle foi realizado sem o uso de N435 como biocatalisador (teste em branco) e os resultados experimentais são apresentados na Figura 3. Apesar da elevada conversão observada para as reações conduzidas na ausência do catalisador, tais dados confirmam que a presença do catalisador influencia a reação de policondensação, já que a análise do produto da reação por GPC (Tabela 1) mostra que não houve sequer a formação de oligômeros durante as 96 h de reação sem enzima para as reações do ácido sebácico e do ácido adípico com 1,4-butanodiol.

O aumento do comprimento da cadeia hidrocarbônica nas reações catalisadas pela lipase resultou no aumento das massas molares numérica e ponderal do oligômero formado. Um efeito oposto foi observado nos experimentos de controle (testes em branco). Mahapatro *et al.* [19] investigaram a policondensação por esterificação de ácidos dicarboxílicos (ácidos succínico, glutárico, adípico e sebácico) e dióis (1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol e 1,8-octanodiol) utilizando lipase B de *Candida antarctica* (N435). Os autores também observaram que as reações envolvendo diácidos e dióis com cadeias mais longas produziram polímeros com maior massa molecular quando comparados aos monômeros de cadeia mais curta. Os monômeros lineares α,ω -diácidos e dióis com seis ou mais carbonos foram copolimerizados mais rapidamente na presença da N435.

Figura 1. Influência do tempo na conversão dos grupos carboxila na reação de esterificação dos ácidos carboxílicos estudados e 1,4-butanodiol empregando 5% m/m de Novozym®435 a 80° C.

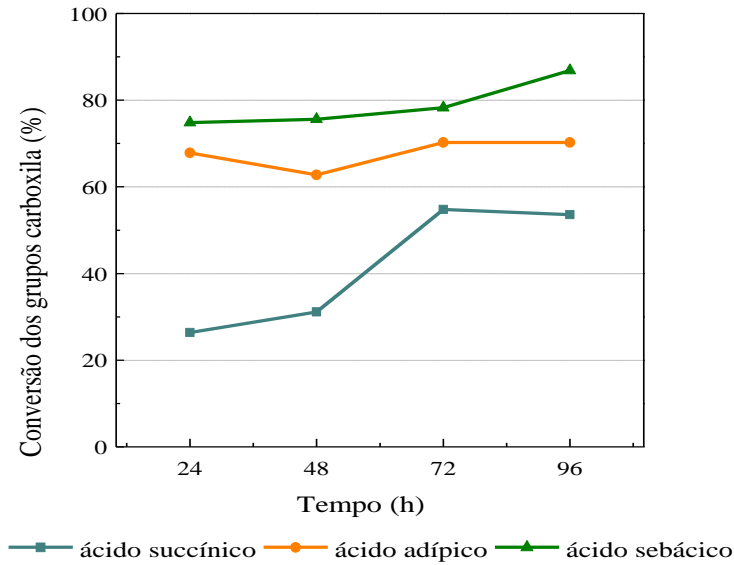
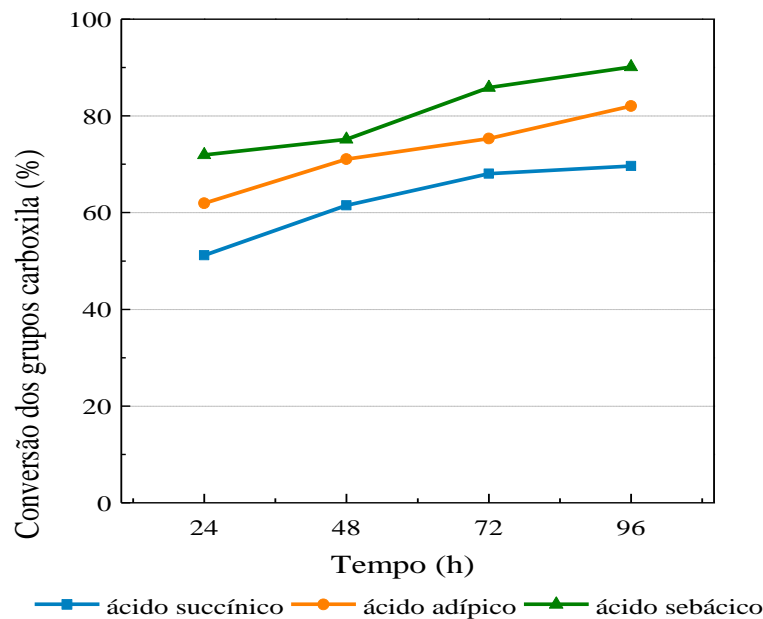


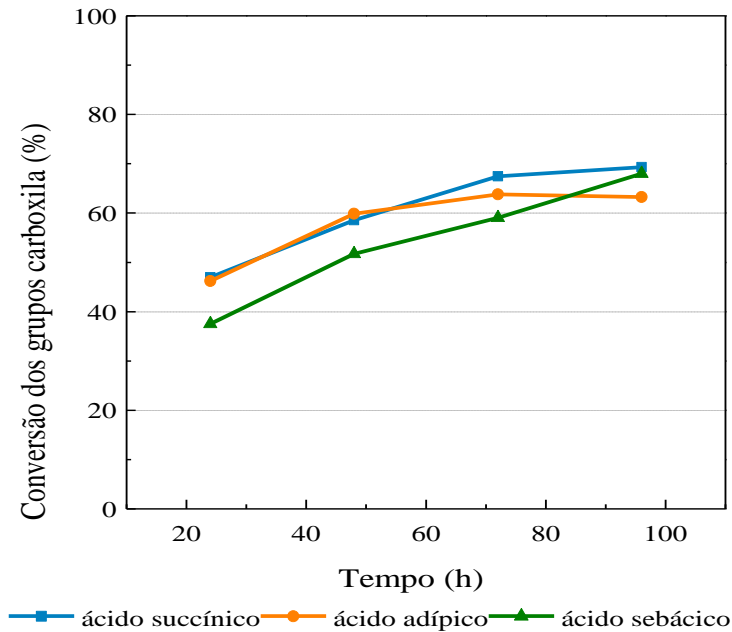
Figura 2. Influência do tempo na conversão dos grupos carboxila na reação de esterificação dos ácidos carboxílicos estudados e 1,4-butanodiol empregando 5% m/m de Novozym®435 a 90° C.



Azim *et al.* [1] estudaram os efeitos do solvente na síntese do poli(butil succinato) a 80° C sob vácuo (40 mmHg) por 72 h. Os valores de M_n (e M_w/M_n) obtidos nas reações em dodecano, diglima, éter difenílico e na ausência de solvente foram 2.500 (1,4), 4.400 (1,3), 10.000 (1,6) e 3.300 (1,2), respectivamente. Em geral, a etapa de crescimento da polimerização por condensação se processa aleatoriamente e a dispersidade ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$) dos polímeros resultantes apresenta valores maiores ou iguais a 2. A menor dispersidade ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$) dos poliésteres formados nas reações catalisadas pela N.435 sugere que o crescimento da cadeia ocorre de forma seletiva. A lipase reage a diferentes

taxas, em função do comprimento da cadeia do substrato, resultando em produtos que são mais uniformes em tamanho [22]. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, pode-se também observar uma diminuição nos valores de dispersidade (\overline{M}_w) com o aumento da cadeia de carbono dos ácidos carboxílicos.

Figura 3. Conversão dos grupos carboxila na reação de esterificação dos ácidos carboxílicos estudados e 1,4-butanodiol sem o biocatalisador (teste em branco) a 90° C.



A temperatura afeta a reação de diversas maneiras. Embora a lipase possa ser desnaturada a temperaturas mais elevadas, a viscosidade do meio reacional diminui e as taxas de difusão dos substratos para os sítios ativos da enzima crescem com o aumento da temperatura [10]. Os efeitos da temperatura na reação de polimerização do ácido sebácico são apresentados na Tabela 2. Pode-se observar que a temperatura influenciou os valores de massa molar médio e a dispersidade (\overline{M}_w). Apesar dos valores de conversão dos grupos carboxílicos serem similares para as duas temperaturas testadas, a análise de GPC mostra que a temperatura mais alta produziu poli(butil sebacato) com valores de M_n mais elevados.

Tabela 1. Massas molares médias numérica (M_n) e ponderal (M_w) dos oligômeros obtidos após 96 h a 90° C.

Ácido dicarboxílico		Ácido succínico	Ácido adípico	Ácido sebácico
M_n (g mol ⁻¹)	N435	1.180	1.500	3.786
	Branco	730	440	350
M_w (g mol ⁻¹)	N435	2.300	2.570	5.480
	Branco	1400	600	450
ĐM	N435	2,17	1,59	1,45
	Branco	1,93	1,37	1,30

ĐM: dispersidade (M_w/M_n)

Os resultados que mostram a influência da concentração da enzima no consumo dos grupos carboxílicos nas reações de policondensação entre ácidos dicarboxílicos e 1,4-butanodiol estão apresentados nas Figuras 4-6. O aumento da concentração da enzima resultou no aumento do consumo dos grupamentos carboxila. Na reação do ácido sebácico e 1,4-butanodiol (Figura 6) com 15% m/m de N.435 foi observada apenas uma pequena variação do consumo de grupos carboxila devido, possivelmente, a limitações difusionais.

Tabela 2. Influência da temperatura nas massas molares médias numérica (M_n) e ponderal (M_w) após 96 h de reação.

Ácido dicarboxílico		Ácido sebácico
M_n (g mol ⁻¹)	80° C	3.300
	90° C	3.786
M_w (g mol ⁻¹)	80° C	5.200
	90° C	5.480
ĐM	80° C	1,58
	90° C	1,45

Figura 4. Influência da concentração de enzima (Novozym®435) na conversão dos grupos carboxila na reação de esterificação do ácido succínico e 1,4-butanodiol a 90° C.

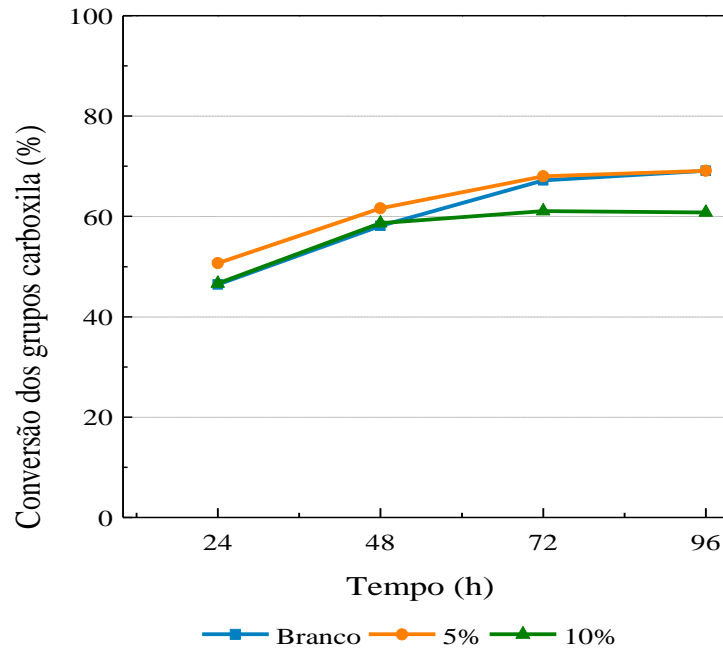


Figura 5. Influência da concentração de enzima na conversão dos grupos carboxila na reação de esterificação do ácido adípico e 1,4-butanodiol a 90° C.

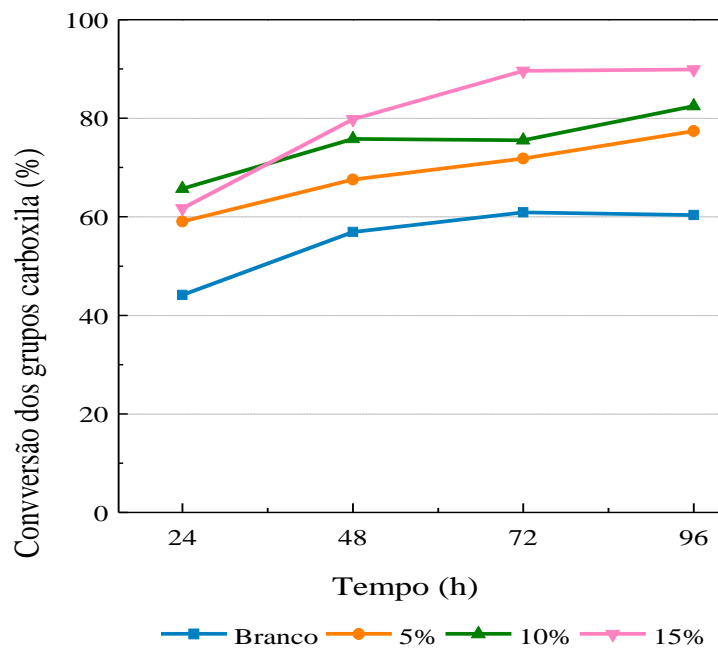
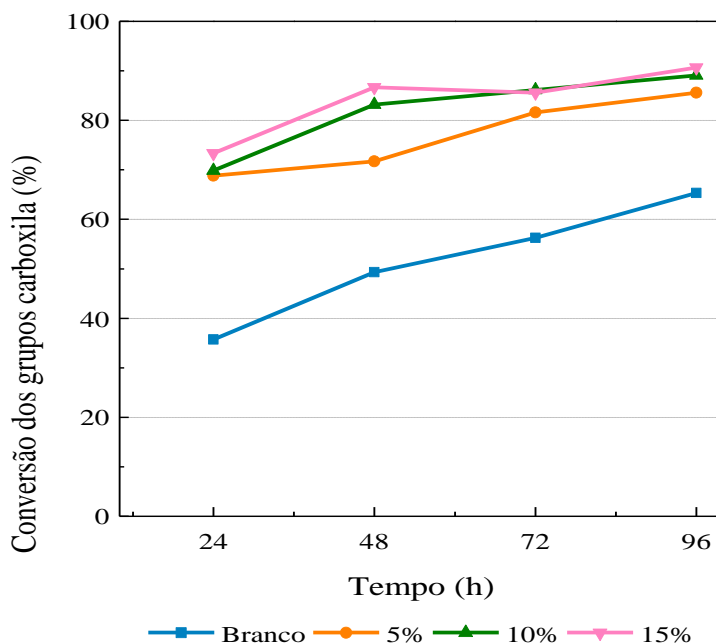


Figura 6. Influência da concentração de enzima na conversão dos grupos carboxila na reação de esterificação do ácido sebácico e 1,4-butanodiol a 90° C.



Os valores das massas molares dos produtos obtidos na esterificação do ácido sebácico com 1,4-butanodiol utilizando 5, 10 e 15% m/m de Novozym 435 estão apresentados na Tabela 3. É possível observar que o aumento da concentração da enzima proporcionou o aumento da massa molar do oligômero sintetizado. A massa molar ponderal média (M_w) da amostra aumentou de 5.480 para 8.307 g mol^{-1} quando a concentração da enzima aumentou de 5 para 15% m/m. Mahapatro *et al.* [22] também observaram que a diminuição da concentração da enzima resultou em produtos com massas molares mais baixas. Linko *et al.* [9] estudaram a poliesterificação do ácido sebácico com 1,4-butanodiol na presença de éter difenílico a 37° C usando lipase de *Mucor miehei* (36,5% m/m) sob vácuo e obtiveram poli(butil sebacato) com massa molar ponderal média de 42.050 g mol^{-1} após 7 dias de reação.

Tabela 3. Influência da concentração de enzima (5, 10 e 15 % de Novozym®435) nas massas molares médias numérica (M_n) e ponderal (M_w) dos oligômeros obtidos após 96 h de reação do ácido sebácico e 1,4-butanodiol, 90° C.

Concentração da enzima (%m/m)	M_n (g mol^{-1})	M_w (g mol^{-1})	ĐM
5	3786	5480	1,45
10	4343	6144	1,42
15	4916	8307	1,69

4 CONCLUSÕES

A policondensação por esterificação entre os ácidos sebácico, adípico e succínico com 1,4-butanodiol foi catalisada pela enzima Novozym®435 gerando produtos com massa molares de até 8.307 g mol^{-1} . O aumento da temperatura e da concentração da enzima resultou no aumento do consumo de grupos carboxila e da massa molar do produto obtido. Maiores massas molares foram obtidas nas reações com os ácidos dicarboxílicos de maior tamanho de cadeia. Poliésteres com massas molares significativas foram obtidos a 90° C usando lipase comercial imobilizada em um processo simples e ambientalmente amigável.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Cenpes/ Petrobras pelo suporte financeiro, a UERJ e ao IFRJ.

REFERÊNCIAS

- [1] H. Azim, A. Dekhterman, Z. Jiang, R. A. Gross, *Biomacromolecules* 7 (2006) 3093.
- [2] S.S. Umare, A.S. Chandure, R.A. Pandey, *Polymer Degradation and Stability* 92 (2007) 464.
- [3] H. Uyama, S.Kobayashi, *Adv. Polym Sci* 194 (2006) 133.
- [4] P. Bordes, E. Pollet, *Progress in Polymer Science* 34 (2009) 125.
- [5] U. Edlung; A. Albertsson, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55 (2003) 585.
- [6] R. Gross, M. Ganesh, W. Lu, *Trends in Biotechnology* 28 (2010) 435.
- [7] Y. Yu, D. Wu, C. Liu, Z. Zhao, Y. Yang, Q. Li, *Process Biochemistry* 47 (2012) 1027.
- [8] Y. Yang; Y. Yu; Y. Zhang; C. Liu; W. Shi; Q. Li, *Process Biochemistry* 46 (2011) 1900.
- [9] Y. Linko, Z. Wang, J. Seppala, *Journal of Biotechnology* 40 (1995) 133.
- [10] G. Li, D. Yao, M. Zong, *European Polymer Journal* 44 (2008) 1123.
- [11] W. Liu, B. Chen, F. Wang, T. Tan, L. Deng, *Process Biochemistry* 46 (2011) 1993.
- [12] S. Kobayashi; A. Makino, *Chem. Rev.* 109 (2009) 5288.
- [13] S. Kobayashi, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 86 (2010) 338.
- [14] M. Veld; A. Palmans, *Adv. Polym. Sci.* 237 (2010) 55.
- [15] S. Kobayashi, *Macromolecular Rapid Communications* 30 (2009) 237.
- [16] M. B. A. Rahman, N. Chaibakhsh, M. Basri, *Biotechnology Research International*, 2011.
- [17] S. Kobayashi, *Macromol. Rapid Commun.* 30 (2009) 237.
- [18] F. Binns, P. Harffey, S. Roberts, A. Taylor, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 3 (1998) 2069.
- [19] A. Mahapatro, B. Karla, A. Kumar, R. Gross, *Biomacromolecules* 4 (2003) 544.
- [20] C. G. Ribeiro, G. C. Santos, J. C. S. B. Ferreira, J. Hammoud, K. P. Mathias, A. A. Morandim-Gianetti, J. G. R. Poço, *Brazilian Journal of Development* 6 (1) (2020) 4457.
- [21] M.S. Souza, E.C.G. Aguiéiras, M.A.P. Silva, M.A.P. Langone, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 154 (1) (2009) 253.
- [22] A. Mahapatro, A. Kumar, B. Kalra, R. Gross., *Macromolecules* 37 (2004) 35.

[23] C. Delhomme, S. L.M. Goh, F. E. Kühn, D. Weuster-Botz, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 80 (2012) 39.