

Área: Engenharia de Alimentos

ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO CATALISADA POR EXTRATOS LIPOLÍTICOS MICROBIANOS

Lenir I. R. Ferraz*, **Géssica Possebom***, **Daniela dos Santos de Oliveira****, **Nádia Ligianara D. Nyari***, **Aline M. Moreira***, **Ilizandra A. Fernandes***, **Natália Paroul***, **Débora de Oliveira***** e **Helen Treichel******

*Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões- Erechim, RS.

**Instituto de Desenvolvimento do Alto Uruguai-IDEAU.

***Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Alimentos.

**** Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Erechim.

*E-mail: lenir.r.ferraz@ibest.com.br

RESUMO – Os extratos enzimáticos de *Penicillium crustosum* e de *Sporidiobolus pararoseus* produzidos no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos-URI-Campus Erechim, foram testados quanto à capacidade de catalisar a síntese de ésteres de ácidos graxos em sistema isento de solvente orgânico. A natureza e formas de apresentação da enzima afetaram as taxas de conversão obtidas. Os melhores resultados foram obtidos quando utilizado como catalisador os extratos provenientes do fungo *Penicillium crustosum* na esterificação de ácido oleico e etanol, 64,48% e 56,44% com os extratos imobilizado e livre, respectivamente. Os concentrados lipolíticos do mesmo micro-organismo apresentaram também 38,89% e 37,09% de conversão quando catalisaram a síntese de geranyl propionato, com os extratos livre e imobilizado, respectivamente.

1 INTRODUÇÃO

As lipases podem ser de origem animal, microbiana e vegetal. A principal função biológica da lipase (triacilglicerol acil hidrolases, E.C.3.1.1.3) é catalisar a hidrólise de longas cadeias de triacilglicerídeos. Ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases demonstram níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, o que facilita a catálise de muitas reações, tais como esterificação (FERRAZ *et al.*, 2012 e TREICHEL *et al.*, 2010).

O potencial de aplicações industriais dessas enzimas abrange as indústrias de alimentos (aditivos para modificação de aromas), a química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de

efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêutica e a área médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos) (KAPOOR *et al.*, 2012).

Ésteres de ácidos carboxílicos são componentes importantes de aditivos e aromas naturais usados na indústria alimentícia que contribuem na formação e acentuação dos aromas em alimentos.

Dentre os ésteres de ácidos graxos, os de baixo peso molecular representam uma importante classe de aromas. Muitos deles são responsáveis por odores de frutas e fragrâncias dos alimentos que são constituídos principalmente por ácidos e seus derivados de cadeia curta como acetatos, propionatos e butiratos. São conhecidos muitos ésteres com o preço final muito alto devido ao grau de pureza e estereoespecificidade requeridos. Quando estes ésteres são produzidos por síntese química, não são considerados naturais, sendo menos valorizados no mercado que ésteres obtidos de fontes naturais. Contudo, quando produzidos por via biotecnológica, estes podem ser considerados naturais.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a aplicação dos concentrados lipolíticos imobilizados, obtidos a partir do fungo filamentoso *Penicillium crustosum* e da levedura *Sporidiobolus pararoseus* nas reações de esterificação enzimática em sistema livre de solvente orgânico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As fontes de lipases utilizadas nos testes foram os respectivos micro-organismos: fungo filamentoso *Penicillium crustosum* e a levedura *Sporidiobolus pararoseus*. As lipases foram produzidas no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos-URI-Campus Erechim, por fermentação em estado sólido, utilizando farelo de soja como substrato e seguiram procedimento padrão descrito por VARGAS *et al.*, (2008) e FERRAZ *et al.*, (2012) para o fungo filamentoso e a levedura, respectivamente. Assim também ocorreu para o preparo das enzimas, quanto ao processo de imobilização em alginato de sódio com carvão ativado.

Imobilização dos extratos lipolíticos:

Para a imobilização em alginato de sódio e carvão ativado, adicionou-se em 16,5 g de água destilada, 0,75 g de alginato de sódio, 12,5g de sacarose, 3 mL de solução enzimática, 5 mL de glutaraldeído e 0,75 g de carvão ativado, após 24 horas em geladeira, as esferas foram lavadas com água destilada e tampão acetato 0,1 M pH 4,8 para medida de atividade.

Dosagem da atividade de esterificação:

A atividade de esterificação foi determinada através da reação de síntese do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1). Alíquotas de 500µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionando a cada alíquota 15mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v). A quantidade de ácido consumido foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05M até pH 11.

Esterificação enzimática:

Esta etapa foi realizada preparando-se três misturas reacionáís formadas por: geraniol e ácido propiônico e etanol e ácido oleico (sem solvente, em ambos os casos). Razão molar foi mantida 3:1 com excesso de álcool em todas as reações. Após dissolução completa dos substratos, os concentrados lipolíticos livres e imobilizados (10% p/p) foram adicionados. As reações foram conduzidas em *shaker* com agitação constante de 150 rpm e temperatura de 40°C.

Conversão das Reações:

A quantificação dos ésteres foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar modelo RT-WAX de 30m de comprimento, diâmetro interno de 0,25mm e com a seguinte programação: temperatura inicial da coluna de 40°C (8 min.), 40-220 °C (7°C/min), 220- 250°C (10°C/min), 250°C (10 min.), temperatura do injetor 250 °C, detector a 275 °C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste H₂(56 kPa). As amostras foram diluídas em n-hexano (1:10). A conversão das reações foi determinada acompanhando a redução da área do pico do agente limitante.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado, na tabela 1, os extratos enzimáticos livre e imobilizado provenientes do fungo filamentososo *Penicillium crustosum* apresentaram melhores taxas de conversão em todas as reações de esterificação. Maior rendimento foi obtido para reação de produção de etil oleato (64,48%), apesar de o extrato livre mostrar a maior atividade de síntese (290,63U/g). Este fato demonstra que o processo de imobilização, apresentou-se favorável a produção de ésteres, provavelmente devido a uma boa interação da enzima com o suporte utilizado. Para a produção de geraniol propionato conversões semelhantes (38,89% e 37,09%) foram encontradas para enzima livre e imobilizada.

Tabela 1 – Aplicação dos extratos enzimáticos obtidos de *Penicillium crustosum* e *Sporidiobolus pararoseus*, livre e imobilizado, como catalisador em diferentes reações de esterificação.

		Atividade síntese (U/g)	Conversão (%)	
			Geraniol propionato	Etil oleato
<i>Penicillium c.</i>	Extrato enzimático livre	240,59	38,89	56,44
	Extrato enz. imobilizado	202,67	37,09	64,48
<i>Sporidiobolus p.</i>	Extrato enzimático livre	290,63	0	27,24
	Extrato enz. imobilizado	209,46	0	42,31

Alguns estudos apresentados na literatura relatam a esterificação enzimática em sistema livre de solvente com diferentes ácidos graxos e álcoois. CHANG *et al.* (2006) investigaram a produção de hexil laurato utilizando a enzima Lipozyme IM 77 em sistema livre de solvente. As condições ótimas de síntese foram de 40 minutos, 58°C, concentração da enzima de 25,4 mg/volume e um pH de 5,9, com 69,7% de conversão. Em um dos estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa foi investigada a produção de geranyl propionato usando a lipase comercial imobilizada Novozym 435 como biocatalizador. Conversão acima de 90% foi obtida nas condições experimentais otimizadas: razão molar 3:1 (geraniol : ácido propiônico), 10% de enzima, temperatura 40°C e tempo de reação 4 horas (PAROUL *et al.*, 2010).

Em estudo realizado por ZENEVICZ (2011) conversões de 23,1 e 32,8% em etil oleato, foram obtidas para a esterificação enzimática em GLP pressurizado com enzima microbiana de *P. brevicompactum*⁷. Esse mesmo autor observou conversões variando entre 26,1 e 28,7% com extratos enzimáticos de *Rhizopus* sp., nas suas diferentes formas de obtenção em mesmas condições.

4 CONCLUSÃO

Esses resultados podem ser considerados satisfatórios, levando em consideração que os custos para a produção, bem como a imobilização das lipases microbianas são muito baixos, o que impulsiona o interesse por essas enzimas na aplicação de produtos de alto valor agregado, considerando ainda as diversas vantagens da imobilização de enzimas. De um modo geral o fungo filamentososo *Penicillium crustosum*, apresentou maior estabilidade e melhores resultados frente às reações de esterificação.

5 REFERÊNCIAS

- FERRAZ, L.R.; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M.F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.. **Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, p. 243–252, 2012.
- CHANG, S-W.; SHAW, J-F.; SHIEH, C-H.; SHIEH, C-J.. **O ptimal formation of hexyl laurate by Lipozyme IM-77 in solvent-free system.** *J. Agr. Food Chem.*, v. 54, p. 7125 – 7129, 2006.
- KAPOOR, M., GUPTA, M. N. **Lipase promiscuity and its biochemical applications.** *Process Biochemistry*. 2012; 48:1-15.
- PAROUL, N.; GRAEGOZESKI, L.P.; CHIARADIA, V.; TRECHEL, H.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, D. **Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system.** *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 85, p. 1636-1641, 2010.
- TREICHEL, H.; LIVEIRA, O.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J V.. **A review on microbial lipases production.** *Food and Bioproc. Technol.*, v. 3, p.182-196, 2010.

VARGAS, G. D. L. P., TREICHEL, H. OLIVEIRA, D. BENETI, S. C. FREIRE, D. M. G., DI LUCCIO, M. **Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, p. 47–54, 2008.

ZENEVICZ, M. C. P.. **Avaliação da atividade enzimática de lipases e aplicações em reações de interesse utilizando GLP pressurizado.** 2011. Dissert. de mestrado em Eng. de Alimentos, Univ. Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.