

Área: Engenharia de Alimentos

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BUTIRATO DE GERANILA LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO

Alessandro R. Paulazzi*, **Carla R. Sbardelotto***, **Jamile Zeni***, **Natália Paroul***, **Nádia Ligianara D. Nyari***

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

**E-mail: alessandro.paulazzi@hotmail.com*

RESUMO – Atualmente as empresas e consumidores buscam compostos químicos aromáticos naturais e que causam menos impactos ambientais. No entanto, a qualidade e a oferta de sabores naturais ainda é limitada, portanto as vias biotecnológicas se tornam uma alternativa viável e inovadora para a produção de aromatizantes. O presente trabalho teve como objetivo otimizar a produção de aroma de cereja via esterificação enzimática livre de solvente orgânico, utilizando a lipase Cal B imobilizada em poliuretano. A quantificação foi realizada por cromatografia gasosa. Os melhores resultados obtidos foram nos maiores valores de temperatura (70°C), razão molar álcool:ácido (5:1) e concentração de enzima (10%), obtendo conversão de 94,12%.

Palavras-chave: Aroma de cereja, lipase, Cal B

1 INTRODUÇÃO

Aromas e aromatizantes são compostos extremamente importantes para as indústrias de alimentos, bebidas, química, cosmética e farmacêutica. Compostos de aromas são obtidos por síntese química ou extração. Os inconvenientes da síntese química são formação de compostos indesejáveis devido às más reações de seletividade, baixo rendimento, poluição, custos (Akacha *et al.*, 2014), a formação de misturas racêmicas indesejáveis e a resistência crescente do consumidor para produtos químicos adicionados aos alimentos, cosméticos e outros produtos domésticos. Isso tem direcionado empresas de aromas para produção de compostos aromáticos de origem biológicos, assim chamados bioaromas ou naturais (Aragão *et al.*, 2009). De acordo com o Código de Boas Práticas da *International Organization of the Flavor Industry* (IOFI, 2010), “aromas são produtos adicionados aos produtos alimentícios para conferir, modificar ou intensificar o sabor dos alimentos”. Os processos biotecnológicos oferecem diversas vantagens: alta eficiência catalítica, condições operacionais brandas, seletividade dos catalisadores naturais, vantagens ambientais evidentes, classificados como natural e menor consumo de energia (Romero *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2007, Aragão *et al.*, 2009; Akacha *et al.*, 2014). As lipases destacam-se entre as principais enzimas utilizadas em biocatálise, pois apresentam capacidade de

catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é limitado. Por outro lado, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente a temperatura, pH e solventes orgânicos e sua quimio-regio e enantiosseletividade (Krieger *et al.*, 2004; Kapoor *et al.*, 2012). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a otimização da produção de aroma de cereja via esterificação enzimática livre de solvente orgânico utilizando a lipase Cal B imobilizada em poliuretano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

A enzima utilizada nesta pesquisa foi a lipase Cal B imobilizada em poliuretano (*Candida antarctica*). Os substratos foram geraniol (97% de pureza) da VETEC e ácido butírico da VETEC.

2.1 Métodos

Otimização da produção de aroma de cereja via esterificação enzimática

Os experimentos foram realizados de acordo com um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , com 17 ensaios (triplicata no ponto central), onde as variáveis estudadas foram temperatura (16,4 a 83,6 °C), concentração da enzima (0,025 a 13,06 % em peso) e razão molar de álcool:ácido (0,36:1 a 6,36:1), conforme Tabela 1. Os ensaios foram realizados conforme descrito por Paroul *et al.* (2010), realizados em shaker com agitação constante de 150 rpm em 2 horas de reação (testes preliminares). A quantificação do butirato de geraniol foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados.

Análise Estatística

O software Statistica® 8.0 (Statsoft Inc.,EUA) foi utilizado para auxiliar na elaboração e análise estatística dos dados experimentais, adotando-se em todos os casos estudados um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A otimização da produção de aroma de cereja via esterificação enzimática livre de solvente orgânico utilizando a lipase Cal B imobilizada em poliuretano (*Candida antarctica*), foi realizada através de um DCCR 2^3 . O ensaio que apresentou maior porcentagem de conversão (94,12 %) foi o ensaio 8 (Tabela 1), com temperatura de 70 °C, razão molar (álcool/ácido) de 5:1 e concentração de enzima de 10 %. Para resposta em

termos de conversão de ésteres de butirato de geranila (%) apresentaram efeito significativo positivo às variáveis concentração de enzima e temperatura, e a interação entre razão molar e concentração de enzima e efeito significativo negativo a interação entre as demais variáveis temperatura (°C) e razão molar dos substratos (m/v) e temperatura (°C) e concentração de enzima (%), segundo o diagrama de Pareto em função das variáveis estudadas (Figura 1).

Tabela 1. Matriz do DCCR completo 2^3 (valores codificados reais) em função das variáveis estudadas para a síntese de butirato de geranila.

Ensaio	Temp (°C)	RM (álcool/ácido)	[E] %	Conversão (%)
1	-1 (30)	-1 (1:1)	-1 (1)	64,05
2	1 (70)	-1 (1:1)	-1 (1)	83,32
3	-1 (30)	1 (5:1)	-1 (1)	53,45
4	1 (70)	1 (5:1)	-1 (1)	74,54
5	-1 (30)	-1 (1:1)	1 (10)	26,64
6	1 (70)	-1 (1:1)	1 (10)	43,6
7	-1 (30)	1 (5:1)	1 (10)	85,24
8	1 (70)	1 (5:1)	1 (10)	94,12
9	-1,68 (16,4)	0 (3:1)	0 (5,0)	53,96
10	1,68 (83,6)	0 (3:1)	0 (5,0)	87,34
11	0 (50)	-1,68 (0,36:1)	0 (5,0)	54,5
12	0 (50)	1,68 (6,36:1)	0 (5,0)	84,25
13	0 (50)	0 (3:1)	-1,68 (0,025)	26,07
14	0 (50)	0 (3:1)	1,68 (13,06)	86,82
15	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,0)	73,57
16	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,0)	73,84
17	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,0)	84,03
18*	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,0)	84,59
19*	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,0)	77,17
20*	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,0)	83,86

* Sem adição de 2% de peneiras moleculares, temperatura (°C) X_1 , razão molar dos substratos (m/v) X_2 e concentração de enzima (%) X_3 .

Podemos observar através dos resultados obtidos que a adição de peneiras moleculares não teve efeito benéfico, ou seja, não houve um aumento significativo na conversão de butirato de geranila, isso pode ser devido ao com excesso de álcool, provocando a desativação da enzima e não ao excesso de água produzida no meio. Kanwar et al. (2008) utilizaram peneira molecular na síntese de butirato de geranila catalisada pela lipase de *Pseudomonas aeruginosa* e verificaram que 1 % de peneira molecular aumentou a conversão em éster em apenas

2 % após 15 horas de reação. Os autores também verificaram que com quantidades superiores ou inferiores a esta, o rendimento da reação era reduzido. Segundo Adnani et al. (2010), o efeito negativo na conversão por adição de peneira molecular em reações de esterificação pode estar relacionado à retirada da água imprescindível para a atividade enzimática.

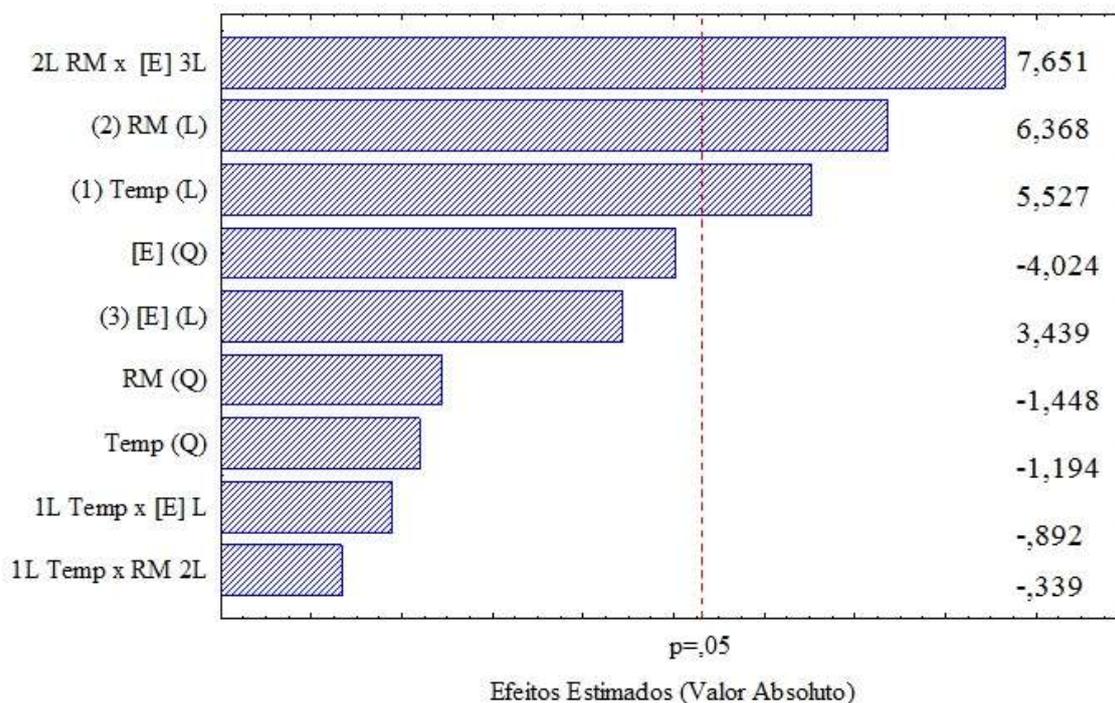


Figura 1. Diagrama de Pareto utilizando lipase CalB imobilizada em Poliuretano em função das variáveis analisadas, temperatura (°C) X_1 , razão molar dos substratos (RM) (m/v) X_2 e concentração de enzima (E) (%) X_3 para a síntese de butirato de geranila.

No entanto, em publicação anterior, Kanwar et al. (2008) verificaram o efeito da peneira molecular na síntese de propionato de etila pela mesma lipase e verificaram que, com adição de 300 mg, o rendimento da reação aumentou em 35% em relação à reação sem a peneira molecular. Outros autores também demonstraram as vantagens da adição da peneira molecular em reações de esterificação (Adnani et al., 2010; Jia et al., 2010; Laosiripojana et al., 2010). Podemos observar que a redução da conversão esta diretamente proporcional à redução da quantidade da enzima e da temperatura. Alguns trabalhos relatam que temperaturas maiores proporcionaram maior conversão em éster, como é o caso de Liu et al. (2010), que, estudando a síntese do laurato de laurila, obtiveram 45 °C, e Varma e Madras (2010), que relataram a faixa de 50-55 °C para a síntese do propionato de isopropila. Yadav e Dhoot (2009) utilizando lipase *Candida antarctica* imobilizada em resina

Acrílica para a produção de laurato de cinamila, com adição de tolueno, submetida a uma temperatura de 30 °C, 2 horas de reação apresentaram 60 % de conversão.

4 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho, que envolveu a produção de ésteres de butirato de geranila, sem adição de solventes, utilizando a lipase Cal B imobilizada em poliuretano (*Candida antarctica*), obtendo resultados muito satisfatórios, com de conversão de 94,12 % (utilizando temperatura de 70 °C, razão molar (álcool/ácido) de 5:1 e concentração de enzima de 10 %). Podendo-se concluir que há utilização da lipase CalB imobilizada em poliuretano, possui grande potencialidade na produção de ésteres de aroma. Estudos estão sendo realizados, no sentido de explorar o universo de atuação dessas lipases na síntese de ésteres de aroma. Os dados obtidos indicam a necessidade de continuidade deste trabalho no sentido de investigar-se a otimização dos parâmetros de reação, bem como a busca do aprimoramento da metodologia de análise dos ésteres de butirato de geranila.

5 AGRADECIMENTOS

A URI – Campus Erechim; Capes

6 REFERÊNCIAS

- ADNANI, A., BASRI, M., MALEK, E. A., SALLEH, A. B., RAHMAN, M. B. A., CHAIBAKHSHA, N., RAHMANB, R. N. Z. R. A. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of xylitol ester by Taguchi robust design method. **Industrial Crops and Products**. v. 31, p. 350, 2010.
- AKACHA, N. B. e GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**. 2014.
- ARAGÃO, V. C., ANSCHAU, A., PORCIUNCULA, B. D. A., THIESEN, C., KALIL, S. J., BURKERT, C. A. V., BURKERT, J. F. D. M. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**. v. 32, p. 2268, 2009.
- EMBALAGENS. Associação Brasileira de Leite Longa Vida (ABLV). Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/Index.cfm?fusiacion=embalagem>>. Acesso em: 9 nov. 2006.
- IOFI. Code of Practice. V1. 2, aprovada pelo Conselho Diretor em 21 de Junho de 2010. Disponível em <<http://www.iofi.org/Home/Teaser-Code-of-Practice/IOFI-Code-of-Practice/page.aspx/103>> Acesso em: 22/04/2015.

- JIA, C., ZHAO, J., FENG, B., ZHANG, X., XIA, W. A simple approach for the selective enzymatic synthesis of dilauroyl maltose in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 62, p. 265, 2010.
- KANWAR, S. S.; GEHLOT, S.; VERMA, M. L.; GUPTA, R.; KUMAR, Y.; CHAUHAN, G. S. Synthesis of geranyl butyrate with the poly(acrylic acid-co-hydroxy propyl methacrylate-cl-ethylene glycol dimethacrylate) hydrogel immobilized lipase of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-4713. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 110, p. 2681, 2008.
- KAPOOR, M., GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**. v. 48, p. 1, 2012.
- KRIEGER, N., BHATNAGAR, T., BARATTI, J.C., BARON, A.M., LIMA, V.M.G., MITCHELL, D. Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. **Food Technology and Biotechnology**. v. 42, p. 279, 2004.
- LAOSIRIPOJANA, N., KIATKITTIPONG, W., SUTTHISRIPOK, W., ASSABUMRUNGRAT, S. Synthesis of methyl esters from relevant palm products in near-critical methanol with modified-zirconia catalysts. **Bioresource Technology**. v.101, p. 8416, 2010.
- LIU, Y., ZHANG, X., TANC, H., YAN, Y., HAMEED, B. H. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. **Process Biochemistry**. v.45, p. 1176, 2010.
- PAROUL, N., GRZEGOZESKI, P. L., CHIARADIA, V., TREICHEL, H., CANSIAN, R. L., OLIVEIRA, J. V., OLIVEIRA, D. Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solventfree system. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**. v. 85, p. 1636, 2010.
- ROMERO, M. D., CALVO, L., ALBA, C., DANESHFAR, A.. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal of Biotechnology**. v. 127, p. 269, 2007.
- VARMA, M. N., MADRAS, G. Effect of chain length of alcohol on the lipase-catalyzed esterification of propionic acid in supercritical carbon dioxide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.160, p.2342, 2010.
- YADAV, G. D.; DHOOT, S. B. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 57, p. 34, 2009.
- ZHANG, D.-H.; BAI, S.; SUN, Y., Lipase-catalyzed regioselective synthesis of monoester of pyridoxine (vitamin B6) in acetonitrile, **Food Chemistry**. v. 102, p. 1012, 2007.