

## **Estudo do reaproveitamento da lipase imobilizada em alginato na síntese de ésteres aromáticos**

**Giovana S. Padilha<sup>1</sup>, Márcio de Barros<sup>2</sup> e Ranulfo M. Alegre<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP – Departamento de Engenharia de Alimentos  
Caixa Postal 6121 – CEP 13083-862 Campinas – SP – E-mail: giovana\_padilha@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia Caixa Postal 10011 –  
86057-970 Londrina – PR

### **RESUMO**

*O estudo de estabilidade no rendimento do valerato de etila, acetato de isoamila e acetato de hexila mostrou possibilidade do reaproveitamento da lipase imobilizada de Burkholderia cepacia em alginato de cálcio nos ciclos de reação. Para o valerato de etila, a maior atividade da enzima, assim como maior rendimento do éster foi obtido no 3º ciclo enquanto que para o acetato de isoamila e acetato de hexila, maiores atividades e rendimentos foram no 2º ciclo. Análises de cromatografia gasosa (CG-FID) confirmaram a presença do valerato de etila, acetato de isoamila e acetato de hexila nas melhores condições reacionais.*

**Palavras-chave:** lipase, *Burkholderia cepacia*, imobilização, alginato, reutilização, ésteres.

### **INTRODUÇÃO**

Ésteres aromáticos são formados por álcoois de cadeia curta e ácido carboxílicos. Muito desses ésteres são obtidos usando catalisadores inorgânicos em elevadas temperaturas (200 a 250 °C). Gradativamente as enzimas estão substituindo os catalisadores inorgânicos, visto que essas apresentam como benefícios condições amenas de operação, especificidade e poucas perdas na reação (LIU et al., 2010; MARTINS et al., 2014). O interesse em se obter ésteres naturais, impulsionou a indústria de aromatizantes a procurar por rotas alternativas. Na última década a biotecnologia vem sendo considerada para a produção de ésteres, uma vez que o aroma obtido pode ser considerado como “natural” (ROMERO et al., 2007; CABRAL et al., 2009). A importância econômica do processo, assim como a diminuição dos impactos ambientais são fatores que devem ser levados em consideração no processo de imobilização de enzimas. O objetivo principal do estudo foi recuperar a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em alginato dos meios reacionais e reutilizar em novos meios reacionais com considerável rendimento dos ésteres aromáticos.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Materiais**

O biocatalisador foi a lipase de *Burkholderia cepacia* (Sigma Aldrich) imobilizada em alginato conforme descrito por PADILHA e colaboradores (2014). Os reagentes usados foram o etanol (Synth), ácido valérico (Sigma Aldrich), álcool isoamílico (Sigma Aldrich), hexanol (Vetec), ácido acético (Sigma Aldrich) e *n*-heptano (Synth).

#### **Estudo da reutilização do biocatalisador**

A cada 24 h correspondente a 1 ciclo, a lipase foi retirada do meio reacional por filtração, lavada com água destilada e colocada para secar em estufa com circulação de ar a 30 °C por 3

h. Após esse período, uma parte da enzima imobilizada foi separada para análise de atividade e o restante foi reutilizado em novo meio reacional. Os passos descritos acima foram repetidos cinco vezes e a atividade enzimática foi determinada conforme metodologia descrita por MACEDO e colaboradores (1997).

O meio reacional foi separado para análise da porcentagem molar de esterificação pela concentração de ácido graxo determinado por titulação de alíquotas dissolvidas em 10 mL da mistura acetona/etanol (1:1), empregando-se solução de KOH 0,02M e fenolftaleína como indicador. A conversão do substrato em ésteres foi determinada de acordo com PADILHA e colaboradores (2013).

### **Cromatografia gasosa**

Análises de cromatografia gasosa CG-FID confirmaram os resultados de reutilização do biocatalisador. A separação e detecção dos compostos voláteis foram realizadas por CG-FID Cromacon (modelo Simple Crom). 1  $\mu$ L das amostras diluídas das misturas reacionais foram injetadas em coluna capilar DB-05 (J&W Scientific). As temperaturas do injetor e do detector foram de 200° C e 250° C, respectivamente. A programação da coluna foi 50° C por 10 min, 2° C/min até 75° C, 25° C/min até 200° C por 10 min. Os tempos de retenção ( $t_R$ ) para o valerato de etila, acetato de isoamila e acetato de hexila foram de 7,01, 7,16 e 15,21 min., respectivamente. A identificação e quantificação dos ésteres foram feitos por comparação com o tempo de retenção das amostras com o padrão. Para a curva padrão, concentrações dos respectivos ésteres de 0,05 a 0,3%, 0,05 a 0,25% e 0,05 a 0,45% diluído em *n*-heptano foram utilizados. Todos os reagentes foram da Sigma Aldrich (St. Louis – MO). Todas as amostras foram feitas em triplicata.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Tabela 1 mostra o estudo da estabilidade da lipase imobilizada para o valerato de etila. Os resultados mostram que no 1º ciclo, a atividade da lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia* foi mais baixa, assim como a porcentagem em éster. A análise de cromatografia mostrou concentração em valerato de etila de 0,23%. No entanto, a partir do 2º ciclo, a reutilização da lipase favoreceu o rendimento da reação, visto que a atividade enzimática aumentou 3 vezes em relação ao 1º ciclo, o rendimento em valerato de etila aumentou 5 vezes e a concentração teve aumento de 10 vezes. Os melhores resultados foram no 3º ciclo, onde a lipase atingiu atividade máxima de 250U/g com 94,7% em rendimento e 2,79% em concentração do valerato de etila. Após 120 h ou 5º ciclo, manteve-se 74% da atividade em relação à atividade máxima, o rendimento em éster foi 20% menor e a concentração diminuiu 1,70 vezes.

*Tabela 1– Rendimento do valerato de etila reutilizando lipase imobilizada em alginato de cálcio.*

<b>Ciclo (dias)</b>	<b>Atividade (U.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Éster (%)</b>	<b>Média dos Picos</b>	<b>Diluição</b>	<b>Concentração (%)</b>
1	50,0	15,9	23793,96	-	0,23
2	150,0	80,2	12454,61	20	2,31
3	250,0	94,7	14639,44	20	2,79
4	216,7	92,1	13753,37	20	2,59
5	183,3	74,0	9441,991	20	1,65

A Tabela 2 mostra o estudo para o acetato de isoamila. O comportamento do 1º ciclo foi bastante semelhante ao do valerato de etila, apresentando resultados com baixa atividade enzimática, rendimento e concentração do acetato de isoamila em relação aos demais dias do ciclo. Entretanto, o melhor rendimento (95,5%) ocorreu no 2º ciclo, com atividade de 316,7 U.g<sup>-1</sup> e concentração de 2,89%. A partir do 3º ciclo houve decréscimo na atividade enzimática, com diminuição de 11, 21 e 31% no 3º, 4º e 5º ciclo em relação ao 2º ciclo, respectivamente. Embora a atividade enzimática tenha decrescido com o reuso, o rendimento em acetato de isoamila não obedeceu à mesma proporção, apresentando queda maior apenas no último ciclo, assim como a concentração, que variou em torno de 20% entre o máximo (2,89%) e mínimo (2,22%).

*Tabela 2– Rendimento do acetato de isoamila reutilizando lipase imobilizada em alginato de cálcio.*

<b>Ciclo (dias)</b>	<b>Atividade (U.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Éster (%)</b>	<b>Média dos Picos</b>	<b>Diluição</b>	<b>Concentração (%)</b>
1	116,7	28,9	11287,43	2	0,26
2	316,7	95,5	12304,40	20	2,89
3	283,3	91,4	11967,33	20	2,81
4	250,0	91,2	11967,33	20	2,77
5	216,7	89,0	9520,48	20	2,22

A Tabela 3 mostra o estudo da estabilidade para o acetato de hexila. Os resultados permitiram observar que a atividade enzimática e concentração de éster tiveram maiores variações em relação à porcentagem de esterificação. Contudo, no 1º ciclo a enzima imobilizada apresentou comportamento similar ao rendimento do valerato de etila e a do acetato de isoamila.

*Tabela 3– Rendimento do acetato de hexila reutilizando lipase imobilizada em alginato de cálcio.*

<b>Ciclo (dias)</b>	<b>Atividade (U.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Éster (%)</b>	<b>Média dos Picos</b>	<b>Diluição</b>	<b>Concentração (%)</b>
1	33,3	30,7	9746,518	-	0,10
2	216,7	95,2	11493,449	20	2,33
3	150,0	93,0	9083,927	20	1,83
4	116,7	89,9	7454,292	20	1,50
5	116,7	88,8	7458,588	20	1,50

Com estas análises foi possível mostrar o reaproveitamento da lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia* em alginato nos ciclos de reação. Além disso, a interação lipase-alginato foi suficiente para impedir a passagem das enzimas para o meio reacional e permitiu passagem dos substratos e produtos, ou seja, as enzimas permaneceram imobilizadas e ficaram protegidas do solvente e do meio reacional ácido/álcool (Cantone et al., 2013), favorecendo assim as reações de esterificação. Bayramoğlu e colaboradores (2011) estudaram a estabilidade da lipase imobilizada de *Candida rugosa* por 5 ciclos a 25 °C em sistema livre de solvente e em *n*-hexano. No sistema livre de solvente, a lipase imobilizada manteve praticamente a mesma atividade após os 5 ciclos. Todavia, em *n*-hexano houve diminuição constante na síntese dos ésteres nos 5 ciclos de operação, onde a perda na atividade pode ser resultado do efeito de desnaturação

da enzima em meio solvente. Raghavendra e colaboradores (2010) estudaram a reutilização da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em organogel por 9 ciclos e observaram que a enzima manteve-se estável até o 3º ciclo e após este período, a atividade começou a declinar lentamente. A queda na atividade foi atribuída ao acúmulo do excesso de água formado como subproduto nas reações de esterificação.

### CONCLUSÕES

O estudo mostrou que foi possível recuperar a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em alginato dos meios reacionais e reutilizar em novos meios reacionais com considerável rendimento dos ésteres aromáticos.

**Agências de Fomento:** FAPESP.

### REFERÊNCIAS

- BAYRAMOĞLU, G., HAZER, B., ALTINTAŞ, G., ARICA, M. Y. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 372-378, 2011.
- CABRAL, P.P.; FONSECA, M.M.R.; DIAS, S.F. Synthesis of Ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 327-332, 2009.
- CANTONE, S., FERRARIO, V., CORICI, L., EBERT, C., FATTOR, D., SPIZZO, P., GARDOSI, L. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n.15, p.6262-6276, 2013.
- LIU, Y.; ZHANG, X.; TAN, 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. 1176-1180, 2010.
- MACEDO, G.A.; PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum sp.* **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**, v. 28, p. 90-95, 1997.
- MARTINS, A. B.; SILVA, A. M.; SCHEIN, M. F.; GARCIA-GALAN, C.; ZÁCHIA AYUB, M.A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 18-25, 2014.
- PADILHA, G. S.; BARROS, M.; TAMBOURGI, E. B.; ALEGRE, R. M. Production of Ethyl Valerate from *Burkholderia cepacia* lipase immobilized in alginate. **Chemical Transactions Engineering**, v. 32, 2013.
- PADILHA, G.S.; BARROS, M.; ALEGRE, R.M. Influencia da Água na Síntese Enzimática dos *flavors* valerato de etila, acetato de isoamila e acetato de hexila. **IV Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, ago. 2014, Londrina/PR.
- RAGHAVENDRA, T., SAYANIA, D., MADAMWAR, D. Synthesis of the 'green apple ester' ethyl valerate in organic solvents by *Candida rugosa* lipase immobilized in MBGs in organic solvents: Effects of immobilization and reaction parameters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, p. 31-38, 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. 269-277, 2007.