

# OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE VALERATO DE ETILA POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

K. C. A. GARCIA<sup>1</sup>, A. P. P. BRESSANI<sup>1</sup>, B. M. COSTA<sup>2</sup>, E. B. PEREIRA<sup>3</sup>, D. B. HIRATA<sup>4</sup> e A. A. MENDES<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São João del Rey, Laboratório de Biocatálise

<sup>2</sup> Universidade Federal de Alfenas, Laboratório de Bioprocessos

<sup>3</sup> Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências Farmacêuticas

<sup>4</sup> Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Química

E-mail para contato: breno.mcosta@outlook.com; adriano.mendes@unifal-mg.edu.br

**RESUMO** – No presente estudo, objetivou-se a otimização da produção de valerato de etila (aroma de maçã verde) por esterificação catalisada por lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em partículas de poli(hidróxi-butilato) (PHB). As reações foram conduzidas em frascos fechados por 5 min de reação, razão equimolar de ácido valérico:etanol (100 mM) em heptano. Inicialmente, foi proposto um delineamento experimental completo 2<sup>4</sup> para verificar a influência da concentração de biocatalisador, temperatura de reação, concentração de peneira molecular e agitação na conversão em éster. Máxima conversão ( $43,4 \pm 1,5\%$ ) foi alcançada nos níveis máximos de concentração de biocatalisador (12% m/m) e agitação (200 rpm) e níveis mínimos de temperatura (30°C) e de peneira molecular (ausência). Um novo delineamento experimental completo 2<sup>3</sup> foi proposto e máxima conversão ( $92,3 \pm 1,6\%$ ) foi alcançada a 32,7°C, 15% m/m de biocatalisador e agitação de 234 rpm em 5 min de reação.

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente procura por fragrâncias e aromas tem motivado a procura por rotas alternativas à extração destes compostos de produtos naturais, processos com baixa produtividade e alto custo. Na indústria química, as reações de síntese de compostos aromatizantes por esterificação de ácidos orgânicos e álcoois de cadeia curta são geralmente catalisadas por compostos químicos tóxicos e corrosivos como ácidos fortes (Bayramoglu *et al.*, 2011; Dhake *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2014). As desvantagens destes processos são longos tempos e altas temperaturas de reação e baixos rendimentos. A rota enzimática tem-se mostrado atrativa para a produção de aromas de frutas por se tratar de um processo com baixo consumo de energia e elevada produtividade (Mendes *et al.*, 2012; Dhake *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014). Do ponto de vista industrial, as reações de síntese de ésteres de aromas catalisadas por lipases, são aparentemente menos econômicas que as técnicas convencionais. Entretanto, considerando a possibilidade da obtenção de produtos específicos de grande interesse industrial, empregando estas enzimas na forma imobilizada, este tipo de processo pode tornar-se tecnicamente e economicamente viável (Bayramoglu *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2012; Dhake *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2014).

No presente estudo, lipase microbiana de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) foi imobilizada por adsorção física em partículas hidrofóbicas de poli(hidróxi-butilato) e aplicada como biocatalisador na síntese do éster valetato de etila (aroma de maçã verde) por esterificação direta em meio de heptano. Dois delineamentos experimentais completos “estrela rotacional” foram propostos para a otimização da produção do éster aromatizante.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Materiais**

Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) foi adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). LTL é uma solução enzimática com atividade hidrolítica de 220 UI/mL e concentração de proteína de 18 mg/mL. Partículas mesoporosas de poli(hidróxi-butilato) (PHB) (área superficial de 17 m<sup>2</sup>/g e diâmetro de poro de 3,1 nm) foram adquiridos da PHB Industrial (São Paulo/SP). Álcool etílico anidro (> 99,5% m/m) e ácido valérico foram adquiridos da Synth e Sigma-Aldrich, respectivamente. Todos os outros reagentes empregados foram de grau analítico adquiridos das empresas Vetec Química e Synth (São Paulo/SP).

### **2.2. Preparação de biocatalisadores**

A imobilização da lipase em PHB foi realizada em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (5 mM) por oferecendo carregamento de proteína de 40 mg/g de suporte (Miranda *et al.*, 2014). A suspensão suporte:solução enzimática (relação 1:20) foi mantida por 12 h a 25°C sob agitação em shaker (200 rpm). Ao final, o biocatalisador preparado foi filtrado e lavado com água destilada. O biocatalisador preparado exibiu atividade hidrolítica (hidrólise do azeite de oliva emulsificado) e concentração de proteína imobilizada de 1240 ± 30 UI/g e 24,7 ± 1,1 mg/g de suporte, respectivamente (Miranda *et al.*, 2014).

### **2.3. Síntese enzimática de valerato de etila por esterificação em meio orgânico**

A reação de esterificação do etanol anidro e ácido valérico foi conduzida em meio de heptano, empregando razão molar ácido valérico:álcool (100 mM) e 10 mL de meio de reação, de acordo com metodologia previamente descrita por Mendes *et al.* (2012). A porcentagem de conversão em éster foi estimada por determinação da concentração de ácido valérico residual por titulação com solução de NaOH (20 mM), utilizando fenolftaleína como indicador (Silva *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2014). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Reações controle foram também realizadas por incubação de partículas de PHB nas mesmas condições de ensaio. Sob estas condições, não foi observado consumo de ácido valérico após 2 h de incubação.

### **2.4. Otimização da produção do éster por delineamento experimental**

Inicialmente, foi proposto um delineamento experimental completo “estrela rotacional” 2<sup>4</sup> (28 ensaios) para melhor entendimento da influência individual das variáveis estudadas e de suas interações na reação de esterificação. Os parâmetros avaliados foram concentração de biocatalisador

(2–12% m/v), temperatura de reação (30–50 °C), concentração de peneira molecular (0–40% m/v) e velocidade de agitação (0–200 rpm). Após, foi realizado um segundo delineamento experimental completo “estrela rotacional”  $2^3$  (18 ensaios) para verificar a influência das variáveis: concentração de biocatalisador (10–20% m/v), temperatura de reação (20–35 °C) e velocidade de agitação (170–250 rpm). Como variável resposta foi considerada a porcentagem de conversão em éster, determinada como descrita acima (Miranda *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014). Os resultados obtidos foram analisados empregando o *software* Statística versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). A validação dos delineamentos propostos foi realizada nas melhores condições experimentais de acordo com a metodologia de análise de superfícies de resposta (Miranda *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foi proposto um planejamento fatorial completo “estrela rotacional”  $2^4$  (28 ensaios), com 16 ensaios fatoriais, quatro pontos centrais e oito pontos axiais, para verificar os parâmetros que influenciam a produção do éster valerato de etila (aroma de maçã verde) por esterificação direta em meio de heptano catalisada por lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em partículas hidrofóbicas de PHB. Na Tabela 1 estão sumarizadas as variáveis independentes e os níveis codificados e originais, bem como os valores experimentais de porcentagem de conversão. Os resultados mostrados na Tabela 1 indicam que a porcentagem de conversão em éster oscilou entre 14,0 (ensaio 15) e 44,0% (ensaios 10 e 14) após 5 min de reação. Estes valores mínimo e máximo de porcentagem de conversão correspondem aos ensaios realizados em baixa (4,5% m/v) e alta concentração de biocatalisador (entre 9,5 e 12% m/v), respectivamente. Além disso, os ensaios que exibiram elevada porcentagem de esterificação foram realizados por incubação entre 30–35°C.

Os resultados da Tabela 1 foram utilizados para estimar os efeitos principais variáveis e as suas interações. A análise estatística mostrou efeitos significativos para os termos lineares de concentração de biocatalisador ( $x_1$ ), temperatura de reação ( $x_2$ ) e velocidade de agitação ( $x_4$ ) e as interações entre concentração de biocatalisador e velocidade de agitação ( $x_1.x_4$ ), temperatura de reação e concentração de peneira molecular ( $x_2.x_3$ ) e temperatura de reação e velocidade de agitação ( $x_2.x_4$ ) a 95% de nível de confiança. Entretanto, os termos quadráticos não foram significativos a 95% de nível de confiança. Os coeficientes relativos aos efeitos não significativos foram excluídos do modelo. A equação 1 representa os dados experimentais obtidos na Tabela 1, cuja porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) foi de 91,88%.

$$\text{Conversão}(\%) = 27,88 + 6,42x_1 - 1,56x_2 + 1,66x_4 - 2,16x_1.x_4 + 1,79x_2.x_3 - 2,71x_2.x_4 \quad (1)$$

Em que:  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  e  $x_4$  representam os valores codificados para concentração de biocatalisador, temperatura de reação, concentração de peneira molecular e velocidade de agitação, respectivamente.

Tabela 1 – Primeiro delineamento experimental completo “estrela rotacional” proposto para a produção enzimática de valerato de etila (aroma de maçã verde) em meio orgânico

Ensaio	Varáveis codificadas (originais)				Resposta
	Biocatalisador (% m/v)	Temperatura (°C)	Peneira molecular (% m/v)	Agitação (rpm)	Conversão (%)
1	-1 (4,5)	-1 (35)	-1 (10)	-1 (50)	22,8 ± 2,4
2	+1 (9,5)	-1 (35)	-1 (10)	-1 (50)	26,2 ± 2,7
3	-1 (4,5)	+1 (45)	-1 (10)	-1 (50)	15,2 ± 0,3
4	+1 (9,5)	+1 (45)	-1 (10)	-1 (50)	29,2 ± 1,1
5	-1 (4,5)	-1 (35)	+1 (30)	-1 (50)	20,4 ± 2,7
6	+1 (9,5)	-1 (35)	+1 (30)	-1 (50)	27,1 ± 1,3
7	-1 (4,5)	+1 (45)	+1 (30)	-1 (50)	24,1 ± 1,3
8	+1 (9,5)	+1 (45)	+1 (30)	-1 (50)	34,8 ± 3,8
9	-1 (4,5)	-1 (35)	-1 (10)	+1 (150)	28,0 ± 2,8
10	+1 (9,5)	-1 (35)	-1 (10)	+1 (150)	44,5 ± 2,0
11	-1 (4,5)	+1 (45)	-1 (10)	+1 (150)	18,1 ± 2,6
12	+1 (9,5)	+1 (45)	-1 (10)	+1 (150)	29,8 ± 2,6
13	-1 (4,5)	-1 (35)	+1 (30)	+1 (150)	23,6 ± 3,5
14	+1 (9,5)	-1 (35)	+1 (30)	+1 (150)	40,4 ± 2,4
15	-1 (4,5)	+1 (45)	+1 (30)	+1 (150)	13,9 ± 1,8
16	+1 (9,5)	+1 (45)	+1 (30)	+1 (150)	38,2 ± 2,9
17	-2 (2)	0 (40)	0 (20)	0 (100)	18,7 ± 2,9
18	+2 (12)	0 (40)	0 (20)	0 (100)	43,7 ± 2,7
19	0 (7)	-2 (30)	0 (20)	0 (100)	32,3 ± 2,4
20	0 (7)	+2 (50)	0 (20)	0 (100)	28,4 ± 2,7
21	0 (7)	0 (40)	-2 (0)	0 (100)	29,1 ± 2,5
22	0 (7)	0 (40)	+2 (40)	0 (100)	25,2 ± 1,3
23	0 (7)	0 (40)	0 (20)	-2 (0)	26,6 ± 1,7
24	0 (7)	0 (40)	0 (20)	+2 (200)	28,2 ± 0,2
25	0 (7)	0 (40)	0 (20)	0 (100)	29,1 ± 2,1
26	0 (7)	0 (40)	0 (20)	0 (100)	27,1 ± 1,5
27	0 (7)	0 (40)	0 (20)	0 (100)	28,0 ± 1,9
28	0 (7)	0 (40)	0 (20)	0 (100)	28,2 ± 1,3

A superfície de resposta referente ao efeito das variáveis concentração de biocatalisador e temperatura de reação na conversão em éster é mostrada na Figura 1a. A conversão em éster aumentou com o aumento da concentração de biocatalisador, como esperado, e máxima conversão foi alcançada no nível máximo de concentração de biocatalisador (12% m/v). Entretanto, elevada conversão em éster foi obtida nos níveis mínimos de temperatura, no intervalo de temperatura entre 30 e 35 °C. Em temperaturas superiores a 35 °C foi observada uma redução na conversão em éster devido à inativação das moléculas de lipase em elevadas temperaturas (Silva *et al.*, 2014). A interação entre os dois parâmetros não foi significativa ao nível de 95% de confiança.

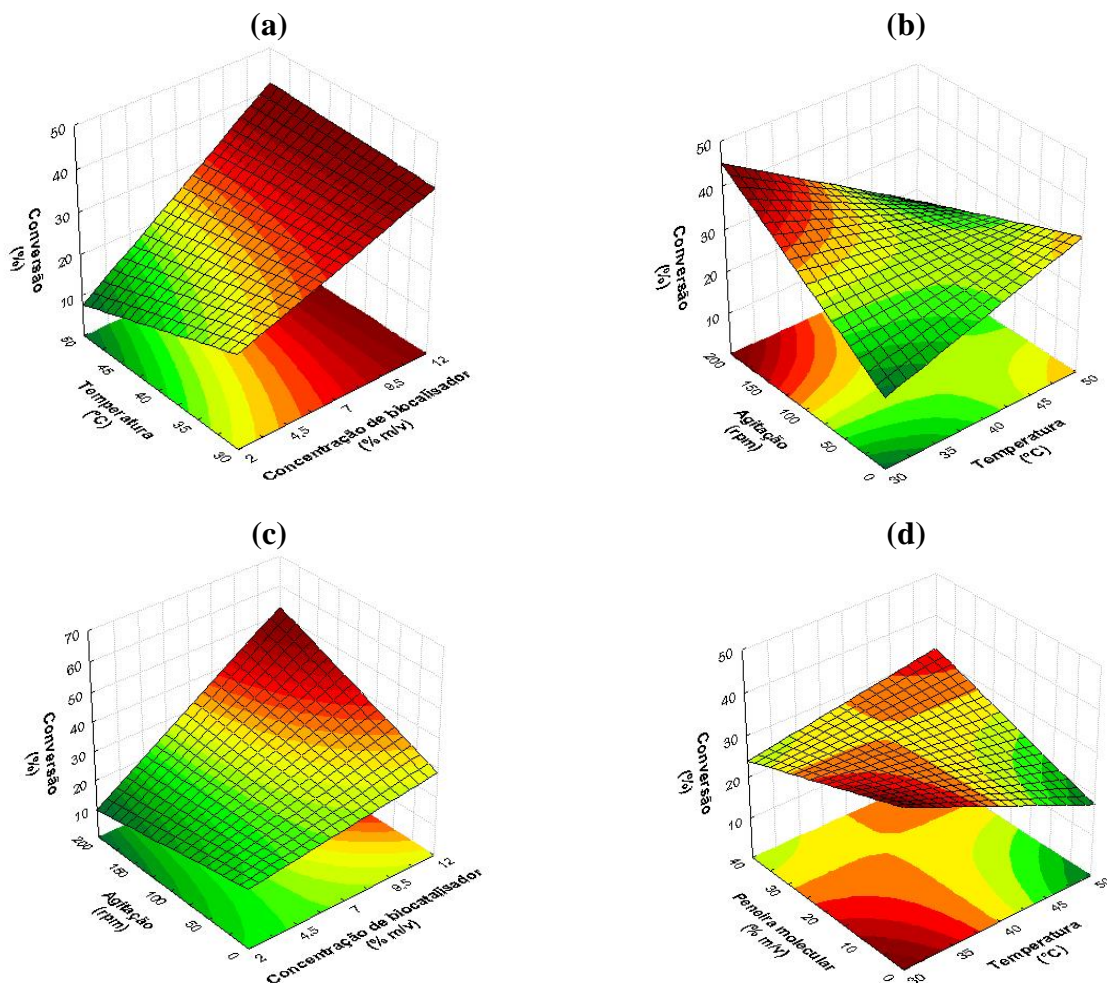


Figura 1 – Superfícies de resposta de acordo com o modelo predito para a produção de valerato de etila. Efeito da temperatura e concentração de biocatalisador (a); efeito da temperatura e agitação (b); e efeito da concentração de biocatalisador e agitação (c) e efeito da concentração de peneira molecular e temperatura na porcentagem de conversão em éster.

O efeito das variáveis agitação e temperatura na conversão em éster é mostrado na Figura 1b. De acordo com os resultados, as reações de esterificação realizadas no nível mínimo de temperatura (30 °C) requereu elevada agitação (200 rpm), nível máximo, no sistema para melhorar a acessibilidade de moléculas de substratos aos sítios ativos da enzima imobilizada. A interação entre estes parâmetros foi significativa ao nível de 95% de confiança. O efeito das variáveis agitação e concentração de biocatalisador é mostrado na Figura 1c. Máxima conversão em éster foi alcançada nos níveis máximos de agitação (200 rpm) e concentração de biocatalisador (12% m/v), como descrito acima. A interação entre estes parâmetros foi também significativa ao nível de 95% de confiança. Similar às Figuras 1a e 1b, máxima conversão em éster pode ser obtida no nível mínimo de temperatura, como mostrado na Figura 1d. Neste



estudo, é possível observar que a adição de peneiras moleculares com o intuito de remover as moléculas de água formadas na reação de esterificação reduziu a conversão em éster. No nível mínimo de concentração de peneira molecular foi observada máxima conversão em éster. Possivelmente, moléculas de água existentes no microambiente do biocatalisador poderiam estar sendo também removidas, na qual reduz a atividade do biocatalisador (Miranda *et al.*, 2014). A interação entre os parâmetros foi significativa ao nível de 95% de confiança.

Nos níveis máximos de concentração de biocatalisador (12% m/v) e agitação (200 rpm) e nos níveis mínimos de temperatura (30 °C) e peneira molecular (ausência), foi alcançada a máxima conversão em éster. Em condições ótimas, reações de esterificação foram conduzidas em triplicata e máxima conversão em éster foi de  $43,4 \pm 1,5\%$ , similar ao valor predito pelo modelo proposto – equação 1 (42,2%). De acordo com estes resultados, o modelo proposto foi considerado preciso e confiável para explicar a produção enzimática de valerato de etila.

Para otimizar a produção de valerato de etila, foi proposto um segundo delineamento experimental completo “estrela rotacional”  $2^3$  com 18 ensaios (8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 4 ensaios no ponto central) com o intuito de verificar a faixa ótima de produção do éster. Neste estudo, foi verificada a influência da concentração de biocatalisador (10-20% m/v), temperatura (20-35 °C) e agitação (170-250 rpm). Os resultados estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Segundo delineamento experimental completo “estrela rotacional” proposto para a produção enzimática de valerato de etila (aroma de maçã verde) em meio orgânico

Ensaio	Variáveis codificadas (originais)			Resposta
	Biocatalisador (% m/v)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Conversão (%)
1	-1 (12)	-1 (24,5)	-1 (186)	$40,9 \pm 1,6$
2	+1 (18)	-1 (24,5)	-1 (186)	$44,1 \pm 2,8$
3	-1 (12)	+1 (30,5)	-1 (186)	$78,4 \pm 0,2$
4	+1 (18)	+1 (30,5)	-1 (186)	$87,2 \pm 0,8$
5	-1 (12)	-1 (24,5)	+1 (234)	$37,4 \pm 0,8$
6	+1 (18)	-1 (24,5)	+1 (234)	$43,8 \pm 1,6$
7	-1 (12)	+1 (30,5)	+1 (234)	$81,8 \pm 0,7$
8	+1 (18)	+1 (30,5)	+1 (234)	$88,2 \pm 1,0$
9	-1,68 (10)	0 (27,5)	0 (210)	$38,1 \pm 1,4$
10	+1,68 (20)	0 (27,5)	0 (210)	$51,1 \pm 2,5$
11	0 (15)	-1,68 (20)	0 (210)	$81,0 \pm 0,6$
12	0 (15)	+1,68 (35)	0 (210)	$79,2 \pm 1,1$
13	0 (15)	0 (27,5)	-1,68 (170)	$49,6 \pm 3,0$
14	0 (15)	0 (27,5)	+1,68 (250)	$88,7 \pm 0,5$
15	0 (15)	0 (27,5)	0 (210)	$87,2 \pm 1,1$
16	0 (15)	0 (27,5)	0 (210)	$86,9 \pm 0,8$
17	0 (15)	0 (27,5)	0 (210)	$87,4 \pm 1,0$
18	0 (15)	0 (27,5)	0 (210)	$87,1 \pm 1,0$

Os resultados mostrados na Tabela 2 mostram que a conversão em éster variou entre  $40,9 \pm 1,6\%$  (ensaio 1) e  $88,2 \pm 1,0\%$  (ensaio 8) após 5 min de reação. Os resultados experimentais sumarizados na Tabela 2 foram também utilizados para estimar os efeitos principais das variáveis (concentração de biocatalisador, temperatura e agitação) e as suas interações. A análise estatística mostrou efeitos significativos para todos os termos lineares e quadráticos das variáveis estudadas a 95% de nível de confiança. Entretanto, as interações não foram significativas, consequentemente excluídas do modelo. A equação 2 representa os dados experimentais obtidos no segundo delineamento experimental (Tabela 2) que apresentou variabilidade ( $R^2$ ) de 96,49%.

$$\text{Conversão}(\%) = 87,12 + 3,45x_1 - 14,51x_1^2 + 12,94x_2 - 3,95x_2^2 + 5,71x_3 - 5,93x_3^2 \quad (2)$$

Em que:  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  representam os valores codificados para concentração de biocatalisador, temperatura e velocidade de agitação, respectivamente.

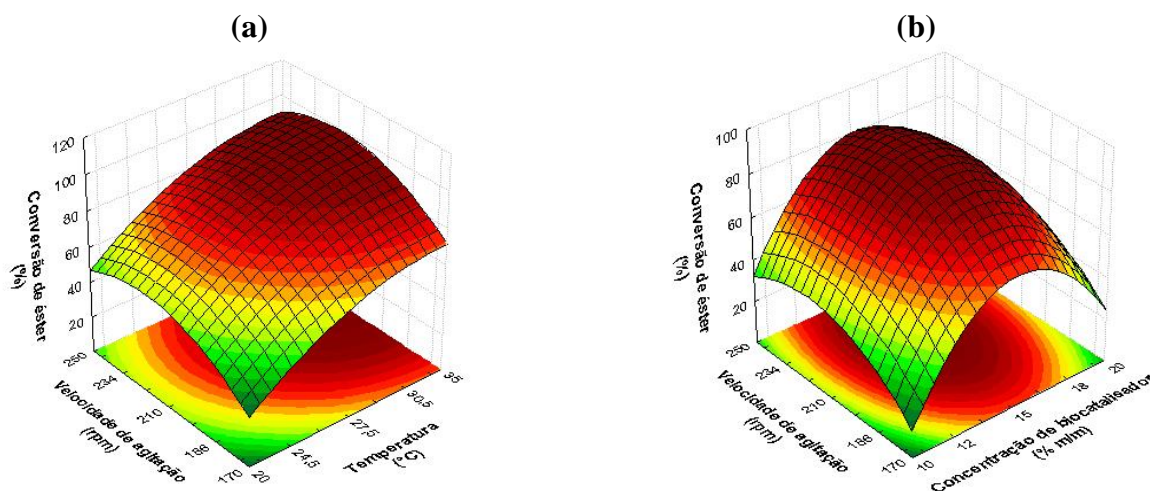


Figura 2 – Superfícies de resposta de acordo com o modelo predito para a produção de valerato de etila. Efeito da temperatura e da agitação (a) e efeito da concentração de biocatalisador e agitação (b) na porcentagem de conversão em éster.

As superfícies de resposta geradas pelo modelo proposto no segundo planejamento são mostradas na Figura 2(a,b). O efeito da agitação e temperatura de reação é mostrado na Figura 2a. Máxima conversão em éster foi alcançada para a reação conduzida entre 30,5 e 35°C e agitação oscilando entre 210 e 234 rpm. Com relação à influência da concentração de biocatalisador, é possível observar na Figura 2b que máxima conversão foi observada a 15% m/v de enzima imobilizada. Baseado nas superfícies de respostas é possível notar que máxima conversão foi obtida para a reação de esterificação realizada na temperatura de 32,7 °C, concentração de biocatalisador de 15% m/v e agitação de 234 rpm. Nestas condições, máxima conversão foi de  $92,3 \pm 1,6\%$  após 5 min de reação. Este valor foi similar ao valor predito pelo modelo que foi de 97,1%. Estes resultados mostram que o biocatalisador preparado foi bastante ativo na obtenção de compostos de interesse industrial como valerato de etila (aroma de maçã verde).

## 5. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi proposta a produção de valerato de etila por esterificação direta em meio orgânico mediada por lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada por adsorção física em PHB, um suporte altamente hidrofóbico, de baixo custo e renovável. Em condições otimizadas (reações conduzidas com concentração de biocatalisador de 15% m/v por incubação a 32,7 °C e agitação de 234 rpm), máxima conversão de  $92,3 \pm 1,6\%$  foi alcançada após 5 min de reação. Este estudo demonstrou que os delineamentos experimentais propostos foram apropriados para a maximização da reação de síntese do éster de aroma de fruta. A aplicação do biocatalisador preparado mostrou ser uma estratégia economicamente atraente para a produção de compostos de interesse industrial como ésteres de aroma, uma importante classe de compostos amplamente empregados na indústria de alimentos, cosméticos e produtos de higiene pessoal.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG (Processo APQ-00968-12), CNPq (Processo 475289/2012–9), CAPES e FINEP pelo suporte financeiro. Os autores também agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa à A. P. P. Bressani.

## 7. REFERÊNCIAS

- BAYRAMOGLU, G.; KARAGOZ, B.; ALTINTAS, B.; ARICA, M.Y.; BICAK, N. Poly(styrene–divinylbenzene) beads surface functionalized with di-block polymer grafting and multi-modal ligand attachment: performance of reversibly immobilized lipase in ester synthesis. *Bioprocess Biosyst. Eng.* v. 34, p. 735-746, 2011.
- DHAKE, K.P.; THAKARE, D.D.; BHANAGE, B.M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour Fragr. J.* v. 28, p. 71-83, 2013.
- MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; VÉLEZ, A.M.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C.; CASTRO, H.F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* v. 50, p. 503-511, 2012.
- MIRANDA, J.S.; SILVA, N.C.A.; BASSI, J.J.; CORRADINI, M.C.C.; LAGE, F.A.P.; HIRATA, D.B.; MENDES, A.A. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. *Chem. Eng. J.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.087>, 2014.
- SILVA, N.C.A.; MIRANDA, J.S.; BOLINA, I.C.A.; SILVA, W.C.; HIRATA, D.B.; CASTRO, H.F.; MENDES, A.A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. *Biochem. Eng. J.*, v. 82, p. 139-149, 2014.