

INFLUÊNCIA DO pH NA LIPASE DE *Burkholderia cepacia* IMOBILIZADA EM ALGINATO DE CÁLCIO SECO NA PRODUÇÃO DO VALERATO DE ETILA

G. S. PADILHA^{1*} e R. M. ALEGRE¹

¹ Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Departamento de Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: giovana_padilha@yahoo.com.br

RESUMO – A reação de esterificação do ácido valérico/etanol em *n*-heptano na produção do valerato de etila foi investigada usando lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia* em alginato de cálcio seco preparado com soluções tampão com diferentes pHs – 5 a 9,2. Estudos anteriores mostraram que a conversão na ordem de 80% do valerato de etila foi usando a razão molar ácido/álcool de 0,5 e 30% de enzima imobilizada. Para este trabalho, as mesmas condições foram usadas, substituindo a água deionizada pelos tampões citrato (pH 5 e 6), fosfato (pH 7 e 8) e carbonato-bicarbonato (pH 9,2) na preparação das microcápsulas de alginato de cálcio. O estudo mostrou que foi possível alcançar quantidade significativa do éster em menor tempo de reação quando comparado com o imobilizado sem o sistema tampão. Alíquotas foram retiradas durante 120 horas e tituladas com KOH 0,02 M. Em 3 horas de reação, na síntese do valerato de etila, usando as microcápsulas de alginato de cálcio secas preparadas com solução tampão pH 9,2, foi possível observar conversão 2,2 vezes maior quando comparado ao sistema sem tampão. Análises de cromatografia gasosa de alta resolução foram feitas para confirmar a síntese do valerato de etila.

1. INTRODUÇÃO

O uso dos ésteres de ácidos graxos de cadeia curta tem se tornado crescente nas indústrias alimentícias, de cosméticos e farmacêuticas. Devido a crescente demanda, tornou-se necessário encontrar formas alternativas à extração natural que é escassa e cara para fins comerciais. A forma mais usual da obtenção dos ésteres baseia-se na esterificação química dos ácidos graxos e álcool na presença de catalisadores inorgânicos, no entanto essa forma de obtenção é tediosa, não seletiva e consome grande quantidade de energia (Ozyilmaz e Geser, 2010; Karra-Châabouni *et al.*, 2006).

O uso da lipase como alternativa à síntese química ou extração vegetal tem se tornado atrativo no âmbito industrial. As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam reações hidrolíticas, entretanto quando empregado em ambiente de pouca água, eles podem executar reações inversas como a esterificação. Biotransformações catalisadas por lipase tem sua importância por causa de suas características de regio-, estereo e especificidade pelo substrato, condições reacionais mais brandas e baixo consumo de energia (Hari Krishna *et al.*, 2000).

Contudo os altos custos e os procedimentos de purificação acabam tornando as enzimas economicamente desinteressantes. Desta forma, uma enzima precisa cumprir importantes requisitos como tolerância a solventes, capacidade de reutilização e maior estabilidade térmica. Uma possível solução para este problema é a imobilização em suportes sólidos que as tornem economicamente viáveis (Raghavendra *et al.*, 2010)

O uso da lipase na sua forma imobilizada confere maior estabilidade à enzima em relação às condições adversas do meio reacional. Para garantir concentração elevada e distribuição uniforme da enzima, usa-se suporte inerte no processo de imobilização. Muitos suportes são usados na imobilização das lipases, no entanto, estes precisam garantir maior estabilidade operacional e retenção do biocatalisador que são fundamentais na eficácia do método. O principal propósito de imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade, que não sejam afetados durante o processo, o que não ocorre com as enzimas na forma livre (Inanov e Scheneider, 1997; Dave e Madamwar, 2006; Bayramoğlu *et al.*, 2011).

Embora as reações de esterificação sejam comuns, os biocatalisadores ainda precisam ser compreendidos em relação ao seu comportamento e especificidade na síntese de ésteres aromáticos (Martins *et al.*, 2014). Dessa forma, ainda existe um grande campo a ser explorado, relacionado à síntese enzimática de ésteres aromáticos em sistemas que empreguem materiais de baixo custo como suportes, gerando resultados que permitam verificar a viabilidade técnica e econômica da produção desses compostos. O principal objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento dos diferentes pHs na produção do valerato de etila. Os diferentes tampões foram usados na produção do imobilizado a partir da lipase de *Burkholderia cepacia* em alginato de cálcio. Padilha *et al.* (2013) estudaram o efeito da razão molar dos substratos (ácido valérico/etanol) e quantidade de enzima. Os resultados mostraram 83% de conversão do valerato de etila usando razão molar 0,5 e 30% de enzima imobilizada ao final de 120 horas de reação. No entanto, usando as microcápsulas de alginato de cálcio secas preparadas com solução tampão, em 3 horas de reação, foi possível observar conversão em valerato de etila quase 2 vezes maior em todos os pHs quando comparado ao sistema sem tampão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Os reagentes usados para a reação de esterificação foram o etanol (Synth), o ácido valérico e o solvente *n*-heptano (Sigma Aldrich - St. Louis - MO).

2.2. Biocatalisador

Nos experimentos foi utilizada a lipase comercial de *Burkholderia cepacia* (Sigma Aldrich - St. Louis - MO). 10 g da lipase comercial foi misturada à solução de alginato de sódio (2% m/v, 200 mL) tamponada com concentração de 0,1M nos em diferentes pHs - 5 e 6 (tampão citrato), 7 e 8 (tampão fosfato) e 9,2 (tampão carbonato-bicarbonato) - em Turrax a 10.000 rpm durante 2 min. Essa solução foi gotejada em cloreto de cálcio - CaCl₂ (4% m/v) a temperatura ambiente. As microcápsulas de alginato de cálcio foram formadas por reticulação. Após o gotejamento, as

microcápsulas foram mantidas no banho iônico por 30 minutos (tempo de cura), e então separadas em peneiras (25µm) e lavadas com 1000 mL de água destilada (Padilha *et al.*, 2012). Após a produção, as microcápsulas foram secas em estufa a 30° C com circulação de ar, restando 5% de umidade.

2.3. Síntese do valerato de etila

Frascos reagentes de 50 mL rosqueados cilíndricos, contendo razão molar 0,5 (ácido valérico/etanol) em *n*-heptano foram incubados em shaker orbital a 37°C. Os frascos foram incubados com os substratos por 5 minutos antes de adicionar 30% (m/v) das microcápsulas. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação nos seguintes intervalos de tempos: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 e 120 horas, quantificando o consumo de ácido graxo. Todas as reações foram realizadas na presença de peneira molecular. A análise da porcentagem molar de esterificação pela concentração de ácido graxo foi determinada por titulação de alíquotas dissolvidas em 10 mL de etanol/acetona (1:1), empregando-se solução de KOH 0,02M e fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram efetuados pela Equação 1.

$$AGL(\%) = \frac{V_{KOH} \cdot M \cdot PM}{10 \cdot m} \quad (1)$$

Onde: *AGL* é a porcentagem dos ácidos graxos, *V* é o volume de KOH gasto na titulação no tempo *t* (mL); *M* é a molaridade da solução de KOH; *PM* é o peso molecular do ácido graxo titulado e *m* é a massa da alíquota titulada (g).

A conversão do substrato foi expressa em conversão molar do ácido graxo consumido conforme Equação 2.

$$\%Molar = \frac{(C_0 - C)}{C_0} * 100 \quad (2)$$

Em que: *C*₀ = concentração inicial do reagente e *C* = concentração do reagente em um determinado tempo.

2.4. Cromatografia gasosa

A separação e detecção dos compostos voláteis foram realizadas por CG-FID Cromacon (modelo Simple Crom). 1 µL 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. O tempo de retenção (*t*_R) foi de 7,40 min. A identificação e quantificação do valerato de etila foram feitos por comparação com o tempo de retenção das amostras com o padrão. Para a curva padrão do valerato de etila (Sigma Aldrich - St. Louis – MO) foi usado concentrações 0,05 a 0,3% diluído em *n*-heptano. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do pH na esterificação

A Tabela 1 apresenta os resultados dos diferentes tampões na conversão do valerato de etila. A partir do exposto, verifica-se que em 3 horas de reação foi possível obter resultados bastante expressivos. Os tampões com pHs 5 a 8 apresentaram resultados próximos em 3 horas de reação. O resultado mais significativo foi usando o tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,2), que obteve valor 10% maior quando comparado com os outros tampões. Foi possível notar que após 9 horas de reação, a conversão em valerato de etila manteve-se praticamente constante até 120 horas. Isto mostra que é possível obter valores próximos a 100% de conversão em menor tempo de reação. Karra-Châabouni *et al.* (2006) obtiveram 78% de conversão na produção do valerato de etila após 72 horas de reação usando lipase de *Staphylococcus simulans* imobilizada em CaCO_3 e *n*-heptano como solvente. Xu *et al.* (2002) com a lipase de *Ryzopus chinesis* estudaram diversos parâmetros para a conversão em valerato de etila. O estudo mostrou que ao testarem diferentes solventes, o *n*-heptano foi o que apresentou maior conversão em éster (96,4%). No entanto, a conversão máxima obtida foi de 98,5% usando razão molar ácido/álcool 1:3. Isso mostra que o presente estudo apresenta conversões bastante satisfatórias usando o alginato de cálcio tamponado sem variar as razões molares dos reagentes. Além disso, os bons resultados de esterificação do valerato de etila podem ser devido ao fato das reações ocorrerem em meios contendo *n*-heptano que mostra ser um solvente bastante adequado, auxiliando a produção do valerato de etila na fase orgânica (Martins *et al.*, 2014; Guillén *et al.*, 2012). Haja vista que muito dos estudos encontrados na literatura com biocatalisadores usa *n*-heptano na conversão dos ésteres.

Tabela 1 – Conversão do valerato de etila em diferentes pHs

Tempo (h)	AG (mM)	Éster (%)	AG (mM)	Éster (%)	AG (mM)	Éster (%)	AG (mM)	Éster (%)	AG (mM)	Éster (%)
pH	5		6		7		8		9,2	
0	6009,27	0,0	6000,60	0,0	6059,26	0,0	6043,35	0,0	6003,28	0,0
3	1354,49	77,5	1400,06	76,7	1455,96	76,0	1356,73	77,6	1022,46	83,0
6	346,23	94,2	461,18	92,3	546,93	91,0	413,84	93,2	397,76	93,4
9	337,58	94,4	368,73	93,9	336,08	94,5	407,23	93,3	386,25	93,6
12	328,21	94,5	366,16	93,9	329,82	94,6	404,08	93,3	384,79	93,6
24	326,96	94,6	335,13	94,4	326,88	94,6	394,59	93,5	371,85	93,8
48	326,96	94,6	335,13	94,4	326,88	94,6	374,18	93,8	365,09	93,9
72	326,96	94,6	335,13	94,4	326,88	94,6	360,58	94,0	338,05	94,4
120	326,05	94,6	335,06	94,4	327,59	94,6	351,93	94,2	321,71	94,6

A Tabela 2 mostra o sistema sem tampão usado para obtenção do valerato de etila estudado por Padilha *et al.* (2013). A partir dos resultados verifica-se que o sistema sem tampão precisou de 120 horas de reação para obter o mesmo rendimento em éster quando comparado à conversão que ocorreu em 3 horas usando o pH 9,2. Alguns estudos mostram a imobilização em gel de alginato como suporte em lipases de diferentes fontes tanto para a síntese de alguns compostos como para verificar o

desempenho da enzima frente ao método de imobilização. Betigeri e Neau (2002) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* em polímeros como agarose, alginato e quitosana. No entanto a atividade enzimática foi menor tanto para a lipase imobilizada quanto para a liofilizada quando comparado a outros polímeros. Os autores descreveram que a enzima não apresentou boa interação com o alginato. Cheirsilp *et al.* (2009) reportaram a imobilização em alginato da lipase de *Pseudomonas sp* para produção do monoacilglicerol (MAG) a partir do óleo de palma com adição de glicerol para aumentar o rendimento do MAG. Ozyilmaz e Geser (2010) produziram os ésteres valerato de etila, acetato de isoamila e acetato de butila a partir da imobilização da lipase de *Candida rugosa* (CLR) e pâncreas suíno (PPL) em alginato. O melhor rendimento foi para o acetato de isoamila quando o imobilizado PPL foi usado. Embora alguns trabalhos usem soluções tampão na lavagem do suporte e nas reações durante a produção dos ésteres (Mahapatra *et al.*, 2009; Cheirsilp *et al.*, 2009), o uso de soluções tampão durante a imobilização da lipase em alginato de cálcio não são reportados na literatura. Este trabalho demonstra sua relevância no melhor entendimento da interação lipase-alginato. Raghavendra *et al.* (2010) ao estudar a síntese do valerato de etila usando a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em organo-gel (MGG) verificaram durante as reações faixas de pH para melhor conversão do éster. A lipase foi dissolvida em diferentes tampões a 0,1M: tampão acetato pH 5, tampão fosfato de sódio pH 6, 7 e 8 e tampão Tris-HCl pH 8,8. Maiores conversões do éster foram observados em menores valores de pH - 5 (85,7%), 6 (97,3%) e 7 (98,91%), ou seja, maiores conversões foram obtidas dos pHs ácidos para o neutro quando comparado com o valores de pHs alcalinos. Ao considerar 3 horas de reação, estes resultados confrontam os encontrados para este trabalho, já que obteve-se maior conversão em valerato de etila ao usar pH mais alcalino.

Tabela 2 – Sistema sem tampão e em pH 9,2 na conversão do valerato de etila

Tempo (h)	AG (mM)	Éster (%)	AG (mM)	Éster (%)
pH	9,2		Sem tampão	
0	6003,28	0,0	6497,69	0,0
3	1022,46	83,0	4051,74	37,6
6	397,76	93,4	2756,28	57,6
9	386,25	93,6	1600,24	75,4
12	384,79	93,6	1585,31	75,6
24	371,85	93,8	1419,74	78,2
48	365,09	93,9	1331,50	79,5
72	338,05	94,4	1235,95	81,0
120	321,71	94,6	1097,28	83,1

A Figura 1 sumariza os resultados para o tampão carbonato-bicarbonato e sistema sem tampão. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em alginato de cálcio tamponado apresentou maior conversão em valerato de etila em relação à lipase imobilizada sem tampão.

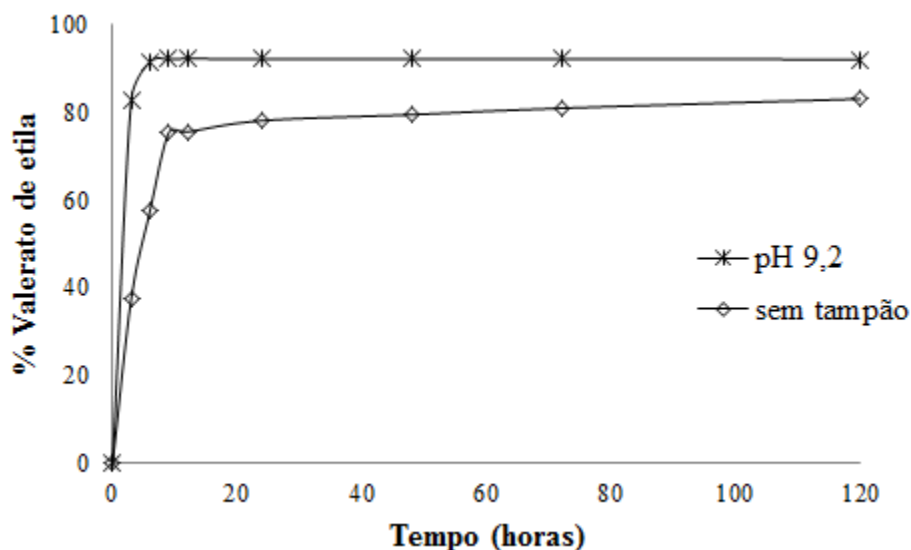


Figura 1 – Comparação do rendimento do valerato de etila em sistema sem tampão e em tampão carbonato-bicarbonato.

3.2 Identificação analítica

A Tabela 3 mostra a equação da reta obtida pela curva padrão do valerato de etila e o coeficiente de determinação (R^2).

Tabela 3 – Dados da curva padrão

Valerato de etila	Equação da reta ($y=ax+b$)		
	A	B	R^2
	91951	1925,6	0,998

A Figura 2 apresenta o cromatograma obtido por CG-FID analisado por injeção da mistura reacional (pH 9,2) após 120 horas de conversão. A técnica permitiu quantificar o valerato de etila a partir dos dados da curva padrão. Para os valores estarem dentro da curva padrão, a amostra foi diluída 40x. O tempo de retenção de 13,66 é correspondente ao ácido valérico restante na mistura reacional. Cromatogramas feitos nos tempos reacionais iniciais apresentaram intensos picos do ácido valérico (dados não mostrados). A Tabela 4 mostra a concentração de ésteres obtida em alguns tempos de reação. Análise no tempo 0 foi após 15 minutos de reação. Também foi feita uma análise na metade do tempo entre a primeira e segunda análise para melhor acompanhamento na conversão do valerato de etila. Os cromatogramas com os demais tempos de reação não foram apresentados por estarem semelhantes ao de 120 horas, isto mostra que é possível parar a reação em 6 horas e obter conversões próximas a 100% na produção do valerato de etila.

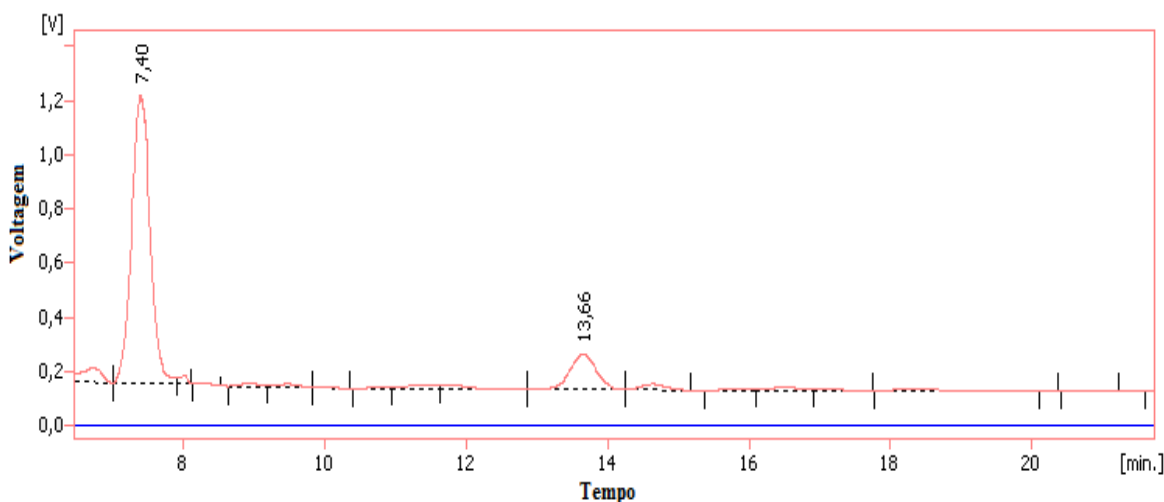


Figura 2 – Cromatograma CG-FID tampão carbonato-bicarbonato. t_R : 7,40 = valerato de etila; t_R : 13,66= ácido valérico.

Tabela 4 – Concentração do valerato de etila em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,2)

Tempo (h)	Pico	Diluição	Concentração (%)
0	14057,44	-	0,13
1,5	18853,30	1:20	3,71
3	25555,49	1:20	5,18
120	19281,43	1:40	7,61

4. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a capacidade de lipase imobilizada em alginato seco em sintetizar o valerato de etila com rendimentos satisfatórios. Em 3 horas de reação, os diferentes tampões mostraram rendimentos 2 vezes maior do que o sistema sem tampão. O melhor resultado foi com o tampão carbonato-bicarbonato. Com base nestes resultados, a interação alginato-tampão-lipase foi um fator preponderante na produção do valerato de etila.

5. 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. *Proc. Biochem.*, v. 46, p. 372-378, 2011.
- BETIGERI, S.S.; NEAU, S.H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials*, v. 23, p. 3627-3636, 2002.
- CHEIRSILP, B.; JEAMJOUNKHAW, P.; H-KITTIKUN, ARAN. Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 59, p. 206-211, 2009.

DAVE, R.; MADAMWAR, D. Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA–alginate–boric acid. *Proc. Biochem.*, v. 41, p. 951-955, 2006.

GUILLÉN, M.; BENAIGES, M.D.; VALERO, F. Biosynthesis of ethyl butyrate by immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase expressed in *Pichia pastoris*. *Biochem. Eng. J.*, v. 65, p. 1-9, 2012.

INANOV, A.E.; SCHNEIDER, M.P. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 3, p. 303-309, 1997.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; GHAMGUI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI, Y. Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. *Process Biochem.*, v. 41, p. 1692 – 1698, 2006.

HARI KRISHNA, S.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *J. Biotechnol.*, v. 87, p. 193-201, 2001.

MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; VIJAY, K.G.; BANERJEE, R.; NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 60, p. 57-63, 2009.

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. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 105, p. 18-25, 2014.

OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 64, p. 140-145, 2010.

PADILHA, G.S.; ALEGRE, R.M.; TAMBOURGI, E.B. Study of morphology, stability and structure of *Burkholderia cepacia* lipase with alginate gels. *Intern. Rev. Chem. Engineer.*, v. 4, p. 162-167, 2012.

PADILHA, G.S.; BARROS, M.; ALEGRE, R.M.; TAMBOURGI, E.B. Production of ethyl valerate from *Burkholderia cepacia* lipase immobilized in alginate. *Chem. Eng. Trans.*, v. 32, p. 1063-1068, 2013.

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. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 63, p. 31-38, 2010.

XU, Y.; WANG, D.; MU, X.Q.; ZHAO, G.A.; ZHANG, K.C. Biosynthesis of ethyl ester of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis* CCTCC M 201221 in non-aqueous phase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 18, p. 29-37, 2002.