



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Otimização da Produção de Butanoato de Etila Catalizada por Lipozyme 435 em Sistema Livre de Solventes

Suelen P. Piazza<sup>1</sup>, Rogério M. Dallago<sup>1</sup>, Rogério L. Cansian<sup>1</sup> e Natalia Paroul<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus Erechim  
99709-910 Erechim – RS - E-mail: nparoul@uricer.edu.br

#### RESUMO

*Relata-se a otimização de produção de butanoato de etila (sabor abacaxi) por esterificação de etanol e ácido butanóico num sistema isento de solvente, utilizando Lipozyme 435 (*Candida antarctica*) como catalisador. As condições de operação que maximizaram a produção deste éster foram 30°C, proporção molar de ácido:álcool de 1:8, 150rpm e 12% de enzima (massa de substratos), com uma conversão de reação de aproximadamente 95% em 4h. O estudo cinético realizado permitiu concluir que um excesso de álcool (álcool à relação molar de ácido de 8:1), concentração da enzima relativamente baixo (5% em peso) e temperatura de 50°C proporcionou conversão quase completa após 1 hora de reação. Os dados experimentais sobre a esterificação enzimática de etanol e ácido butanóico para a produção de butanoato de etila mostram uma perspectiva promissora da técnica para superar os inconvenientes da rota catalisada quimicamente.*

Palavras-chave: Butanoato de etila, esterificação enzimática, aroma, Lipozyme 435.

#### INTRODUÇÃO

Atualmente, a maior parte dos componentes de aroma e sabor utilizados pelas indústrias de alimentos são produzidos por métodos tradicionais, tais como a extração de fontes naturais ou via catalise ácida (Ghamgui et al., 2005; Mahapatra et al., 2009).

Ésteres naturais, extraídos diretamente das plantas possuem alto custo e muitas vezes não atendem a demanda do mercado em função de baixo rendimento o que torna essa técnica inadequada para aplicações industriais (Salah et al., 2007; Aragão et al., 2009). Os processos biotecnológicos oferecem vantagens e se mostram como uma alternativa competitiva a catalise ácida devido à alta eficiência catalítica, condições operacionais brandas e à seletividade dos catalisadores naturais o que pode resultar em uma redução no custo energético e de equipamentos em relação às transformações por via unicamente química (Sun et al., 2012; Grosso et al., 2013), além de atenderem ao crescente apelo dos consumidores por produtos "naturais".

Segundo Castro et al. (2004), aproximadamente 50 ésteres formadores de aromas já foram sintetizados por reações enzimáticas. Em geral, o processo pode ser realizado em meios reacionais contendo mistura de álcool e ácido carboxílico na presença ou ausência de solventes, resultando em altos rendimentos.

A lipase obtida de *Candida antarctica* demonstra uma elevada atividade catalítica para a esterificação de ácidos dicarboxílicos, sendo um catalisador versátil para uma ampla gama de reações orgânicas. Sua alta atividade, estabilidade térmica, seletividade e especificidade em



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

comparação com outras lipases conhecidas possibilita o uso dessa enzima em diversas aplicações (Paroul et al., 2012; Chiaradia et al., 2012; Vanin et al., 2014).

Dentro desse contexto, o objetivo do trabalho foi otimizar o processo de produção enzimática do aromatizante butanoato de etila (aroma de abacaxi) usando a lipase comercial Lipozyme 435 como catalisador.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a lipase comercial de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica (Lipozyme 435) como biocatalizador e ácido butanoico e álcool etílico (anidro) como substratos. Para determinar as condições experimentais que otimizam a síntese de butanoato de etila, foi realizado um delineamento composto rotacional central  $2^2$  completo (DCCR). Onze ensaios foram realizados, variando a proporção molar do substrato e concentração de enzima (Tabela 1). O planejamento foi executado em triplicata ponto central para avaliar o erro associado com o processo.

Todos os experimentos foram realizados num agitador orbital a uma agitação constante de 150 rpm durante 4 horas. Após a conclusão do tempo de reação, o biocatalizador foi filtrado para posterior medição da atividade da enzima e as amostras foram mantidas a 5°C para análise posterior e determinação de conversão da reação.

Tabela 1. Variáveis e níveis do planejamento experimental (valores codificados e reais) para a síntese de butanoato de etila com Lipozyme 435.

Variáveis	Níveis				
	-1.41	-1	0	1	1.41
Concentração de Enzima (peso%)	2.95	5	10	15	17.05
Razão Molar Ácido/Álcool (m/v)	1:2.18	1:3	1:5	1:7	1:7.82

\* 30 °C, 150 rpm e 6 horas.

O software Statistica ® 8.0 (Statsoft Inc. USA) foi usado para as análises, com nível de significância de 90% ( $p < 0.1$ ).

Após a otimização das condições experimentais, foram realizados ensaios cinéticos avaliando-se o rendimento de butanoato de etila, variando-se a temperatura (30, 40 e 50°C) com as demais variáveis fixas (razão molar ácido/álcool 1:5; 12% de enzima; 150rpm) e com diferentes concentrações de enzima em temperatura de 50°C com as demais variáveis fixas, em tempos de 20 a 120 min.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 2 apresenta a matriz do DCCR  $2^2$  completo com as respostas em termos de conversão em butanoato de etila.

Pode-se observar que altas conversões foram obtidas nos ensaios com maior concentração da enzima e maior excesso de álcool. Em relação da razão molar, a literatura salienta que um excesso de álcool pode afetar positivamente o processo de conversão (Chiaradia et al., 2012) já que a reação é reversível.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 2: Matriz do planejamento experimental  $2^2$  com as respostas em termos de conversão em butanoato de etila a 30°C, 150 rpm e 4 h.

Experimento	Razão Molar (ácido:álcool)	[E] (peso%)	Rendimento (%)		
			Experimental	Predito	AAD%
1	1:3	5	88.1	86.3	2.04
2	1:7	5	92.0	91.1	0,98
3	1:3	15	90.6	89.1	1.66
4	1:7	15	93.7	94.3	-0.64
5	1:2.18	10	85.0	87.3	-2.71
6	1:7.82	10	94.7	95.9	-1.27
7	1:5	2.95	85.2	87.0	-2.11
8	1:5	17.05	91.3	91.6	-0.33
9	1:5	10	93.3	93.3	0,00
10	1:5	10	93.4	93.3	0.11
11	1:5	10	93.1	93.3	-0.21

MR-molar ratio; [E] – enzyme concentration

O modelo codificado otimizado para a produção de butanoato de etila foi validado pela análise de variância (ANOVA) sendo apresentado na Equação 1.

$$\text{Conversão de butanoato de etila (\%)} = 93.28 + 2.59 \cdot \text{RM} - 1.19 \cdot \text{RM}^2 + 1.61 \cdot \text{E} - 2 \cdot \text{E}^2$$

(1)

Onde:

RM – Razão molar (ácido/álcool)

[E] – Concentração de enzima (peso%)

A Figura 1 apresenta os resultados da cinética de produção de butanoato de etila em diferentes temperaturas (A) mantendo fixas as demais variáveis (razão molar ácido/álcool 1:5; 12% de enzima; 150rpm) e com diferentes concentrações de enzima em temperatura de 50°C (B) com as demais variáveis fixas.

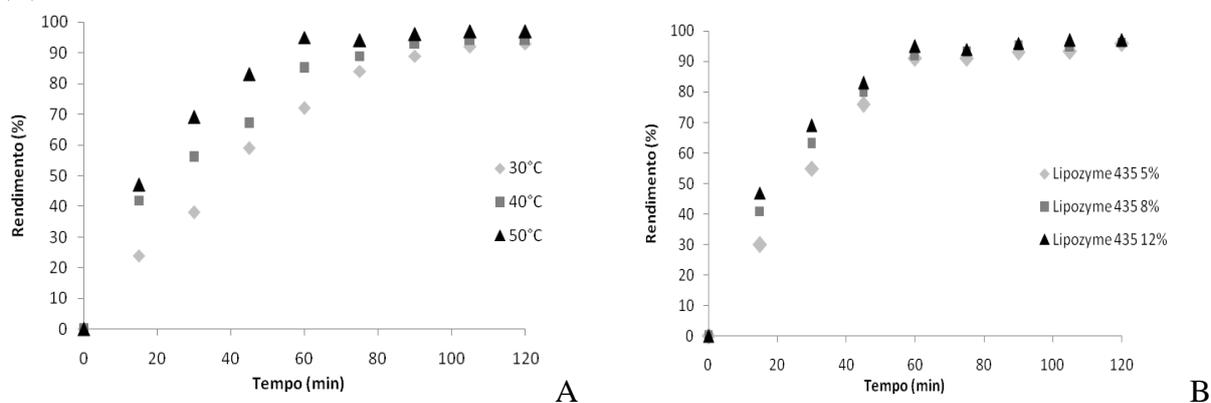


Figura 1: Cinética de produção de butanoato de etila em diferentes temperaturas (A) e diferentes concentrações de enzima (B).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

O aumento da temperatura de reação propiciou uma redução no tempo desta, obtendo-se rendimentos máximos em 60 minutos com 50°C. Visando reduzir custos com a enzima, avaliou-se o diferentes concentrações de enzima com reação a 50°C. Observou-se que, embora concentrações mais altas de enzima produzam maiores rendimentos nos primeiros intervalos de tempo avaliados, com 1 hora de reação, 5% de enzima é suficiente para atingir o máximo rendimento a 50°C.

### CONCLUSÕES

A otimização da produção de butanoato de etila (95% de rendimento) foi obtida pelo planejamento experimental com temperatura de 30°C, razão molar ácido:álcool 1:8, agitação de 150rpm e 12% de Lipozyme 435 em 4 horas de reação. O aumento da temperatura de reação para 50°C permitiu a redução da concentração de enzima para 5% em um tempo de reação de 60 minutos.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPERGS, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aragão VC, Anschau A, Porciuncula BDA, Thiesen C, Kalil SJ, Burkert CAV, Burkert JFM. 2009. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. *Quim Nova* 32: 2268-2272.
- Castro HF, Mendes AA, Santos JC, Aguiar CL. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quím Nova* 27(1): 146-156.
- Chiaradia V, Paroul N, Cansian RL, Júnior CV, Detofol MR, Lerin LA, Oliveira JV, Oliveira D. 2012. Synthesis of eugenol esters by lipase-catalyzed reaction in solvent-free system. *Appl Biochem Biotechnol* 67: 742-751.
- Ghamgui H, Karra-Châabouni M, Bezzine S, Miled N, Gargouri Y. 2006. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. *Enzyme Microb Tech* 38: 788-794.
- Grosso C, Ferreira-Dias S, Pires-Cabral P. 2013. Modelling and optimization of ethyl butyrate production catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase. *J Food Eng* 115: 475-480.
- Mahapatra P, Kumari A, Garlapati VK, Banerjee R, Nag A. 2009. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. *J Mol Catal B: Enzym* 60: 57-63.
- Paroul N, Grzegozeski LP, Chiaradia V, Treichel H, Cansian RL, Oliveira VJ, Oliveira D. 2012. Solvent-Free Production of Bioflavors by Enzymatic Esterification of Citronella (*Cymbopogon winterianus*) Essential Oil. *Appl Biochem Biotechnol* 166:13-21.
- Salah RB, Ghamhui H, Miled N, Mejdoub H, Gargouri Y. 2007. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. *J Biosci Bioeng* 103(4): 368-372.
- Sun J, Yu B, Curran P, Liu SQ. 2012. Optimisation of flavour ester biosynthesis in an aqueous system of coconut cream and fusel oil catalysed by lipase. *Food Chem* 135: 2714-2720.
- Vanin AB, Orlando T, Piazza SP, Puton BM, Cansian RL, Oliveira D, Paroul N. 2014. Antimicrobial and antioxidant activities of clove essential oil and eugenyl acetate produced by enzymatic esterification. *Appl Biochem Biotechnol* 174:1286-1298.