

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Síntese de Butanoato de Geranila (Aroma de Cereja) via Esterificação Enzimática

Carla R. Sbardelotto¹, Jamile Zeni¹, Rogério L. Cansian¹, Rogério Dallago¹ e Natalia Paroul¹

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

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a otimização dos parâmetros da reação para a síntese de aromatizante natural a partir de um álcool monoterpênico (geraniol) e ácido butanóico catalisada por Novozyme NZL-102-LYO-HQ (Cal B (PU)). A condição ótima para conversão do geraniol e ácido butanóico (94%) foi razão molar (geraniol: ácido butanóico) 5:1, agitação de 150 rpm, 70°C e concentração de enzima de 10% em massa em 2 horas de reação. Um estudo cinético foi realizado para avaliar a influência da razão molar dos substratos, concentração de enzima e da temperatura no rendimento em produto. Os resultados mostram que em uma hora de reação a conversão foi quase completa (~95%) sendo que a condição ótima para a enzima Cal B (PU) foi razão molar (3:1), concentração de enzima de 5% e temperatura de 40°C.

Palavras-chave: Butanoato de geranila, esterificação enzimática, aroma, Novozyme Cal B.

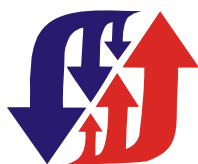
INTRODUÇÃO

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 são limitadas. Portanto, as vias biotecnológicas se tornam uma alternativa viável e inovadora para a produção de aromatizantes, pois possuem várias vantagens como: alta eficiência catalítica, condições operacionais brandas, alta seletividade, são classificados como naturais, vantagem ambiental evidente e menor consumo de energia (ARAGÃO et al., 2009; AKACHA et al., 2015).

A síntese de ésteres naturais em sistemas livres de solventes pode ser definida como solvólise, ou seja, uma reação na qual o reagente por si próprio atua como solvente. Várias investigações estão focadas no estudo das reações de esterificação enzimática em sistemas livres de solventes orgânicos (CHANG et al., 2007; RICHETTI et al., 2010; VANIN et al., 2014). Dentro desse contexto, o objetivo do trabalho foi otimizar o processo de produção enzimática do aromatizante butanoato de geranila (aroma de cereja) usando a lipase comercial Novozyme NZL-102-LYO-HQ (Cal B (PU)) como catalisador.

MATERIAL E MÉTODOS

A Lipase Cal B (Novozyme NZL-102) foi imobilizada *in situ* em suporte rígido de poliuretano (PU) conforme Nyari (2013). Para a otimização da produção de aroma de cereja



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

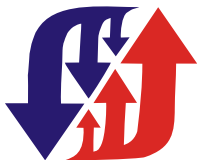
via esterificação enzimática, os experimentos foram realizados de acordo com um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 , com 17 ensaios (triplicata no ponto central), onde as variáveis estudadas foram temperatura (16,4 a 83,6 °C), concentração da enzima (0,025 a 13,06 % em peso) e razão 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. A quantificação do butirato de geranila foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados. 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% ($p < 0,05$). Após a otimização das condições experimentais, foram realizados ensaios cinéticos avaliando-se o rendimento de butanoato de geranila, variando-se a razão molar (1, 5, 10 e 15:1) temperatura (25, 40 e 70°C) e concentração de enzima (0, 5, 10 e 15%), com as demais variáveis fixas, em até 4 h.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta a matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 completo com as respostas em termos de conversão em butanoato de geranila.

Tabela 1. Matriz do Planejamento Experimental com os valores reais e codificados das variáveis independentes e a conversão de butanoato de geranila utilizando Cal B (PU).

Ensaios	Temp (°C)	RM geraniol/ácido butanóico	[E] %	Conversão Cal B (PU) (%)
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

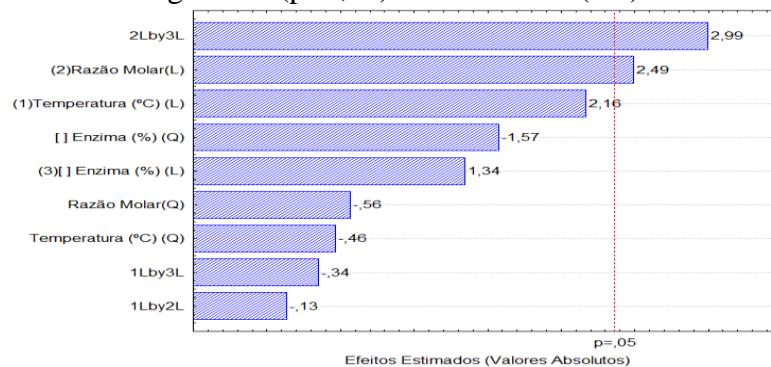


XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Pode-se observar que as maiores conversões foram obtidas nas temperaturas mais altas, excesso de álcool e maiores concentrações de enzima. As melhores respostas em termos de rendimento (Tabela 1) para a lipase CAL B (PU) foram obtidas no ensaio 8 (~94%) que corresponde a temperatura de 70°C, excesso de geraniol 5:1 e concentração de enzima de 10%.

Os resultados das conversões em butanoato de geranila usando CAL B (PU) foram tratados estatisticamente. Os efeitos absolutos das variáveis independentes estão apresentados na forma de Gráfico de Pareto na Figura 1.

Figura 1. Gráfico de Pareto para os efeitos razão molar, temperatura e concentração de enzima na produção de butanoato de geranila ($p < 0,05$) usando Cal B (PU).



Após 2 horas de reação, somente a razão molar (Linear) e interação entre razão molar e concentração de enzima apresentaram efeitos significativos positivos ($p < 0,05$).

Foram investigados também os efeitos da razão molar de substratos, concentração de enzima e temperatura sobre a cinética de produção de butanoato de geranila (Figura 2).

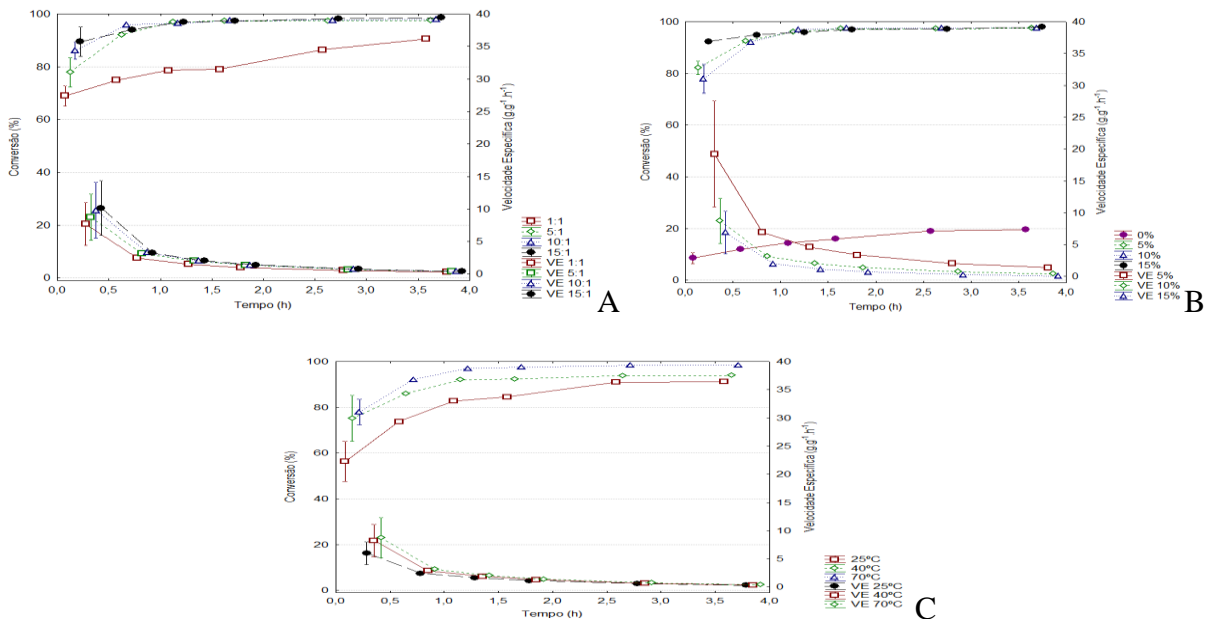
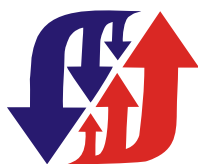


Figura 2: Cinéticas de produção de butanoato de geranila em diferentes razões molares (A), diferentes concentrações de enzima (B) e diferentes temperaturas (C).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A conversão máxima foi de 96% para razões molares de 5:1 e 10:1, após uma hora e trinta e uma hora de reação, respectivamente. As velocidades específicas diminuíram de 25,9; 24,11 e 33,8 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ nos primeiros 5 minutos de reação até 2,26; 2,43 e 2,45 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ nos tempos de 3 e 4 horas, para razões molares 1:1; 5:1 e 10:1, respectivamente (Figura 2 A).

Quando é usado 15% de enzima (Figura 2 B) altas conversões (98%) são alcançadas em tempos curtos (30 minutos) de reação. Depois de 1 hora de reação não foi observada a correlação entre concentração de enzima e a conversão (%) chegando ao rendimento máximo de quase 100% usando 5 a 15% de enzima. As velocidades específicas para 10 e 15% de enzima apresentaram comportamento semelhante. Em relação a temperatura (Figura 2 C), a conversão máxima (~94%) foi obtida a temperatura mais elevada (70°C) depois de 1 hora de reação. As velocidades específicas para 40 e 70°C apresentaram comportamento semelhante.

CONCLUSÕES

A concentração de enzima, temperatura de reação e a razão molar dos substratos mostraram serem parâmetros importantes e devem ser avaliados para obtenção de um processo otimizado na produção de ésteres. A produção de butanoato de geranila foi maximizada (94% em 2 horas) a 70°C, razão molar 5:1 (geraniol: ácido butanóico) e concentração da enzima de 10% (m/m substrato). Através do estudo da cinética reacional foi possível reduzir o tempo para 1 hora mantendo a conversão acima de 90%, com temperatura de 40°C, razão molar (álcool: ácido) 3:1 e concentração de enzima 5%.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akacha NB, Gargouri M. 2015. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food Bioprod Process* 94: 675-706.
- 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.
- Chang SW, Shaw JF, Yang CK, Shieh CJ. 2007. Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. *Process Biochem* 42: 1362-1366.
- Nyari NLD. 2013. Estudo da Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B em Poliuretano. Dissertação (Engenharia de Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI, Erechim, RS.
- Paroul N, Grzegozeski PL, Chiaradia V, Treichel H, Cansian RL, Oliveira JV, Oliveira D. 2010. Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solventfree system. *J Chem Technol Biotechnol* 85: 1636-1641.
- Richetti A, Leite SGF, Antunes OAC, de Souza ALF, Lerin L, Treichel H, Oestreicher EG, Oliveira D. Optimization of 2-ethylhexyl palmitate production using Lipozyme RM IM as catalyst in a solvent-free system. *Appl Biochem Biotechnol* 160(8): 2498-2508.
- 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.