

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Efeito da Estrutura dos Álcoois na Produção Enzimática de Ésteres de Origem Natural

Adriana Biasi Vanin¹, Bruna Maria Saorin Putom², Rogério Luiz Cansian², Natalia Paroul²,
Débora de Oliveira³

¹Universidade do Oeste de Santa Catarina – Área das Ciências Exatas e Tecnológicas - Rua Getúlio Vargas, 2125 - Bairro Flor da Serra, 89600-000 Joaçaba – SC – Brasil. E-mail: adriana.vanin@unoesc.edu.br

²Departamento de Ciências Exatas e da Terra - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621- 99700000 – Erechim – RS – Brasil.

³ Universidade Federal de Santa Catarina - Departamento de Química e de Engenharia de Alimentos - Campus Reitor João David Ferreira Lima, Florianópolis – SC – Brasil.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo maximizar a produção de eugenil acetato e acetato de linalina via esterificação enzimática do óleo essencial do cravo-da-índia e de linalol utilizando a lipase imobilizada Novozym 435 como catalisador. A melhor condição reacional com conversão ~100% em eugenil acetato foi obtida na temperatura de 60 °C, com excesso de anidrido acético (razão molar 1:5) e concentração de enzima 10% (m/m substratos). Maiores produções de linalil acetato utilizando linalol foram alcançadas após 48 horas de reação com concentração de enzima de 5%, à 70°C e razão molar ácido:álcool de 1:1.

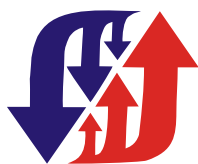
Palavras-chave: Eugenol, linalol, acetato de eugenila, acetato de linalol, esterificação.

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a produção de alimentos e fármacos está cada vez mais voltada para a qualidade do produto final e suas implicações no meio ambiente, ao encontro do conceito de sustentabilidade e respeito aos recursos naturais e que sejam benéficos à saúde. Neste contexto, a biotecnologia tem contribuído para o desenvolvimento de pesquisas sobre produção de aromas, estimulando as indústrias à utilização de enzimas ou microrganismos para a produção destes compostos (BERGER, 2009).

Os processos biotecnológicos são capazes de gerar sistemas complexos, com muitos dos compostos necessários para a caracterização dos aromas, o que muitas vezes, na produção por via sintética não é alcançado ou se mostra economicamente inviável (Berger, 2009). Os produtos gerados a partir de fontes naturais via catálise enzimática ou via biotransformação são considerados naturais, o que proporciona grande aceitação no mercado. Por possuírem diferentes substâncias bioativas com ação antibacteriana, antifúngica, antioxidante, analgésica e antiinflamatória, entre outras, os óleos essenciais são substâncias muito estudadas em vários ramos da ciência, sendo a indústria de alimentos uma das mais beneficiadas (Burt, 2004).

Assim, o objetivo central desse trabalho é desenvolver uma tecnologia limpa de síntese enzimática de aromatizantes naturais usando a lipase comercial Novozym 435 como biocatalisador e, com o intuito de comparar o efeito da estrutura dos álcoois na produção de ésteres aromáticos, foi utilizado como substratos para a reação enzimática, o óleo essencial da espécie *Eugenia caryophyllata* Thumb e o linalol.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção enzimática dos ésteres

A mistura reacional foi formada por óleo essencial do cravo-da-índia/linalol, anidrido acético, enzima e as peneiras moleculares em quantidades pré-estabelecidas no planejamento experimental e adicionadas em erlenmeyers de 50 mL com volume reacional de 5 mL. Todos os experimentos foram realizados em *shaker* com agitação constante de 150rpm e tempo da reação fixado em 6 horas. Após o término de reação o biocatalisador foi separado dos substratos por meio de filtração com papel filtro e a reação quantificada por cromatografia gasosa.

2.2 Determinação da quantificação da reação por cromatografia gasosa

A quantificação dos ésteres foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de sílica fundida modelo WAX (30m x 250µm d.i.), 0,25µm de espessura de filme, detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40-180°C (3°C/min), 180-230°C (20°C/min), 230°C (20min), temperatura do injetor 250°C, detector a 275°C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste H₂ (56KPa), volume injetado 0,4µL de amostra diluída em n-hexano (1:10). A determinação da conversão para a produção de eugenil acetato foi realizada acompanhando a redução da área do sinal do agente limitante (eugenol).

2.3. Otimização da Produção Enzimática dos Ésteres

Para determinação das condições experimentais que maximizassem a síntese dos ésteres, foi realizado dois delineamentos composto central completos 2³ com triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. As faixas de temperatura (T), razão molar (RM) e concentração de enzima [E] (m/m substratos) avaliadas são apresentadas na Tabela 1.

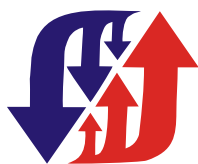
As variáveis apresentadas na Tabela 1 para o linalol são resultados de um primeiro delineamento onde a temperatura (30, 50 e 70°C) e a razão molar (1:1, 2:1 e 3:1) apresentaram influencia significativa positiva. Apesar de a concentração de enzima (1, 5,5 e 10%) não ter apresentado efeito significativo positivo ela também foi mantida e deslocado seus níveis, buscando aumentar a conversão em linalil ésteres.

Tabela 1 - Variáveis e níveis estudados no delineamento composto central completo 2³ para produção enzimática dos ésteres.

Variáveis/Níveis	Temperatura (°C)		Razão Molar (mol/mol) (anidrido/álcool)		[E] (% m/m substratos)	
	Eugenol	Linalol	Eugenol	Linalol	Eugenol	Linalol
-1	40	50	1:1	3:1	1	5
0	50	60	3:1	6:1	5,5	10
1	60	70	5:1	9:1	10	15

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 2 está apresentada a matriz do planejamento experimental 2³ completo com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as conversões em termos de eugenil acetato e linalil acetato.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 2- Matriz do delineamento composto central 2^3 (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em eugenil acetato e linalil acetato

Ensaio	Temperatura (°C)		Razão molar anidrido/álcool		[] Enzima (%m/m)		Conversão (%) Acetatos	
	Eugenol	Linalol	Eugenol	Linalol	Eugenol	Linalol	Eugenil	Linalil
1	-1 (40)	-1 (50)	-1 (1:1)	-1 (3:1)	-1 (1%)	-1 (5%)	59,16	0,6
2	1 (60)	1 (70)	-1 (1:1)	-1 (3:1)	-1 (1%)	-1 (5%)	86,81	3,38
3	-1 (40)	-1 (50)	1 (5:1)	-1 (3:1)	-1 (1%)	1 (15%)	89,99	0,63
4	1 (60)	1 (70)	1 (5:1)	-1 (3:1)	-1 (1%)	1 (15%)	93,87	3,55
5	-1 (40)	-1 (50)	-1 (1:1)	1 (9:1)	1 (10%)	-1 (5%)	44,73	0,5
6	1 (60)	1 (70)	-1 (1:1)	1 (9:1)	1 (10%)	-1 (5%)	82,30	5,44
7	-1 (40)	-1 (50)	1 (5:1)	1 (9:1)	1 (10%)	1 (15%)	90,47	0,91
8	1 (60)	1 (70)	1 (5:1)	1 (9:1)	1 (10%)	1 (15%)	99,87	0,65
9	0 (50)	0 (60)	0 (3:1)	0 (6:1)	0 (5,5%)	0 (10%)	96,98	1,16
10	0 (50)	0 (60)	0 (3:1)	0 (6:1)	0 (5,5%)	0 (10%)	96,96	0,96
11	0 (50)	0 (60)	0 (3:1)	0 (6:1)	0 (5,5%)	0 (5,5%)	97,41	0,93

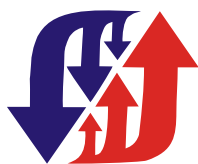
Em relação ao eugenil acetato, pode ser observado a partir desta tabela que altas conversões de foram obtidas em todos os níveis estudados, em diferentes concentrações de enzima, razão molar e temperatura. Analisando as respostas de conversão no ponto central (ensaios 9,10 e 11), verificou-se a boa reprodutibilidade dos experimentos. Maior taxa de conversão (~100%) foi obtida com temperatura 60°C, excesso de anidrido acético e concentração de enzima 10% (ensaio 8). Os resultados de conversão em eugenil acetato apresentados na Tabela 2 foram tratados estatisticamente.

Observou-se que em 6 horas de reação a razão molar e a temperatura apresentaram efeito significativo positivo, portanto, maiores conversões são obtidas em altas temperaturas e em excesso de anidrido acético enquanto que a concentração de enzima apresentou efeito significativo negativo ($p < 0,05$) na conversão. Este fato indica que para manter altas taxas de produção, a síntese enzimática pode ser conduzida com menores concentrações de catalisador, significando economia durante o processo.

No trabalho realizado por Chiaradia *et al.* (2012) onde a conversão de eugenol através da catálise enzimática utilizando lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* como catalisador e anidrido acético como agente acilante foi investigada, a melhor conversão foi de 99% usando razão molar anidrido/eugenol de 3:1, concentração de enzima 5,5% (m/m substratos) e temperatura de 50 °C em 6 horas de reação.

Após o tratamento dos dados obtidos em termos de linalil acetato observou-se que somente a temperatura apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,05$) na conversão. Com base nestes resultados, buscando aumentar a conversão do processo, construiu-se um terceiro delineamento composto central 2^2 completo. Tendo em vista o custo do catalisador no processo como um todo, a concentração de enzima foi diminuída para 1%. A razão molar anidrido/álcool também foi mantida constante (1:1).

Ainda em relação ao linalil acetato, pode ser observado que baixas conversões foram encontradas em todos os níveis estudados, em diferentes concentrações de enzima, razão molar e temperatura. Castro *et al.* (1997) estudou a síntese de ésteres terpenóides via catálise enzimática e, avaliando a influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

terpênico encontrou graus de esterificação maiores que 95% somente para álcoois primários como citronelol, geraniol e nerol.

Na Tabela 3 está apresentada a matriz do terceiro delineamento composto central 2^2 completo com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as conversões em linalil acetato. Os resultados de conversão em linalil acetato foram tratados estatisticamente, o modelo foi validado permitindo assim a construção da superfície de resposta (Figura 1).

Tabela 3 - Matriz do delineamento composto central 2^2 (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em linalil acetato

Ensaio	Temperatura (°C)	[]Enzima (%m/m)	Conversão (%)
1	-1 (50°C)	-1 (1%)	0,8
2	1 (70°C)	-1 (1%)	0,07
3	-1 (50°C)	1 (5%)	0,59
4	1 (70°C)	1 (5%)	3,81
5	0 (60°C)	0 (3%)	1,24
6	0 (60°C)	0 (3%)	1,28
7	0 (60°C)	0 (3%)	1,75

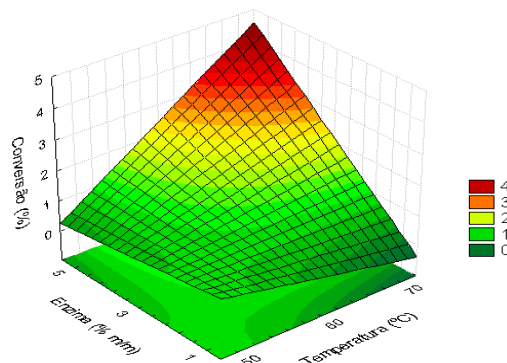


Figura 1- Superfície de resposta ilustrando o efeito da temperatura e da concentração de enzima na produção de linalil ésteres

Observou-se ainda que em 6 horas de reação a temperatura apresentou efeito significativo positivo, o que representa que maiores faixas de temperatura (70°C) conduziram maiores conversões em ésteres e, temperaturas superiores a 70 °C poderiam causar perda da atividade enzimática.

4. CONCLUSÕES

Maiores produções de linalil acetato foram obtidas com concentração de enzima de 5%, à 70°C e razão molar ácido:álcool de 1:1. Catalisadores enzimáticos somente apresentam altos graus de esterificação somente para álcoois primários como citronelol, geraniol e nerol. Sendo que, o grau de esterificação do catalisador é influenciado pelo tamanho da cadeia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERGER, R.G. Biotechnology of flavours – the next generation. **Biotechnology letters**, v.31, p.1751-1659, 2009.
- BURT, S.A. Essential Oils: their antibacterial properties and applications in foods – A Review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.
- CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. A. F. Síntese de ésteres terpenóides por via enzimática: Influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17 (3), p. 1997.
- CHIARADIA, V.; PAROUL, N.; CANSIAN, R. L.; JÚNIOR, C. V.; DETOFOL, M. R.; LERIN, L. A.; OLIVEIRA, J. VLADIMIR.; OLIVEIRA, D. Synthesis of Eugenol Esters by Lipase-Catalyzed Reaction in Solvent-Free System. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 742-751, 2012.