

## SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ACETATO DE ISOAMILA EMPREGANDO LIPASE B DE *Candida antarctica*

Nádia Ligianara Dewes Nyari (Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões–URI) nadialigianara@hotmail.com  
Alessandro R. Paulazzi (Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI)  
Raquel V. Zamadei (Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI)  
Jamile Zeni (Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI)  
Rogério M. Dallago (Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI)

**Resumo:** Embora o processo biotecnológico ainda seja mais caro que a síntese química, possui vantagens ambientais, ao utilizar enzimas em substituição aos ácidos inorgânicos geralmente aplicados como catalisadores nas sínteses químicas, minimizando a geração de resíduos da reação. Nesse sentido, observa-se que ésteres produzidos por síntese enzimática utilizando lipases muitas vezes apresentam aroma e odor característicos mais semelhantes ao natural quando comparados aos produzidos por vias convencionais. Nesse sentido o objetivo é demonstrar a habilidade da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) liofilizada na síntese de ésteres de acetato de isoamila, através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com resposta em termos de atividade enzimática de esterificação (u/g) e de conversão (%). As variáveis estudadas foram razão molar do ácido acético/ álcool isoamílico (1:4,18 a 1:9,82) em relação ao peso dos substratos (5 g) e a temperatura de reação (25,9 a 54,1 °C). A otimização na síntese de ésteres foi (temperatura de 40 °C, razão molar (1:4,18), com atividade de esterificação foi de 553,54 U/g e conversão de 57 % (razão molar 1:9,82 e temperatura de 40 °C) R<sup>2</sup> de 0,94. Finalmente pode-se concluir que há potencial de emprego de lipases na síntese de ésteres de aroma.

**Palavras-chave:** Metodologia de superfície de resposta, Lipase B, *Candida antarctica*, Ésteres de Aroma, Acetato de isoamila.

## ISOAMYL ACETATE ENZYMATIC SYNTHESIS USING LIPASE OF *Candida antarctica* B

**Abstract:** Although the biotechnological process is still more expensive than chemical synthesis, has environmental benefits by using enzymes to replace the inorganic acids usually applied as catalysts in chemical syntheses, minimizing waste generation reaction. In this regard, it is noted that esters produced by enzymatic synthesis using lipases often have flavor and odor characteristic more similar to natural compared to those produced by conventional routes. Accordingly the objective is to demonstrate the lipase skill B from *Candida antarctica* (CALB) lyophilized in the synthesis of isoamyl acetate esters, using a central composite design Rotational (CCRD), with a response in terms of enzymatic activity of esterification (u / g) and conversion (%). The variables studied were molar ratio of acetic acid / isoamyl alcohol (w / v) (1:4,18 1:9,82) in relation to the weight of the substrates (5 g) and the reaction temperature (25,9 to 54,1 °C). The optimization in the synthesis of esters was (40 °C, molar ratio (1:4,18) to esterification activity was 553,54 U / g 57% conversion (molar ratio 1:9,82 e 40 °C) R<sup>2</sup> of 0,94. Finally it can be concluded that there lipase job potential in the synthesis of flavor esters.

**Keywords:** Response Surface Methodology, Lipase B, *Candida antarctica*, Aroma Esters, Isoamyl Acetate.

### 1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial para compostos de aroma está avaliado em US\$ 3 bilhões, um montante que representa aproximadamente um quarto do valor total do mercado de aditivos alimentares (VULFSON, 1993).

Devido à complexidade de muitos aromas naturais, tanto em relação à composição como estrutura química individual, a aplicação de métodos biotecnológicos, particularmente enzimáticos, na produção destes produtos tem atraído muita atenção desde a última década. Adicionalmente, aromas produzidos biotecnologicamente podem ser caracterizados como "naturais" ou "idênticos ao natural" e, portanto são preferidos pelo mercado consumidor (LAROQUE, 2014).

A presença de aromas adiciona valor ao produto, o que significa que o custo da biocatálise passa a ser menos significativo. Durante os últimos 10-15 anos processos biotecnológicos têm-se estabelecido nas indústrias de aroma para produção de aromatizantes naturais (AN INDUSTRIAL RESEARCH PERSPECTIVE, 1986, GATFIELD, 1999).

Ésteres de ácidos carboxílicos são componentes importantes de aromas naturais usados na indústria alimentícia que contribuem na formação e acentuação dos aromas em alimentos. Podem-se citar como exemplos os ésteres de acetato de isoamila que são encontrados nos aromas de banana.

Dentre os ésteres de ácidos graxos, os de baixo peso molecular representam uma importante classe de aromas. Muitos deles são responsáveis por odores de frutas e fragrâncias dos alimentos que são constituídos principalmente por ácidos e seus derivados de cadeia curta como acetatos, propionatos e butiratos. Os ésteres de acetato de isoamila (aroma de banana) desempenham um papel importante na indústria farmacêutica, perfumes, polímeros, cosméticos, flavorizantes e estão presentes na indústria de alimentos, onde conferem aromas e sabores característicos. Normalmente, são usados como aditivos para realçar o aroma de uma bebida ou de um alimento (OLIVEIRA et al., 2013)

São conhecidos muitos ésteres componentes de aromas naturais que têm sido obtidos de fonte natural ou por métodos tradicionais de síntese química, todos resultando em produtos com o preço final muito alto devido ao grau de pureza e estereoespecificidade requeridos. Quando estes ésteres são produzidos por síntese química, não podem ser considerados aromas naturais, sendo portanto, menos valorizados no mercado que outros ésteres obtidos de fontes naturais.

Contudo, quando são produzidos ésteres por via biotecnológica, estes podem ser considerados naturais (MACEDO e PASTORE, 1997; LAROQUE, 2014). O principal objetivo deste trabalho é demonstrar a habilidade da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) liofilizada na síntese de ésteres de acetato de isoamila.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

A enzima utilizada nesta pesquisa foi a lipase B de *Candida antarctica* B (Novozyme NZL-102), adquirida na forma liofilizada da empresa Novozymes Latin América Ltda. Os solventes utilizados foram Acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), PM (58,08 g.mol<sup>-1</sup>) FMaia; Acido Acético (ou ácido etanoico), ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ), PM (60,04 g mol<sup>-1</sup>) Vetec; Álcool Etílico (Etanol 95 %) ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) PM (46,07 g.mol<sup>-1</sup>) Merck; Álcool Isoamílico ( $(\text{CH}_3)_2\text{CH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ ) PM (88,17 g.mol<sup>-1</sup>) Quimex e Hidróxido de Sódio (NaOH) PM (40,0 g.mol<sup>-1</sup>).

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Metodologia

##### *Avaliação do Tempo de Reação*

A fim de determinar qual o melhor tempo de reação para a síntese de ésteres de acetato de isoamila, de acordo com o ponto central do DCCR 2<sup>2</sup> completo, visando à otimização do processo, e todos os experimentos foram realizados em triplicata e com um branco de reação (solvente sem adição da enzima).

A síntese de ésteres de acetato de isoamila foi realizada em função do tempo de reação (0 a 360 min) em meio reacional composto por razão molar em relação ao peso dos substratos

do ácido acético/álcool isoamílico (1:7) (5 g) e massa de enzima (lipase CALB) (0,5 g), temperatura de 40 °C e agitação mecânica de 160 rpm.

### *Otimização do Processo de Síntese de Ésteres*

Inicialmente se diluiu a enzima CALB (Novozyme NZL-102) liofilizada na proporção (0,8 g em 5 mL de água destilada) em seguida através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), 2<sup>2</sup> completo foi realizada a otimização da síntese de ésteres de acetato de isoamila (totalizando 11 ensaios com triplicata no ponto central), tendo como resposta em termos de atividade enzimática de esterificação (U/g) e de conversão (%).

As variáveis estudadas foram razão molar do ácido acético/ álcool isoamílico (1:4,18 a 1:9,82) em relação ao peso dos substratos (5 g) e a temperatura de reação (25,9 a 54,1 °C), fixando a concentração de enzima em 5 % (0,5 g), agitação mecânica em 160 rpm e o tempo de reação de 60 min (dados pré-estabelecidos), segundo metodologia de Ferraz (2014). Todos os ensaios do planejamento foram realizados em triplicata, utilizando um branco de reação (substrato sem enzima) para todos os experimentos.

## 2.2 Determinações Analíticas

### *Determinação da Atividade Enzimática*

As medidas de atividade de esterificação, foram realizadas por titulometria (NaOH 0,05 M) onde alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionado a cada alíquota 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada utilizando a Equação (1).

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \times M_{EL} \times V_c} \quad (1)$$

Onde: AE = atividade de esterificação (U/g); Va = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL); Vb = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL); M = molaridade da solução de NaOH; Vf = volume final de meio reacional (mL); t = tempo (min); MEL = peso da enzima livre (solução enzimática)/imobilizada; Vc = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

### *Determinação da Conversão*

A Determinação de conversão da reação foi realizada pelo cálculo da diferença entre a atividade enzimática de esterificação inicial (original) e a final (após a reação) a acidez da solução a Equação 2. Utilizando para comprovar os resultados obtidos por cromatografia gasosa (GC).

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

Onde: Co = indica o índice de acidez inicial e C = indica a acidez após a reação final.

## 2.3 Análise Estatística

A análise de variância seguida pelo teste de Tukey foi aplicada para a análise estatística dos dados obtidos. Os dados foram tratados com o auxílio do programa software Statistica ® 8.0

(Statsoft Inc) foi usado para auxiliar o design e a estatística análise de informação experimental, adotando em todos os casos estudados um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### *Avaliação do Tempo de Reação*

Os resultados obtidos através do estudo do tempo de reação (0 a 360 min) para a produção de acetato de isoamila, através do ponto central do DCCR 2<sup>2</sup> completo (Tabela 1). Podemos observar que a CALB após 40 min de reação, apresentaram atividade enzimática de esterificação de 826,43 U/g e 360 min para uma conversão de 58,99 %, observando que aumentando o tempo de contato, maior é a conversão do ester, sendo assim o tempo de reação é diretamente proporcional ao aumento da conversão.

#### *Otimização do Processo de Síntese de Ésteres*

De acordo com a Tabela 1 a maior atividade de esterificação foi de 553,54 U/g (Ensaio 5) (temperatura de 40 °C, razão molar (ácido/álcool (1:4,18) 5 g do peso dos substratos) e 60 min de reação), enquanto a conversão de acetato de isoamila foi de 57 % (Ensaio 6) (razão molar (ácido/álcool (1:9,82) 5 g do peso dos substratos e temperatura de 40 °C) em 40 min de reação).

Através dos resultados podemos ressaltar que concentrações do substrato (menor quantidade de álcool), maior foram à atividade de esterificação, independentemente da temperatura. A Tabela 2 apresenta os fatores não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância – ANOVA, onde as variáveis estudadas (razão molar (ácido/álcool) e temperatura (°C)), obtiveram influência positiva ( $p < 0,05$ ), verificando-se que as o efeito foi significativo positivo a nível de 95 % de confiança.

**Tabela 1.** Matriz do DCCR completo 2<sup>2</sup> (valores codificados reais) em função das variáveis estudadas (razão molar dos substratos X<sub>1</sub> e temperatura (°C) X<sub>2</sub> para a síntese de éster de acetato de isoamila).

Ensaio	Razão Molar (Ácido/Álcool)	Temperatura (°C)	Atividade de Esterificação (U/g)	Conversão (%)
1	-1 (1:5)	-1 (30)	196,71 ± 233,09	12,71 ± 79,25
2	-1 (1:5)	1 (50)	284,38 ± 245,89	25,35 ± 58,98
3	1 (1:9)	-1 (30)	275,88 ± 209,11	24,08 ± 60,27
4	1 (1:9)	1 (50)	305,27 ± 198,55	59,95 ± 49,01
5	-1,41 (1:4,18)	0 (40)	553,54 ± 273,88	35,69 ± 65,71
6	1,41 (1:9,82)	0 (40)	505,66 ± 273,88	57,76 ± 46,33
7	0 (1:7)	-1,41 (25,9)	167,43 ± 206,12	9,60 ± 81,77
8	0 (1:7)	1,41 (54,1)	194,26 ± 191,77	57,15 ± 79,21
9	0 (1:7)	0 (40)	471,84 ± 193,09	51,11 ± 61,45
10	0 (1:7)	0 (40)	464,53 ± 205,44	53,05 ± 76,81
11	0 (1:7)	0 (40)	466,25 ± 201,80	52,61 ± 54,88

\*Variáveis fixas: Concentração da enzima (% em peso) de (5 %), agitação mecânica de 160 rpm e 40 min de reação.

**Tabela 2.** Análise de variância do DCCR completo  $2^2$  em função das variáveis estudadas para a síntese de ésteres de acetato de isoamila.

	Atividade de Enzimática (U/g)				Conversão (%)			
	SQ	GL	QM	Valor $F_{calc}$	SQ	GL	QM	Valor $F_{calc}$
<b>Regressão</b>	179419,10	5	35883,82	8,75	3369,82	5	673,96	12,29
<b>Resíduo</b>	20514,80	5	4102,96		274,10	5	54,82	
<b>Total</b>	29	2	14,60		3641,91	10		
<b>Erro Puro</b>	199905	10			2,00	2		

$F_{tab} = 4,10$ , Onde SQ = Soma Quadrados, GL = Graus de Liberdade e QM = Quadrado Médio

A Equação 1 apresenta o modelo codificado de segunda ordem com o coeficiente de correlação de  $R^2$  de 0,94 e  $F_{cal}$  2,13 vezes maior que o  $F_{tab}$  e a Equação 2 com  $R^2$  de 0,94 e  $F_{cal}$  3,0 vezes maior que o  $F_{tab}$ , em função das variáveis analisadas (razão molar (ácido/álcool e temperatura (°C)). Onde:  $X_1$  = razão molar dos substratos (ácido/álcool) e  $X_2$  = temperatura (°C).

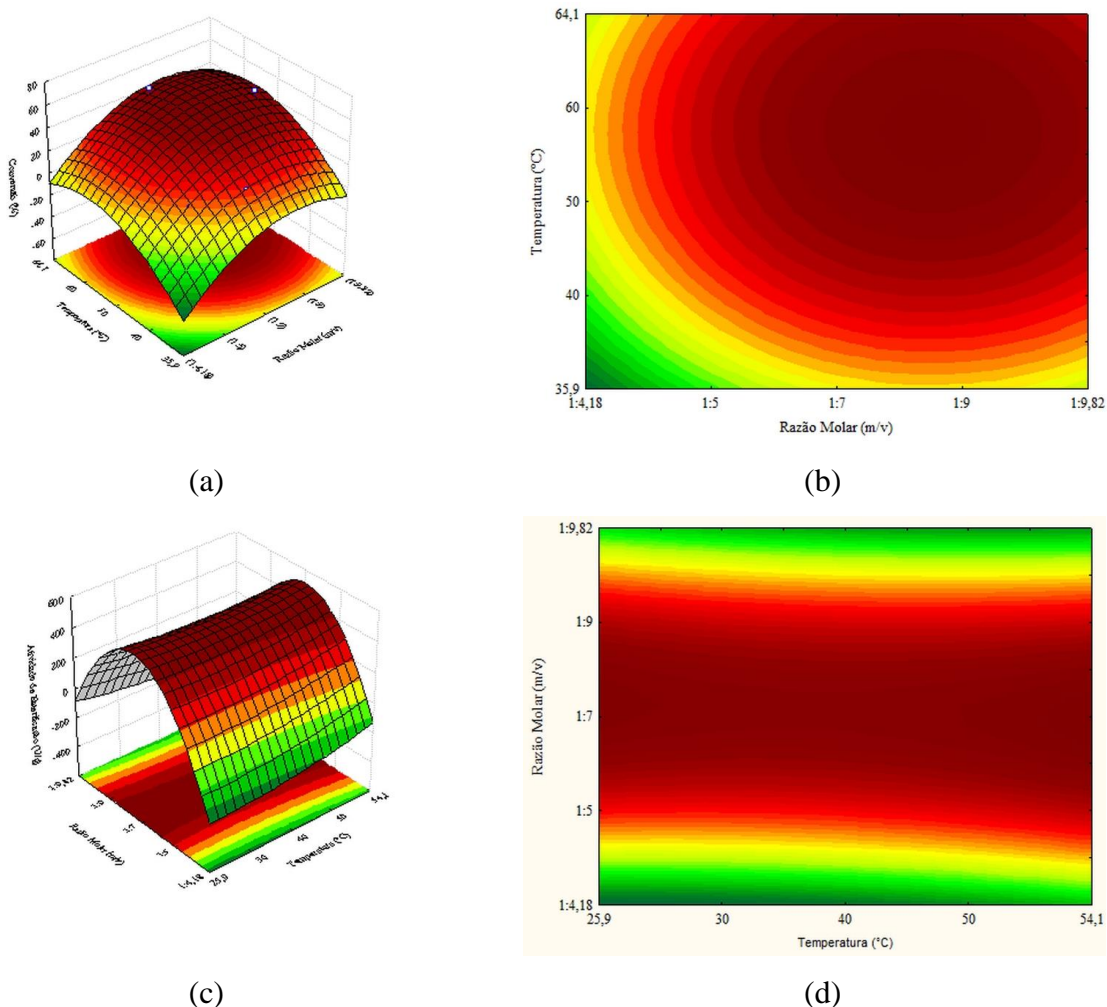
$$\text{Atividade de Enzimática (U/g)} = 467,89 + 6,21X_1 + 8,65X_1^2 + 17,286X_2 + 166,76X_2^2 - 14,569X_1X_2 \quad (1)$$

$$\text{Conversão (\%)} = 52,6486 + 9,9837X_1 - 5,3542X_1^2 + 14,1681X_2 - 12,0684X_2^2 + 5,8097X_1X_2 \quad (2)$$

Na Figura 1 estão representada a superfície de resposta e a curva de contorno com a resposta através da atividade de enzimática (U/g) (a) e de conversão (%) (b), respectivamente em função das variáveis estudadas (razão molar dos substratos (ácido/álcool) (g) e temperatura (°C)), para a de síntese de ésteres de acetato de isoamila.

Dados similares são reportados literatura, onde altas temperaturas proporcionaram maior conversão em éster, como é o caso de estudos realizados por LIU (2010) que para a síntese do laurato de laurila, que obtiveram temperatura ideal de 45 °C, VARMA e MADRAS (2010), para a síntese do propionato de isopropila, relataram a faixa de 50 a 55 °C. LAROQUE (2014) avaliou o efeito da temperatura (45, 55 e 65 °C) na conversão de acetato de eugenila, utilizando a razão molar (eugenol/anidrido acético (1:3)), teor de catalisador (0,2 g), observando que em temperaturas mais elevadas promovem o aumento no número de colisões entre catalisador e substrato, resultando em uma reação mais acelerada e consequentemente maior a conversão (%). Além disso, reduz a viscosidade da mistura e melhora o processo de difusão, favorecendo a interação entre as partículas do catalisador e substratos.

Um estudo semelhante conduzido por LERIN et al. (2011), a perda de atividade da enzima ao longo do tempo pode ser provocada pela desativação da enzima como uma consequência do efeito térmico e da concentração do produto. Segundo a literatura existem diversas condições experimentais para a síntese de produtos de interesse para a indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética.



**Figura 1.** Superfície de resposta e superfície de contorno, com a resposta através da atividade de esterificação (U/g) (a) e (b) e de conversão (%) (c) e (d), em função das variáveis estudadas (razão molar dos substratos (ácido/álcool) (g) e temperatura (°C)) para a síntese de ésteres de acetato de isoamila

No entanto, há constantes pesquisas para maximizar o rendimento do éster e a qualidade do produto final, alterando as condições da reação tais como tipo e a concentração de catalisador, razão molar dos reagentes, temperatura, tipo de reator, modo de operação, tempo de reação, além disso, os processos devem evitar ou reduzir os danos ambientais (LAROQUE, 2014).

#### 4. CONCLUSÕES

A utilização da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) liofilizada na síntese de ésteres de acetato de isoamila (aroma de banana), se mostrou viável por apresentar conversão de 57 % (razão molar 1:9,82 e temperatura de 40 °C) em 60 min de reação. Os resultados apresentados nesta pesquisa representam - se satisfatórios, já que a maioria dos relatos anteriores disponíveis na literatura apresentam conversões menores ou iguais, com concentrações de enzima superiores e períodos de reação muito mais longos. Sendo assim a importância não somente de novos aromas, mas sim de novas tecnologias para seu desenvolvimento e se enquadram no conceito de “química verde” apresentando grande potencial para aplicação em

processos industriais, principalmente na produção de cosméticos (cremes), farmacêuticas (xaropes) e de alimentos (gomas, balas e geleias).

## AGRADECIMENTOS

À URI Erechim pela estrutura física, e ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

An Industrial Research Perspective. Biotechnology and Flavor Development. *Food Technology*. p. 108. 1986.

FERRAZ, L. I. R., POSSEBOM, G., ALVEZ, E. V., CANSIAN, R. L., PAROUL, N., DE OLIVEIRA, D., TREICHEL, H., Application of home-made lipase in the production of geranyl propionate by esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. vol. 12, p. 123. 2014.

GATFIELD, I. L. Biotechnological production of natural flavor materials. *In Flavor Chemistry*. Springer US. p. 211. 1999.

LAROQUE, D. A. 2014. Óleo de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) como substrato para a síntese de acetato de eugenila via catálise heterogênea em sistema livre de solvente. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC.

LERIN, L.; CENI, G.; RICETTI, A.; KUBIAK, G.; OLIVEIRA, J. VLADIMIR; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E. G.; OLIVEIRA, D. Successive cycles of utilization of Novozym 435 in three different reaction systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. . v. 28, n. 02, p. 181-188, 2011.

LI, L. I. U. Progress in the Characteristics and Influencing Factors in Strong Aroma Style Flue-cured Tobacco. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*. vol. 18, p. 050. 2010.

MACEDO, G. A., PASTORE, G. M. Lipases biocatalysis in the production of flavor esters. *Food Science and Technology (Campinas)*. vol. 17, p. 115. 1997.

OLIVEIRA, C. A., SOUZA, A. C., SANTOS, A. P. B., SILVA, B. V., LACHTER, E. R., PINTO, A. C. Síntese de Ésteres de Aromas de Frutas: Um Experimento para Cursos de Graduação dentro de um dos Princípios da Química Verde. *Revista Virtual de Química*. vol 6, p. 152. 2013.

PAROUL, N., GRZEGOZESKI, L. P., CHIARADIA, V., TREICHEL, H., CANSIAN, R. L., OLIVEIRA, J. V., DE OLIVEIRA, D., Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. vol. 85, p. 1636. 2010.

VARMA, M. N., MADRAS, G. Kinetics of enzymatic synthesis of geranyl butyrate by transesterification in various supercritical fluids. *Biochemical Engineering Journal*. Vol 49, p. 250. 2010.

VULFSON, E. N. Enzymatic synthesis of food ingredients in low-water media. *Trends in Food Science & Technology*. vol. 4, p. 209. 1993.