



SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BUTIRATO DE GERANILA POR ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASE IMOBILIZADA EM RESINA HIDROFÓBICA

ENZYMATIC SYNTHESIS OF GERANYL BUTYRATE VIA ESTERIFICATION CATALYZED BY LIPASE IMMOBILIZED ON A HYDROPHOBIC SUPPORT

A. A. MENDES¹

¹Federal University of Alfenas, Institute of Chemistry, Alfenas/MG, Brazil, adriano.mendes@unifal-mg.edu.br

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2019-05-18
Accepted 2019-07-24
Available online 2019-08-20

palavras-chave

Butirato de geranila
Esterificação
Imobilização
Lipase
Reuso

keywords

Geranyl butyrate
Esterification
Immobilization
Lipase
Reusability tests

ABSTRACT

*The present study deals with the enzymatic synthesis of geranyl butyrate in a hexane medium using immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) on poly-styrene-divinylbenzene particles via physical adsorption as biocatalyst. In this study, the initial protein loading used to prepare active biocatalyst was 40 mg g⁻¹ of support. High immobilized protein concentration was observed (≈ 39 mg g⁻¹ of support). The hydrolytic activity of the prepared biocatalyst was of 437.4 ± 23.6 U g⁻¹ using olive oil emulsion as substrate. The influence of certain factors on the ester synthesis was evaluated. Maximum conversion around 85% after 3 h of reaction was observed using biocatalyst concentration of 10% m v⁻¹ of reaction mixture, 40 °C and 1 mol L⁻¹ of each reactant (geraniol and butyric acid). Under these experimental conditions, the prepared biocatalyst retained 65% of its initial activity after five successive cycles of reaction of 3 h each. The results show that poly-styrene-divinylbenzene may be an interesting support to prepare active biocatalysts to synthesize flavour ester via esterification reaction.*

RESUMO

*Neste estudo, um biocatalisador foi preparado por imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) em partículas hidrofóbicas de poli-estireno-divinilbenzeno e empregado na síntese de butirato de geranila por esterificação direta de geraniol e ácido butírico em meio de hexano. O biocatalisador foi preparado com carregamento inicial de proteína de 40 mg g⁻¹ de suporte e alta concentração de proteína imobilizada, da ordem de 39 mg g⁻¹ de suporte, foi observada. A atividade hidrolítica do biocatalisador preparado foi de $437,4 \pm 23,6$ U g⁻¹, empregando emulsão de azeite de oliva como substrato. O efeito de relevantes na síntese do éster foi determinado. As condições reacionais que maximizaram a síntese do éster foram concentração de biocatalisador de 10% m v⁻¹ de meio reacional, temperatura de 40°C e concentração de 1 mol L⁻¹ de cada reagente (geraniol e ácido butírico) que apresentou máxima conversão da ordem de 85% após 3 h de reação. Nestas condições experimentais, foi realizada a estabilidade operacional do biocatalisador e ele manteve 65% de sua atividade inicial após cinco sucessivos ciclos de reação. Estes resultados mostram que o suporte testado é bastante promissor na preparação de biocatalisadores ativos na síntese de ésteres de aroma por reação de esterificação.*

1. INTRODUÇÃO

Ésteres de aromas são importante compostos amplamente usados nas indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêutica. Estes compostos podem ser obtidos por processos fermentativos ou extraídos de produtos naturais. Entretanto, estas rotas não são atrativas em escala industrial porque apresentam baixa produtividade e alto custo. Além disso, elas exigem uma série de etapas de purificação, que muitas vezes são bastante onerosas (DHAKE *et al.*, 2013; AKACHA *et al.*, 2015; SÁ *et al.*, 2017). Na indústria química, as reações de síntese de ésteres de aromas por transesterificação ou esterificação direta de ácidos carboxílicos e álcoois de cadeia curta são geralmente catalisadas por compostos químicos tóxicos e corrosivos como ácido sulfúrico (YADAV e DHOOT, 2009; OZYILMAZ e GEZER, 2010). As desvantagens dos processos catalisados por ácidos fortes são longos tempos e altas temperaturas de reação (200-250°C), o que pode acarretar na decomposição da matéria-prima e, conseqüentemente, aumentar o volume de resíduos gerados nas etapas de separação e purificação (OZYILMAZ e GEZER, 2010; DHAKE *et al.*, 2013).

Neste sentido, a rota enzimática tem-se mostrado uma alternativa atrativa para a produção destes ésteres por se tratar de um processo com baixo consumo de energia e elevada produtividade (FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010; DHAKE *et al.*, 2013; ADLERCREUTZ, 2013; AKACHA *et al.*, 2015). Além disso, os ésteres produzidos por rota enzimática são considerados similares aos obtidos de fontes naturais (AKACHA *et al.*, 2015; SÁ *et al.*, 2017). Diferentes enzimas têm sido usadas como potenciais biocatalisadores na síntese de ésteres de aromas como esterase (TORRES *et al.*, 2009), cutinase (DE BARROS *et al.*, 2012), proteases (POORNIMA e PREETHA, 2017), e lipases (DHAKE *et al.*, 2013; AKACHA *et al.*, 2015, SÁ *et al.*, 2017). Dentre elas, as lipases são as enzimas mais empregadas devido à elevada atividade catalítica e estabilidade em meios orgânicos (ausência e presença de solventes) e ampla especificidade para diferentes substratos (DHAKE *et al.*, 2013; AKACHA *et al.*, 2015, SÁ *et al.*, 2017). Lipases (triacilglicerol éster acilhidrolases, EC 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster de acilgliceróis para liberar ácidos carboxílicos e glicerol. Estas enzimas também catalisam reações de esterificação, interestificação e transesterificação (acidólise e alcoólise) em ambientes com baixa concentração de água (FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010; ADLERCREUTZ, 2013).

Apesar das vantagens descritas, a aplicação industrial de lipases na forma livre (extratos enzimáticos em pó e em solução) em reações de síntese de ésteres não é atrativa devido à sua agregação por adsorção de moléculas polares produzidas no meio reacional como água que reduz o acesso de substratos hidrofóbicos aos seus sítios ativos, difícil recuperação e baixa atividade catalítica por influência de solventes orgânicos e temperatura de reação que podem distorcer suas estruturas ativas, conseqüentemente, levando à inativação (ADLERCREUTZ, 2013; AKACHA *et al.*, 2015). Para que a aplicação de lipases no setor industrial seja viável, faz-se necessária a obtenção de biocatalisadores heterogêneos estáveis nas condições de ensaio e com elevada retenção de

atividade catalítica (FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010; DHAKE *et al.*, 2013; ADLERCREUTZ, 2013).

Neste sentido, a imobilização de lipases em suportes sólidos é uma importante ferramenta para a estabilização, pois permite a sua reutilização e reduz a inativação por influência da temperatura, solventes orgânicos e substratos, tornando-a uma estratégia bastante atrativa para o setor industrial (ADLERCREUTZ, 2013; DHAKE *et al.*, 2013). Outra importante vantagem do processo de imobilização é a fácil purificação do produto de interesse ao final do processo, pois a enzima se encontra insolúvel no meio (ADLERCREUTZ, 2013). Lipases têm sido imobilizadas por diferentes protocolos como adsorção física em suportes hidrofóbicos e hidrofílicos, encapsulação em matrizes poliméricas e por ligação covalente em suportes previamente ativadas por agentes bifuncionais (FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010; ADLERCREUTZ, 2013). Entretanto, em reações conduzidas em meio orgânico não são requeridas fortes interações entre a enzima e o suporte (SECUNDO *et al.*, 2008; CORRADINI *et al.*, 2016). Nestas condições, a enzima é insolúvel no meio apolar e a adsorção física pode ser um método bastante vantajoso. Este método de imobilização é de baixo custo porque não é necessária a ativação do suporte e permite fácil reuso do suporte após vários ciclos (SECUNDO *et al.*, 2008).

A imobilização de lipases por adsorção física é normalmente realizada em suportes hidrofóbicos devido ao caráter hidrofóbico das lipases (ADLERCREUTZ, 2013; MANOEL *et al.*, 2015; CORRADINI *et al.*, 2016, 2017). Estas enzimas são imobilizadas por interação reversível da zona hidrofóbica da “tampa” que cobre seus sítios ativos e da área hidrofóbica próxima aos seus sítios ativos com a superfície dos suportes (mecanismo de ativação interfacial). Eles reconhecem estes suportes como semelhantes aos seus substratos naturais (gotas de óleo) (MANOEL *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2016, 2017; CORRADINI *et al.*, 2016, 2017). Este protocolo de imobilização promove a hiperativação, a purificação (adsorção seletiva), e a estabilização de lipases em conformação aberta. Além disso, estes suportes podem ser reutilizados após a inativação da molécula de lipase por dessorção utilizando vários produtos químicos (detergentes, guanidina, etc.) (CABRERA *et al.*, 2009; MANOEL *et al.*, 2015).

Diferentes suportes hidrofóbicos têm sido aplicados na imobilização de lipases para posterior aplicação em reações de interesse industrial. Dentre eles, poli(estireno-divinilbenzeno) tem sido amplamente usado devido à fácil aquisição (obtido de diferentes companhias internacionais) e à sua elevada área superficial e aos diâmetros de poros que permitem imobilizar alta concentração de enzima. Além disso, elevada acessibilidade de substratos do meio de reação aos microambientes interno e externo dos biocatalisadores preparados tem sido observados em estudos anteriores (TODERO *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2016; 2017).

O objetivo do presente estudo consistiu na síntese enzimática de butirato de geranila, um éster com aroma frutado (maça) e floral (rosas) (FLAVOR AND EXTRACT MANUFACTURERS ASSOCIATION OF THE UNITED STATES, 2019), por esterificação direta de ácido butírico e geraniol em meio de solvente. O biocatalisador foi preparado por adsorção de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em

partículas de poli-estireno-divinilbenzeno via interações hidrofóbicas. A seleção desta enzima na preparação de biocatalisador ativo deve-se à sua elevada atividade catalítica e estabilidade na síntese de diferentes ésteres de aromas (TODERO *et al.*, 2015; CORRADINI *et al.*, 2016; 2017). É importante ressaltar que este é o primeiro estudo referente à aplicação deste biocatalisador na síntese deste éster de aroma.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A lipase é uma formulação líquida contendo 17 mg mL⁻¹ de proteína. Partículas hidrofóbicas de poli-estireno-divinilbenzeno foram adquiridas da empresa Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Ácido butírico e geraniol foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes (solventes orgânicos e sais) foram de grau analítico obtidos da Vetec Química e Synth (São Paulo, SP).

2.2 Imobilização da lipase via adsorção física

Inicialmente, 10 g do suporte foram incubados em solução de etanol (95% m m⁻¹) e mantidos em branda agitação mecânica (100 rpm) por 12 h a 25°C (ALVES *et al.*, 2017). Em seguida, o suporte foi filtrado e lavado exaustivamente com tampão fosfato de sódio pH 7,0 (5 mmol L⁻¹). O suporte tratado foi incubado em 190 mL de solução enzimática preparada em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (5 mmol L⁻¹) contendo 2,1 mg mL⁻¹ de proteína, que corresponde a 40 mg proteína por g de suporte (BASSI *et al.*, 2016). A suspensão foi mantida sob agitação (200 rpm) em banho termostatizado por 12 h a 25°C. O acompanhamento da imobilização foi realizado por determinação da concentração de proteína no sobrenadante inicial e final (equilíbrio), empregando o método de BRADFORD (1976). A atividade catalítica do biocatalisador preparado foi determinada na hidrólise da emulsão de azeite de oliva. Uma unidade de atividade (U) equivale a massa de biocatalisador necessária para produzir 1 μmol de ácidos graxos por minuto de reação em pH 8,0, 37°C e 200 rpm (ALVES *et al.*, 2017). Ao final, o biocatalisador preparado foi filtrado a vácuo, lavado exaustivamente com tampão fosfato de sódio pH 7,0 (5 mmol L⁻¹) e estocado a 4°C.

2.3 Procedimento geral de síntese de butirato de geranila

A síntese do éster empregando o biocatalisador preparado (lipase imobilizada) foi conduzida em reatores fechados, em regime batelada, com misturas adequadas de ácido butírico e geraniol (razão molar 1:1) em meio de hexano. As reações foram realizadas empregando 10 mL de meio reacional sob agitação (240 rpm) em um banho termostatizado (shaker orbital). O progresso da reação foi acompanhado pela retirada de alíquotas (0,1 mL) ao longo da reação para quantificação da concentração de ácido butírico residual por titulação com solução de NaOH 20 mmol L⁻¹. A conversão foi determinada de acordo com a Eq. 1 (LORENZONI *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2016; 2017).

$$\text{Conversão (\%)} = \left(\frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que: A_{inicial} e A_{final} é concentração de ácido butírico inicial e final no meio reacional (mmol L⁻¹).

2.4 Efeito de fatores na síntese do éster

Efeito da concentração de biocatalisador: Nestes testes, a concentração de biocatalisador empregada variou de 5 a 12,5% m v⁻¹ de meio. As reações foram realizadas empregando hexano como solvente a 40°C, agitação de 240 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 com concentração de cada reagente de 0,5 mol L⁻¹.

Efeito da concentração de reagentes: A concentração de cada reagente (ácido butírico e geraniol) variou de 0,5 a 2 moles L⁻¹ em meio de hexano. As reações foram realizadas empregando concentração de biocatalisador 10% m v⁻¹ de meio reacional (determinada no estudo anterior), 40°C, agitação de 240 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1.

Efeito da temperatura de reação: As reações foram realizadas no intervalo de 30–45°C, com incremento de 5°C, empregando concentração de biocatalisador 10% m v⁻¹ de meio reacional, agitação de 240 rpm e concentração de cada reagente de 1 mol L⁻¹ (determinada no estudo anterior).

2.5 Testes de reuso

Testes de reuso foram realizados após cinco bateladas consecutivas de esterificação nas condições experimentais que maximizam a síntese do éster. Ao final de cada batelada de 150 min cada (tempo necessário para atingir a máxima porcentagem de conversão), o biocatalisador heterogêneo preparado foi removido do meio reacional e lavado com hexano a frio para remover qualquer substrato ou o produto retido em seu microambiente e mantido sob vácuo por 60 min para a remoção de moléculas de água produzidas na reação. Em seguida, o biocatalisador foi adicionado em um novo substrato na qual foi estimada a porcentagem de conversão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Reações de esterificação catalisadas por lipases imobilizadas têm sido amplamente conduzidas na ausência e presença de solventes orgânicos (DHAKA *et al.*, 2013; FRIEDLICH *et al.*, 2013; AKACHA *et al.*, 2015, SÁ *et al.*, 2017; CORRADINI *et al.*, 2016; 2017). A aplicação destes solventes como meio de reação é bastante atrativa para reduzir os efeitos deletérios dos materiais de partida como ácidos carboxílicos e álcoois de baixa massa molecular nas estruturas de lipases como remoção de suas camadas de hidratação (CORRADINI *et al.*, 2016). Além disso, a aplicação de solventes orgânicos melhora a solubilidade dos materiais de partida no meio e reduz drasticamente a viscosidade no meio de reação, o que melhora a difusão dos materiais de partida ao microambiente do biocatalisador heterogêneo (CORRADINI *et al.*, 2016; 2017). Neste estudo, hexano foi empregado como meio de reação devido à alta estabilidade da lipase testada (LTL) neste solvente e à boa miscibilidade dos materiais de partida empregados neste estudo (geraniol e ácido butírico). Estudos anteriores reportam a aplicação de hexano como solvente para a síntese enzimática de diferentes ésteres de aroma como butirato de butila (LORENZONI *et al.*, 2012), acetato de n-propila (CORRADINI *et al.*, 2016a), e butirato de etila (FRIEDLICH *et al.*, 2013).

A síntese do éster de aroma foi conduzida em concentrações equimolares dos materiais de partida porque a adoção destes sistemas reacionais reduz drasticamente o número de etapas requeridas no processo de purificação do

éster, consequentemente reduzindo os gastos com a regeneração destes materiais de partida (ALVES *et al.*, 2016; 2017). A agitação empregada neste estudo (240 rpm) foi otimizada em estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa para a síntese enzimática de butirato de isoamila – aroma de banana (TODERO *et al.*, 2015), acetato de *n*-propila – aroma de pera (CORRADINI *et al.*, 2016), e valerato de etila – aroma de maçã verde (CORRADINI *et al.*, 2017) empregando LTL imobilizada em diferentes suportes hidrofóbicos. Nestas condições, excelente acessibilidade dos materiais de partida aos microambientes dos biocatalisadores foi observada, o que sugere que as reações foram cineticamente controladas.

As reações de esterificação são reversíveis e termodinamicamente controladas (NUIJENS *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2017). Conseqüentemente, elevados rendimentos podem ser obtidos pela remoção de um dos produtos formados (éster ou água) para o deslocamento do equilíbrio químico para a formação de produtos. Neste contexto, o borbulhamento de ar e o uso de pressões reduzidas (vácuo) e agentes desidratantes (peneiras moleculares e sais) têm sido amplamente empregadas com a finalidade de controlar a concentração de água no meio reacional (CUI *et al.*, 2016; FERRER *et al.*, 2005; SHI *et al.*, 2017). No presente estudo, a síntese do éster foi realizada em meio de solvente e o uso de agentes desidratantes como peneira molecular é mais adequado com o intuito de evitar a sua perda por evaporação (CUI *et al.*, 2016; FERRER *et al.*, 2005; NUIJENS *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2017). Entretanto, peneiras moleculares não foram utilizadas neste estudo porque seu uso é impraticável do ponto de vista industrial devido ao aumento do volume do reator e às severas limitações de transferência de massa devido à difícil agitação no sistema reacional (FERRER *et al.*, 2005).

O biocatalisador heterogêneo foi preparado empregando carregamento de 40 mg proteína g⁻¹ de suporte com o intuito de obter alta retenção de enzima e atividade catalítica. De acordo com os resultados obtidos, a capacidade de retenção de proteína foi da ordem de 39 mg g⁻¹ de suporte. Estes resultados são atribuídos à elevada área superficial (500 m² g⁻¹) e diâmetros de poros (250 Å) do suporte testado, conforme informações técnicas fornecidas pela Supelco Co. O diâmetro molecular de TLL (53,2 Å) é aproximadamente 5 vezes inferior ao do suporte (ALVES *et al.*, 2017). Conseqüentemente, LTL pode ser imobilizada nas superfícies externa e interna do suporte testado. A atividade hidrolítica do biocatalisador foi de 437,4 ± 23,6 U g⁻¹. Estes resultados são superiores àqueles obtidos por imobilização de diferentes lipases, inclusive LTL, via adsorção física em partículas de poli-metacrilato (BASSI *et al.*, 2016).

3.1. Efeito da concentração de biocatalisador na reação

O efeito da concentração do biocatalisador na esterificação foi avaliado no intervalo de 5 a 12,5% m v⁻¹ de meio reacional. Os valores de porcentagem de conversão em função do tempo de reação são mostrados na Figura 1. É possível notar que a conversão aumentou com o aumento da concentração de biocatalisador. Embora seja esperado um aumento da síntese em éster com o aumento da concentração de biocatalisador, reações de esterificação realizada com alta concentração do biocatalisador (10 e 12,5% m v⁻¹) atingiram similares valores percentuais de conversão após 60 min de reação da ordem de 87%. Estes resultados são atribuídos a uma

possível saturação dos sítios ativos da enzima imobilizada pelos reagentes. Além disso, elevada concentração de biocatalisador no meio reacional poderia aumentar a viscosidade no meio de reação que restringe o acesso de reagentes ao microambiente do biocatalisador heterogêneo preparado (TODERO *et al.*, 2015). Considerando o custo de produção e eficiência, a concentração de biocatalisador de 10% m v⁻¹ de meio reacional foi escolhido para avaliar o efeito da concentração de reagentes na síntese do éster.

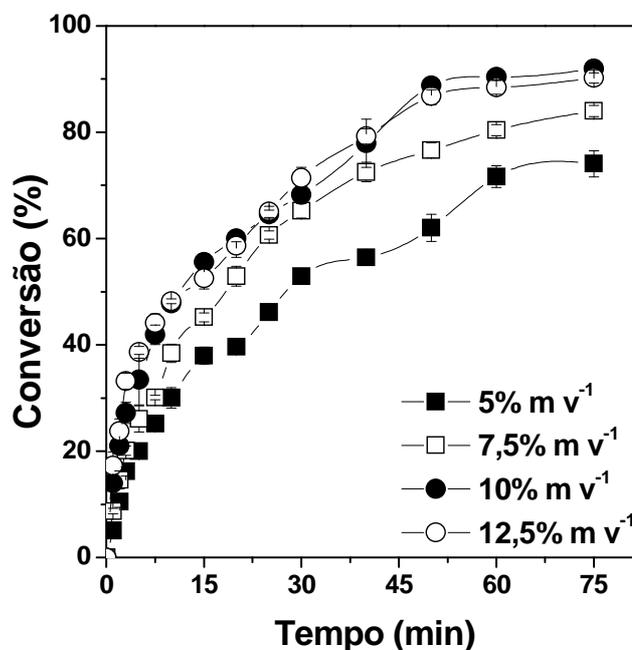


Figura 1 – Efeito da concentração de biocatalisador na síntese do éster. As reações foram conduzidas a 40°C, 240 rpm, razão molar ácido:álcool de 1:1 (0,5 mol L⁻¹ de cada reagente).

3.2 Efeito da concentração de reagentes na reação

O efeito da concentração de reagentes variando de 0,5 a 2 mol L⁻¹ de cada reagente na reação foi avaliado. De acordo com a Figura 2, a reação conduzida na menor concentração de reagentes apresentou a maior conversão no menor tempo possível de reação (90% após 75 min de reação). Entretanto, na concentração de 1 mol L⁻¹ foi também observada elevada conversão dos reagentes em éster, da ordem de 87%, após 150 min de reação. Entretanto, para as reações conduzidas com 1,5 e 2 mol L⁻¹ de cada reagente, as máximas conversões foram de 73% e 58,5% após 180 min de reação, respectivamente. Estes resultados podem ser devido ao aumento da viscosidade do meio de reação com o aumento da concentração dos reagentes que reduz a sua difusão microambiente externo e interno do biocatalisador preparado ou redução da atividade da enzima pelo aumento da remoção da camada de hidratação com o aumento da concentração de reagentes. Isto leva à uma maior rigidez da estrutura tridimensional da enzima (inativação da enzima). Similares resultados foram observados na síntese enzimática de acetato de *n*-propila e valerato de etila conduzidos em elevada concentração de reagentes (CORRADINI *et al.*, 2016; 2017). De acordo com estes resultados, a síntese do éster conduzida em 0,5 e 1 mol L⁻¹ tenha apresentado similar conversão, subsequentes estudos foram então conduzidos na concentração de 1 mol L⁻¹ de cada reagente.

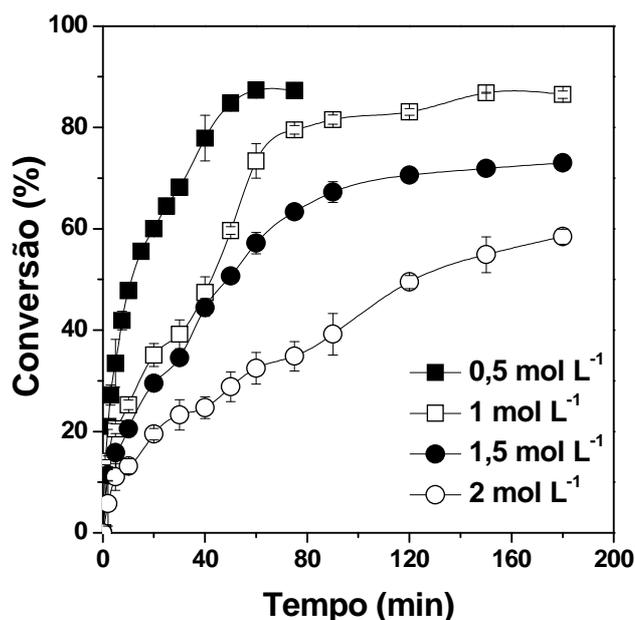


Figura 2 – Efeito da concentração de substrato na síntese do éster. As reações foram conduzidas com concentração de biocatalisador de 10% m v⁻¹ de meio, 40°C, 240 rpm, e razão molar ácido:álcool de 1:1.

3.3 Efeito da temperatura da reação na síntese do éster

Em geral, a velocidade de reação aumenta com a temperatura devido ao aumento da solubilidade dos reagentes no meio e à maior frequência de colisões entre as moléculas dos reagentes e biocatalisador (GUO e XU, 2006).

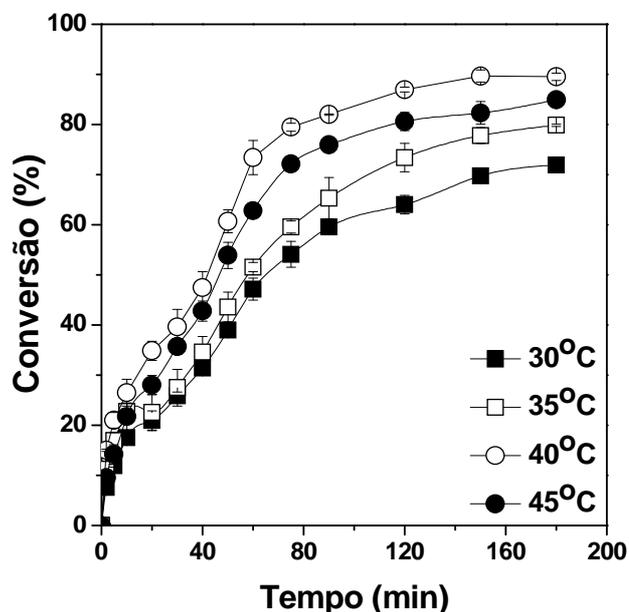


Figura 3 – Efeito da temperatura na síntese do éster. As reações foram conduzidas com concentração de biocatalisador de 10% m v⁻¹ de meio, 240 rpm, e 1 mol L⁻¹ de cada reagente (razão molar ácido:álcool de 1:1).

Por outro lado, a estabilidade de moléculas de enzimas tende a diminuir quando a temperatura aumenta devido à possível distorção de sua conformação ativa, acarretando na inativação da enzima (CORRADINI *et al.*, 2016, 2017). Neste estudo, o efeito da temperatura de reação foi avaliado no intervalo de 30 a 45 °C (Figura 3). Estes

resultados mostram o aumento da conversão com o aumento da temperatura de reação de 30 a 40 °C devido ao aumento do número de colisões entre as moléculas de reagentes e o biocatalisador, como esperado (ver Figura 3). Aumentando para 45 °C, não foi observado um incremento na conversão, mas uma ligeira redução da síntese de éster devido à possível inativação da enzima. Assim, temperatura de reação de 40 °C foi escolhida para testes de reuso do biocatalisador em sistema de bateladas sucessivas.

3.4. Testes de reuso do biocatalisador

A elevada capacidade de reutilização de lipases imobilizadas é muito importante para a sua aplicação em escala industrial. O reuso do biocatalisador selecionado foi avaliado em testes sucessivos de reação de esterificação nas condições experimentais previamente selecionadas (concentração equimolar de ácido butírico e geraniol de 1 mol L⁻¹ de cada reagente em meio de hexano, concentração de biocatalisador de 10% m v⁻¹ de meio reacional, 40°C, e 150 min de reação em câmara rotativa a 240 rpm). Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4.

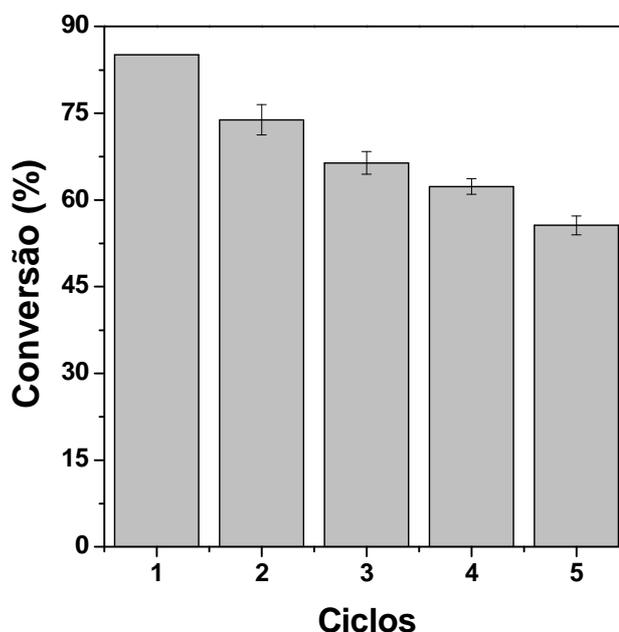


Figura 4 – Testes de reuso do biocatalisador preparado em sucessivos ciclos de reação. A síntese do éster foi realizada com concentração de biocatalisador de 10% m v⁻¹ de meio, 240 rpm, e 1 mol L⁻¹ de cada reagente (razão molar ácido:álcool de 1:1).

Após cinco ciclos de reação de 150 min cada, a conversão foi de 55,6%, o que equivale a 65% do valor obtido no 1º ciclo. Estes resultados mostram que o biocatalisador testado na síntese de éster realizada a 1 mol L⁻¹ de cada substrato apresentou uma melhor estabilidade do que aqueles biocatalisadores empregados utilizados em estudos anteriores para a síntese de ésteres de interesse industrial catalisada por diferentes biocatalisadores preparados por adsorção física em suportes hidrofóbicos.

3.5. Comparação com estudos anteriores

A síntese de butirato de geraniol por esterificação direta de ácido butírico e geraniol tem sido reportada em estudos anteriores reportados pela literatura especializada, conforme

descritos a seguir.

Em um estudo pioneiro realizado por IWAI *et al.* (1980), os autores reportaram a aplicação de lipases de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* na síntese do éster. Estas lipases foram empregadas em suas formas livres, previamente purificadas. Dentre os biocatalisadores testados, apenas *Geotrichum candidum* apresentou atividade catalítica – após 18 h de reação a 30°C, a conversão em éster foi de 40%.

Em um subsequente estudo, DAMNJANOVIC *et al.* (2012) produziram o éster empregando lipase de *Candida rugosa* (LCR) imobilizada por ligação covalente em suportes como epóxi-Sepabeads® (EC-EP), Sepabeads® EC-HA (um suporte com alta densidade de grupos amino) e Purolite® A-109. Neste estudo, a reação de esterificação foi conduzida em modo batelada (reator de tanque agitado) e contínuo (reator de leite fluidizado). Dentre os biocatalisadores testados, LCR imobilizada covalentemente em EC-EP foi selecionada devido à sua alta atividade catalítica em reação de hidrólise da emulsão de azeite de oliva. Os autores otimizaram a reação em modo batelada por delineamento experimental e máxima conversão de 99,9% foi observada após 48 h de reação entre 25 e 30°C, concentração de água de 3,6% ($v v^{-1}$) e razão molar ácido:álcool 2,5:1. Para a produção contínua, as condições ótimas de reação foram também determinadas – vazão de alimentação de 10 mL min^{-1} , 35°C, concentração de água de 2% ($v v^{-1}$), concentração do substrato na proporção de 100 mmol L^{-1} na razão molar ácido:álcool de 2:1 (conversão de 78,9% durante 10 h de reação).

O éster foi também sintetizado empregando lipase B de *Candida antarctica* expressa em *Pichia pastoris* (JIN *et al.*, 2015). Os autores empregaram células íntegras como biocatalisador heterogêneo. Neste estudo, a síntese do éster foi otimizada por delineamento experimental completo. Nas condições ótimas de reação (concentração de biocatalisador de 20,9 g L^{-1} , concentração de geraniol de 0,57 mol L^{-1} , razão molar ácido butírico/geraniol de 1,21:1 e atividade de água de 0,53), a conversão foi de 98,5 % após 9 h de reação em reator de tanque agitado.

Em um recente estudo, SBARDELOTTO *et al.* (2018) produziu este éster por reação de esterificação catalisada pelas lipase Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica disponível comercialmente pela empresa Novozymes S.A.) e Novozyme NZL-102-LYO-HQ (lipase B de *Candida antarctica* imobilizada por encapsulação em espuma de poliuretano). Os resultados mostram que em uma hora de reação, a conversão foi quase completa (entre 95 e 97%) para as duas enzimas sendo que a condição ótima para Novozym 435 foi razão molar (álcool: ácido) 3:1, concentração de enzima de 10% e temperatura de 25°C e para a enzima Cal B (PU) a melhor condição foi razão molar (3:1), concentração de enzima de 5% e 40°C.

Conforme pode ser observado nestes trabalhos reportados pela literatura especializada, o tempo necessário para atingir máxima conversão foi inferior ao obtido no presente estudo. Além disso, a concentração inicial de reagentes usada no presente trabalho foi relativamente superior. A síntese do éster. Testes de reuso em bateladas sequencias não foram conduzidos nos trabalhos reportados acima. Com base nos resultados obtidos aqui, verifica-se satisfatória estabilidade de LTL imobilizada no suporte

hidrofóbico empregado (poli-estireno-divinilbenzeno). Estes resultados confirmam a promissora aplicação do biocatalisador heterogêneo preparado para a síntese de éster de aroma por esterificação em meio de solvente.

4. CONCLUSÃO

A aplicação de poli-estireno-divinilbenzeno como suporte na imobilização de LTL foi bastante atrativa na preparação de um biocatalisador ativo. Elevada porcentagem de imobilização da enzima em função de suas propriedades físicas (elevada área superficial e diâmetro de poros). Nas condições experimentais selecionadas, a conversão máxima foi de 85% após 150 min de reação. Testes de reutilização em bateladas consecutivas mostraram que o biocatalisador selecionado reteve 65% de sua atividade inicial após cinco sucessivos ciclos de esterificação. Estes resultados demonstram que o biocatalisador preparado pode ser uma importante alternativa na síntese de compostos de grande interesse industrial como éster de aroma.

REFERENCES

- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6406-6436, 2013.
- AKACHA, N.B.; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioprocesses**, v. 94, p. 675-706, 2015.
- ALVES, M.D.; CREN, E.C.; MENDES, A.A. Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. S377-S387, 2017.
- ALVES, M.D.; ARACRI, F.M.; CREN, E.C.; MENDES, A.A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, v. 311, p. 1-12, 2017.
- BASSI, J.J.; TODERO, L.M.; LAGE, F.A.P.; KHEDY, G.I.; DELL DUCAS, J.; CUSTÓDIO, A.P.; PINTO, M.A.; MENDES, A.A. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 900-909, 2016.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J.M.; GUIBAN, J.M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 171-176, 2009.
- CORRADINI, M.C.C.; GOMES, R.A.B.; LUIZ, J.H.H.; MENDES, A.A. Optimization of enzymatic synthesis of n-propyl acetate (fruit flavor ester) – Effect of the support on the properties of biocatalysts. **Chemical Engineering Communications**, v. 203, p. 1432-1442,

- 2016.
- CORRADINI, M.C.C.; COSTA, B.M.; BRESSANI, A.P.P.; GARCIA, K.C.A.; PEREIRA, E.B.; MENDES, A.A. Improvement of the enzymatic synthesis of ethyl valerate by esterification reaction in a solvent system. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, p. 100-109, 2017.
- CUI, C.; ZHEN, Y.; QU, J.; CHEN, B.; TAN, T. Synthesis of biosafe isosorbide dicaprylate ester plasticizer by lipase in a solvent-free system and its sub-chronic toxicity in mice. **RSC Advances**, v. 6, p. 11959-11966, 2016.
- DAMNJANOVIC, J.J.; ZUZA, M.G.; SAVANOVIC, J.K.; BEZBRADICA, D.I.; MIJIN, D.Z.; BOSKOVIC-VRAGOLOVIC, N.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z.D. Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 50-59, 2012.
- DE BARROS, D.P.C.; AZEVEDO, A.M.; CABRAL, J.M.S.; FONSECA, L.P. Optimization of flavor esters synthesis by *Fusarium solani pisi* cutinase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, p. 275-284, 2012.
- DHAKE, K.P.; THAKARE, D.D.; BHANAGE, B.M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, p. 71-83, 2013.
- FERRER, M.; SOLIVERI, J.; PLOU, F.J.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; REYES-DUARTE, D.; CHRISTENSEN, M.; COPA-PATIÑO, J.L.; BALLESTEROS, A. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 391-398, 2005.
- FLAVOR AND EXTRACT MANUFACTURERS ASSOCIATION OF THE UNITED STATES (FEMA), 2019. Disponível em: <https://www.femaflavor.org/flavor-library/geranyl-butyrate>. Acessado em 18 de maio de 2019.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 197-212, 2010.
- FRIEDLICH, J.L.R.; PEÑA, F.P.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C. Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, p. 1089-1095, 2013.
- GUO, Z.; XU, X. Lipase-catalyzed glycerolysis of fats and oils in ionic liquids: a further study on the reaction system. **Green Chemistry**, v. 8, p. 54-62, 2006.
- IWAI, I.; OKUMURA, S.; TSUJISAKA, Y. Synthesis of terpene alcohol esters by lipase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, p. 2731-2732, 1980.
- JIN, Z.; NTWALI, J.; LIN, Y.; KUI, H.; ZHENG, S.; HAN, S. Geranyl butyrate production by *Candida antarctica* lipase B-displaying *Pichia pastoris*. In: Zhang T.C. and Nakajima M. (eds.). **Advances in Applied Biotechnology**. Springer-Verlag, Berlin, Cap. 39, 2015.
- LORENZONI, A.S.G.; GRAEBIN, N.G.; MARTINS, A.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C. Optimization of pineapple flavour synthesis by esterification catalysed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, p. 196-200, 2012.
- NUIJENS, T.; CUSAN, C.; SCHEPERS, A.C.H.M.; KRUIJTZER, J.A.W.; RIJKERS, D.T.S.; LISKAMP, R.M.J.; QUAEDFLIEG, P.J.L.M. Enzymatic synthesis of activated esters and their subsequent use in enzyme-based peptide synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 79-84, 2011.
- OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 140-145, 2010.
- POORNIMA, K.; PREETHA, R. Biosynthesis of food flavours and fragrances - A review. **Asian Journal of Chemistry**, v. 29, p. 2345-2352.
- SÁ, A.G.A.; DE MENEZES, A.C.; DE ARAÚJO, P.H.H.; DE OLIVEIRA, D. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 95-105, 2017.
- SBARDELLOTTO, C.R.; PIAZZA, S.P.; NYARI, N.L.D.; DALLAGO, R.M.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, V.; ZENI, J.; CANSIAN, R.L.; PAROUL, N. Optimization of solvent-free geranyl butanoate production using Novozyme 435 and homemade polyurethane immobilized Novozyme NZL-102-LYO-HQ as catalysts. **Química Nova**, v. 41, p. 905-911, 2018.
- SECUNDO, F.; MIEHÉ-BRENDELÉ, J.; CHERALU, C.; FERRANDI, E.E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, p. 350-361, 2008.
- SHI, Y.G.; WU, Y.; LU, X.Y.; REN, Y.P.; WANG, Q.; ZHANG, C.M.; YU, D.; WANG, H. Lipase-catalyzed esterification of ferulic acid with lauryl alcohol in ionic liquids and antibacterial properties in vitro against three food-related bacteria. **Food Chemistry**, v. 220, p. 249-256, 2017.
- TODERO, L.M.; BASSI, J.J.; LAGE, F.A.P.; CORRADINI, M.C.C.; BARBOZA, J.C.S.; HIRATA, D.B.; MENDES, A.A. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on polymethacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 1601-1613, 2015.
- TORRES, S.; BAIGORI, M.D.; SWATHY, S.L.; PANDEY, A.; CASTRO, G.R. Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. **Food Research International**, v. 42, p. 454-460, 2009.
- YADAV, G.D.; DHOOT, S.B. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 34-39, 2009.