SÍNTESE ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE ÉSTERES AROMÁTICOS VIA LIPASE-NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Rodolpho Ramilton de Castro Monteiro [1], Katerine da Silva Moreira [2], JosÉ Erick da Silva Souza [3], Thales GuimarÃes Rocha [4], JosÉ Cleiton Sousa dos Santos [5], Maria Cristiane Martins de Souza [6]

RESUMO

Enzimas são biocatalisadores que permitem a catálise natural de reações sob condições brandas de temperatura e pressão e são altamente seletivas. Objetivando aumentar a estabilidade enzimática e facilitar sua recuperação e reuso, as enzimas são imobilizadas em suportes magnéticos nanoestruturados. Nessa conjuntura, este estudo tem por objetivo analisar os parâmetros da esterificação catalisada pela lipase de *Candida antartica* do tipo B imobilizada em nanopartículas magnéticas, CALB-NPM, aplicada à produção de butirato de etila. A fim de determinar as condições ótimas para a síntese, um planejamento experimental do tipo CCD (Central Composite Design) de três variáveis (temperatura, tempo reacional e razão molar) foi realizado. A validação do ponto ótimo teórico (55°C, 240rpm, 200 minutos, 1:4 (álcool:ácido), 0,01g de CALB-NPM) à síntese foi feita experimentalmente, obtendo uma conversão de 73,8% (93,8% para a versão comercial do biocatalisador, Novozym® 435) . Sob ação das ondas ultrassônicas, obteve-se uma conversão de 91,3% . Por fim, a estabilidade operacional da CALB-NPM (6 ciclos consecutivos) e a energia de ativação foi determinada. O ponto ótimo à síntese do butirato de etila foi aplicado à síntese do butirato de metila, obtendo uma conversão de 48,9%.

Palavras-chave:

Ésteres Aromáticos. Lipase. Nanopartículas Magnéticas. Ultrassom. Planejamento Experimental.

[1] Unilab, IEDS, Discente, e-mail: rodolpho@aluno.unilab.edu.br
[2] Unilab, IEDS, Discente, e-mail: katerinegce@gmail.com
[3] Unilab, IEDS, Discente, e-mail: erick@aluno.unilab.edu.br
[4] Unilab, IEDS, Discente, e-mail: thales@aluno.unilab.edu.br
[5] Unilab, IEDS, Docente, e-mail: jcs@unilab.edu.br
[6] Unilab, IEDS, Docente, e-mail: mariacristiane@unilab.edu.br

INTRODUÇÃO

Os catalisadores químicos são os principais mediadores de reações de interesse industrial; porém, sua utilização ocasiona algumas reações indesejáveis que podem gerar resíduos ao ambiente (SOUZA *et al*., 2017). Nesse cenário, a catálise de reações realizada por catalisadores biológicos e/ou "verdes" é uma alternativa aos processos químicos industriais tradicionais que utilizam catalisadores químicos tóxicos. Enzimas são catalisadores biológicos altamente seletivos, o que reduz a ocorrência de reações indesejáveis, e requerem condições brandas de reação, o que minimiza o consumo de energia (PINHEIRO *et al*., 2018).

As lipases (EC 3.1.1.3), que são classificadas como hidrolases, são as enzimas mais utilizadas em processos biocatalíticos, pois apresentam excelente estabilidade e atividade catalítica na presença de solventes orgânicos, o que pode ser utilizado para facilitar a solubilidade do substrato hidrofóbico a ser utilizado, além de utilização em condições brandas de temperatura e pH e grande diversidade (SOUZA *et al*., 2017). Dentre as lipases, a lipase de *Candida antartica* do tipo B (CALB) é produzida em organismos geneticamente modificados, destacando-se devido à sua ampla gama de especificidade para diversos substratos, uso em condições brandas de reação, resistência a solventes orgânicos e estabilidade térmica, além de atuação em uma faixa abrangente de pH e elevada estéreo especificidade (VERDASCO-MARTÍN *et al*., 2018).

Todavia, o uso industrial extensivo da CALB é limitado; isso devido a problemas referentes à estabilidade, recuperação e reuso deste biocatalisador. De acordo com Santos *et al*. (2017), a imobilização de enzimas é uma solução alternativa à essa problemática. A imobilização enzimática é recomendada para superar algumas limitações, tais como: solubilidade, pureza, atividade, inibição e baixa estabilidade; além disso, a imobilização apresenta outras vantagens que incluem reusabilidade, controle mais fácil da reação, uso de diferentes configurações de reatores, etc (GARCÍA-GALÁN *et al*., 2011). Suportes sólidos magnéticos nanoestruturados são uma boa alterativa para a imobilização enzimática, já que possibilitam uma fácil recuperação da enzima, possuem elevada área superficial, boa reatividade química e fortes interações com as enzimas, quando comparados aos suportes convencionais (LEI *et al*., 2009). A aplicação de ultrassom em reações, cuja aplicabilidade se estende a categorias de reações como aquelas catalisadas heterogeneamente por enzimas, por exemplo, torna esse método uma tecnologia verde de alta eficiência, desempenho econômico e baixa necessidade instrumental (SÁ *et al*., 2017).

A síntese de ésteres de ácidos graxos para o emprego em aditivos e aromas através de processos químicos tradicionais, que utilizam catalisadores químicos, implica em elevada demanda por energia, além das reações serem lentas e não seletivas e ocasionarem problemas ambientais. Em contrapartida, a biocatálise permite a obtenção de produtos de qualidade superior em condições brandas de reação (KISS *et al*., 2004).

Posto isto, este estudo tem por objetivo analisar os parâmetros da reação de esterificação catalisada pela lipase de *Candida antartica* do tipo B imobilizada em nanopartículas magnéticas, CALB-NPM, aplicada à produção de butirato de etila, que apresenta grande demanda na indústria de alimentos e bebidas, quanto aos efeitos da razão molar (álcool:acido), temperatura e tempo reacional. Também, uma vez determinado o ponto ótimo da reação, aplicar as melhores condições reacionais para a síntese do butirato de etila sob radiação ultrassônica; além disso, determinar estabilidade operacional do biocatalisador em estudo. Para fins de comparação, as melhores condições reacionais foram consideradas para a síntese do butirato de etila catalisada pela lipase de *Candida antarctica* do tipo B imobilizada em resina acrílica (Novozym® 435). As melhores condições reacionais foram consideradas para a síntese do butirato de metila via CALB-NPM.

METODOLOGIA

1. *Materiais*

   Lipase de *Candida antartica* do tipo B foi gentilmente doada pela Novozymes (Madrid, Espanha). Lipase de *Candida antartica* do tipo B imobilizada em resina acrílica (Novozym® 435), (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES), solução de glutaraldeído Grau II 25% (p/v), *p*-nitrofenilbutirato (*p*NPB) e p-nitrofenol (*p*NP) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Nanopartículas magnéticas de ferro (Fe_3O_4) foram produzidas pelo método de co-precipitação. Os reagentes químicos utilizados para esta síntese foram $FeCl_3.6H_2O$ (99% granulado puro), $FeSO_4.7H_2O$ (99% granulado puro) e 30% de amônia. Todos os reagentes de grau analítico foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil) e da Vetec (São Paulo, Brasil).
2. *Preparação do Biocatalisador*

A imobilização da CALB em nanopartículas magnéticas seguiu a metologia descrita por Souza *et. al*., (2017).

3. *Esterificação Enzimática*

   A produção de ésteres por esterificação foi realizada em meio reacional contendo heptano, ácido butírico e etanol/metanol, razão molar etanol (1:1-1:4), totalizando um meio reacional de 1 mL. Uma massa de biocatalizador (CALB-MNP) de 0,01 g foi adicionada (carga enzimática: 80 U) para iniciar a reação, que foi realizada sob agitação orbital (240 rpm), a 25-55 °C por tempo variando de 2 a 4 horas. As reações foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média e desvio padrão. A conversão foi monitorizada determinando o índice de acidez através do método Ca 5-40 AOCS (D, 1994).

4. *Análise Estatística*

   A fim de determinar as condições ótimas para a síntese do butirato de etila, um planejamento experimantal do tipo CCD (*Central Composite Design*) de três variáveis (temperatura, tempo reacional e razão molar) foi performado. Os softwares Statistica® 10 (Statsoft, EUA) e OriginPro 2017 (OriginLab, EUA) foram utilizados para o delineamento experimental e análise do butirato de etila.

5. *Esterificação Assistida por Ultrassonicação*

   Depois de determinar as condições ótimas para a esterificação do butirato de etila por agitação mecânica, o ponto ótimo para a reação foi replicado no banho ultrassônico (37 kHz, 300 W) a 55 °C durante um tempo variando de 0,67 a 3,3 horas.

6. *Estabilidade Operacional*

   A estabilidade operacional foi estabelecida por reações consecutivas à produção de butirato de etila usando 0,01 g de CALB-NPM. Antes de cada ciclo, a enzima foi separada do meio reacional por magnetização e lavada com hexano para remover produtos e substratos não reagidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

7. *Otimização da Reação de Esterificação*

   A fim de determinar a temperatura, tempo e relação molar (álcool:ácido) ótimos para a produção de butirato de etila, foi realizado um CCD e os resultados estão apresentados na Tabela 1. O maior rendimento de conversão obtido foi de 75,9% para a amostra 8 (55 °C, 240 min e 1: 4).

   Tabela 1. Valores reais, valores codifcados (entre parênteses) e resultados para o CCD.

   Para avaliar os efeitos lineares das variáveis (temperatura, tempo de reação e razão molar) no rendimento de conversão, foi gerado um gráfico de Pareto, que não é apresentado nesta comunicação. Ao analisar o gráfico de Pareto, a influência da temperatura foi de 77,31, enquanto a influência do tempo de reação foi de -30,82 e a razão molar -4,92 (erro = 0,23). Assim, a temperatura apresentou o maior efeito no rendimento de conversão, enquanto a razão molar foi a mais baixa; além disso, a temperatura foi a única variável que apresentou um valor positivo no gráfico de Pareto, o que significa que a alteração do nível de variável de -1 para 1 aumenta a resposta. Além disso, para estudar os efeitos dos três parâmetros, bem como a sua interação, na produção de butirato de etila, criaram-se gráficos de contorno como mostrado na Figura 1.

   Figura 1. Gráficos de contorno para conversão. (A) Temperatura versus tempo de reação. (B) Temperatura versus razão molar. (C) Razão molar versus tempo de reação. Meio de reação: CALB-NPM = 80 U (massa derivada = 0,01 g), etanol e ácido butírico 1:1-1:4 (ácido butírico:etanol) e heptano (volume de reação = 1,0 mL). As reações foram realizadas durante 2-4 horas a 25-55 ° C a 240 rpm.

   Analisando a Figura 1 (A), pode-se afirmar que o rendimento de conversão aumenta com o aumento da temperatura; assim, o maior rendimento de conversão foi obtido no nível máximo de temperatura (55 °C). Comparando os experimentos em que o tempo foi a única mudança nas condições de reação (1-3, 5-7, 6-8, 11-12), pode-se observar que o rendimento de conversão aumentou em média 1,3 vezes junto com o tempo de reação.

   Souza *et al*. (2017) estudaram a influência da temperatura na produção de butirato de etila e atingiram a maior conversão (90%) a 25 °C e 150 rpm após 8 horas de reação para uma razão molar de 1: 1. Neste estudo, um rendimento de conversão de 75,8% foi alcançado a 55 °C e 240 rpm após 4 horas de reação para uma razão molar de 1: 4. Os resultados obtidos, e analisando a Figura 1 (B) e (C), sugerem fortemente o

efeito positivo da temperatura e razão molar (álcool: ácido) sobre a produção de butirato de etila, embora um excesso de ácido leve a uma diminuição na conversão devido a protonação e a inibição competitiva (JIN *et al*., 2012; NORDBLAD; ADLERCREUTZ, 2008).

Para a produção de butirato de etila catalisada por 0,01 g de CALB-NPM, as condições ótimas foram encontradas em 55 ºC, 1:4 (álcool: ácido), obtendo um valor teórico de 77,2% para o rendimento de conversão da reação predita pelo modelo após 3,3 horas e a 240 rpm. Sob as condições otimizadas, foi realizada a validação experimental do modelo proposto. Após três repetições do procedimento, o rendimento de conversão obtido foi de 73,6% ± 3,8%, o que mostra uma excelente correlação entre os resultados experimentais e estatisticamente preditos. Para efeitos de comparação, a condição ótima descrita acima foi também aplicada para a produção de butirato de etila catalisado por 0,01 g de Novozym® 435, obtendo-se um rendimento de conversão de 93,8 ± 4,2. O ponto ótimo à síntese do butirato de etila foi aplicado à síntese do butirato de metila, obtendo uma conversão de 48,9 ± 4,2%. Esse comportamento está relacionado à maior volatilidade do metanol, quando comparado ao etanol, e à instabilidade causada da enzima por esse tipo de solvente (SOUZA *et al*., 2017).

8. *Curso de Tempo da Reação de Esterificação (Agitação Mecânica versus Ultrassom)*

Uma vez determinada a condição ótima para a produção de butirato de etila pelo delineamento experimental e então validada, analisou-se o rendimento de conversão para o tempo variando de 0,67 a 3,3 horas para a técnica de agitação mecânica e ultrassom, conforme apresentado na Figura 2. Como pode ser visto na Figura 2, o melhor rendimento de conversão obtido para a técnica de agitação mecânica foi de 77,2% ± 4,2% após 200 minutos de incubação. Rendimento de conversão semelhante (77,7% ± 3,6%) foi obtido usando a técnica de ultrassom após 120 minutos de reação; no entanto, o melhor rendimento de conversão alcançado para esta técnica foi de 91,3% ± 3,8% após 200 minutos de incubação. Portanto, os resultados mostrados acima apontam a eficiência da técnica de ultrassom para a produção de ésteres aromáticos, pois aumentam seus rendimentos de conversão quando comparados às técnicas tradicionais. Souza *et al.* (2017) para a produção de butirato de etila e butirato de metila catalisado por 0,01 g de CALB-MNP, obteve um rendimento de conversão superior a 90% para ambos os ésteres após 8 horas de reação a 25 °C, 150 rpm e razão molar de 1:1 (álcool: ácido). Badgujar & Bhanage (2015) produziram benzil butirato, anisil butirato e o-cresil butirato utilizando a técnica de ultrassom e obtiveram um rendimento de conversão de 99% após 3 horas de reação a 52 °C. Nas mesmas condições, os autores produziram estes ésteres de sabor sem o uso de ultrassom e alcançaram conversões de 57%, 55% e 43% para butirato de benzila, butirato de anisil e butirato de o-cresil, respectivamente.

Figura 2. Rendimento de Conversão para Técnicas de Agitação Mecânica e de Ultrassom. Meio de reação: CALB-MNP = 80 U (massa derivada = 0,01 g), etanol e ácido butírico 1:4 (ácido butírico: etanol) e heptano (volume de reação = 1,0 mL). As reações foram realizadas por 4 horas a 55 ° C a 240 rpm para agitação mecânica ou 37 kHz e 300 W para técnica de ultrassom.

9. *Estabilidade Operacional*

Enzimas tem um preço maior do que os catalisadores químicos; assim, para serem comercialmente competitivos, as enzimas imobilizadas devem poder ser reutilizadas várias vezes, mantendo a estabilidade térmica e operacional (VALERIO *et al*., 2013). A estabilidade operacional do CALB-MNP foi avaliada para a produção de butirato de etila. Para tanto, consecutivos ciclos de reação foram realizados, como é mostrado na Figura 3. Como mostrado na Figura 3, para a produção de butirato de etila, o biocatalisador alcançou metade do rendimento de conversão após 6 ciclos de esterificação. Souza *et al*. (2017) utilizou CALB-MPN para a síntese de butirato de etila e butirato de metila e obteve um rendimento de conversão de até 80% após 10 ciclos de reutilização para ambos os ésteres, mostrando que o biocatalisador permaneceu bastante estável.

Figura 3. Estabilidade Operacional. Meio de reação: CALB-MNP = 80 U (massa derivada = 0,01 g), etanol e ácido butírico 1: 4 (ácido butírico: etanol) e heptano (volume de reação = 1,0 mL). As reações foram realizadas durante 2 horas a 55 °C em banho ultrassônico (37 kHz e 300 W).

CONCLUSÕES

A síntese do butirato de etila utilizando a lipase de *Candida antarctica* do tipo B imobilizada em nanopartículas magnéticas de ferro como biocatalisador mostrou-se como uma alternativa promissora à síntese desse éster aromático utilizando os catalisadores químicos tradicionais. No processo de determinação das melhores condições reacionais, dentre os parâmetros analisados, a temperatura mostrou a maior influência na taxa de conversão, como esperado. Esse comportamento foi comprovado pelo valor da energia de ativação obtido (28,12 kJ/mol). As condições ótimas para sintetizar o butirato etila pela CALB-NPM resultaram em uma conversão de substrato de 73,6 % ± 3,8% após 200 minutos de incubação sob agitação mecânica (48,9 ± 4,2% para o butirato de metila). Conversão semelhante (77,7% ± 3,6%) foi obtida usando o ultrassom após 120 minutos de reação; a melhor conversão alcançada foi para esta técnica foi de 91,3% ± 3,8% após 200 minutos de incubação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Unilab. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, bem como o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society, 6th ed.
2. BADGUJAR, Kirtikumar Chandulal; BHANAGE, Bhalchandra Mahadeo. The combine use of ultrasound and lipase immobilized on co-polymer matrix for efficient biocatalytic application studies. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 122, p.255-264, dez. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.012.
3. GARCÍA-GALÁN, Mª. Jesús et al. Biodegradation of sulfamethazine by Trametes versicolor: Removal from sewage sludge and identification of intermediate products by UPLC–QqTOF-MS. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 409, n. 24, p.5505-5512, nov. 2011. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.022.
4. JIN, Zi et al. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying Pichia pastoris whole-cells in a batch reactor. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 159, n. 1-2, p.108-114, maio 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.02.013.
5. KISS, M., STEFANOVITS-BANYÁAI, É., TOTH, A. e BOROSS L. Extractive Synthesis of Ethyl-oleate Using Alginate Gel Co-entrapped Yeast Cells and Lipase Enzyme. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, p. 460–464, 2004.
6. LEI, L., BAI, Y., LI, Y., IL, L. et al. Study on Immobilization of Lipase onto Magnetic Microspheres with Epoxy Groups. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 21, p. 252–258, 2009.
7. NORDBLAD, Mathias; ADLERCREUTZ, Patrick. Effects of acid concentration and solvent choice on enzymatic acrylation by Candida antarctica lipase B. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 133, n. 1, p.127-133, jan. 2008. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.09.002.
8. PINHEIRO, M., RIOS, N., FONSECA, T., BEZERRA, F. et al. Kinetic Resolution of Drug Intermediates Catalyzed by Lipase B from Candida antarctica Immobilized on Immobead-350. **Biotechnology Process**, (Article in Press), 2018. DOI: 10.1002/btpr.2630.
9. SÁ, Amanda Gomes Almeida et al. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor

ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. T**rends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 69, p.95-105, nov. 2017. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.004.

10. SANTOS, J., BONAZZA, H., MATTOS, L., CARNEIRO, E. et al. Immobilization of CALB on Activated Chitosan: Application to enzymatic Synthesis in Supercritical and Near-critical Carbon Dioxide. **Biotechnology Reports**, v. 14, p. 16-26, 2017.
11. SOUZA, M. C. M. de et al. Production of flavor esters catalyzed by lipase B from Candida antarctica immobilized on magnetic nanoparticles. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.681-690, jul. 2017. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20150575.
12. VALERIO, Sheila G. et al. High operational stability of invertase from Saccharomyces cerevisiae immobilized on chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers** , [s.l.], v. 92, n. 1, p.462-468, jan. 2013. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.001.
13. VERDASCO-MARTÍN, Carlos M. et al. Selective synthesis of partial glycerides of conjugated linoleic acids via modulation of the catalytic properties of lipases by immobilization on different supports. **Food Chemistry**, v. 245, p.39-46, 2018.