



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS



CAMPUS JUVINO OLIVEIRA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

CATÁLISE ENZIMÁTICA APLICADA NA PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS DE AROMAS

Autora: Marta Maria Oliveira dos Santos
Orientador: Prof^o. Dr. Marcelo Franco

ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL
Fevereiro de 2020

MARTA MARIA OLIVEIRA DOS SANTOS

**CATÁLISE ENZIMÁTICA APLICADA NA PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS DE AROMAS**

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes

Co-orientador: Prof. Dr. Nívio Batista Santana

**ITAPETINGA
BAHIA - BRASIL
Fevereiro de 2020**

660.634 Santos, Marta Maria Oliveira dos.
S236c Catálise enzimática aplicada na produção de compostos de aromas. /
Marta Maria Oliveira dos Santos. – Itapetinga-BA: Universidade Estadual
do Sudoeste da Bahia, 2020.
85 fl.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Marcelo Franco e coorientação dos Profs. D. Sc. Adriano Aguiar Mendes e D. Sc. Nívio Batista Santana.

1. Ésteres de aromas – Produção e usos – Biocatalisadores. 2. Enzimas – Lipase de *Cândida Rugosa* – Produção de éster. 3. Biocatalizador enzimático – Imobilização de lipase – Uso industrial. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Franco, Marcelo. III. Mendes, Adriano Aguiar. IV. Santana Nívio Batista. V. Título.

CDD(21): 660.634

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza – CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Ésteres de aromas : Produção e usos
2. Biocatalisador enzimático
3. Enzimas : Produção de éster
4. Imobilização de Lipase
5. Lipase de *Cândida Rugosa*



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SOUTHEASTERN BAHIA - UESB
Instituto de Engenharia e Ciência de Alimentos
Nº 056/2019, de 05/12/2019



Governo do
Estado da Bahia

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: CATÁLISE ENZIMÁTICA APLICADA NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMAS.

Autor (a): MARTA MARIA OLIVEIRA DOS SANTOS

Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Franco

Coorientador (a): Prof. Dr. Nívio Batista Santana
Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de *MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS*, pela Banca Examinadora.

Nadabe dos Santos Reis
Prof.^ª Dr.^ª Nadabe dos Santos Reis
Membro Externo - UFSB

Silmaria Almeida de Carvalho
Prof.^ª Dr.^ª Silmaria Almeida de Carvalho
UESB

Marcelo Franco
Prof. Dr. Marcelo Franco
Orientador - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 13 de fevereiro de 2020.

“Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente.

Amém”

Romanos 11:36

*À Deus, pois sem Ele eu nada seria.
Ao meus pais (Neuma e Cláudio) que sempre estiveram do meu lado.
Aos meus avós, tios, tias e primos pelo apoio e confiança.
Ao meu noivo pelo apoio incondicional.
Aos mestres que me guiaram até aqui.
Aos meus amigos de laboratório que me ajudaram na caminhada.
Vocês são a razão dessa conquista.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me proporcionado chegar até aqui. Autor da minha vida e história. Muito obrigada Deus, sem Ti com toda certeza eu não chegaria a lugar nenhum. Toda honra e toda glória a Ele.

Agradeço a minha família que é minha base e sustentação, que sempre alimentou meu sonho de estudar e nunca duvidaram que eu conseguiria. Família amo vocês demais!

A meus pais Claudio e Neuma, Minha mãe, tão insentivadora, que sempre me falou em toda a minha trajetória “Você consegue!”, obrigada maezinha, suas palavras por mais simples que sejam são as que mais chegam ao meu coração. Meu muito obrigada a minha tia Jó que me acolheu em sua casa durante todo esse período. Agradeço também aos meus tio Adilson pelo apoio em tudo.

A meu noivo Wallace que atravessou diversas barreiras (picos de alegrias, ansiedades e frustrações), enxugou minhas lágrimas e vibrou comigo em cada nova conquista, também me insentivou com suas palavras de apoio e amor, acreditou em mim até quando eu não acreditava. Você é um presente de Deus.

Meus amigos queridos que a vida me deu nesses 2 anos de mestrado: Ozana, Nadabe, Marise, Fran, Rafaela, Lucas, Iasnaia, Luiz Henrique, Gabriel, Amanda, Ingride, Ane, Carol, Poly, Marcinha, Laísa, Aila, Eliéser, Dari, Marla, Sabrina, Juciclésio. E aos amigos de sempre Rebeca, Laninha, Claudinha, Leila, Jó, Paulinha, Clíssia, Rose e Zete, obrigada por sempre acreditarem em mim. A bíblia fala que existe amigos mais chegados que irmãos e na vida eu ganhei vocês!

Agradeço pelo apoio financeiro da CAPES, que foi fundamental durante o período de pesquisa. A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), ao programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade, como também a Universidade Estadual de Santa Cruz e a Universidade Federal de Alfenas, pelo espaço cedido no desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao meu orientador Marcelo Franco, ao coorientador Adriano Mendes por todo conhecimento compartilhado. Minha eterna gratidão a todos!

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIACÕES	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
CAPÍTULO I	17
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Geral	19
2.2. Específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Biocatalise	20
3.2 Enzimas	20
3.2.1 Suportes	22
3.2.2 Lipases.....	23
3.3 Lipases Imobilizadas	25
3.3.1 Imobilização por adsorção física	26
3.3.2 Imobilização por ligação iônica.....	27
3.3.3 Imobilização por Ligação Covalente.....	27
3.3.4 Imobilização por aprisionamento (encapsulação)	28
3.3.5 Imobilização por Reticulação	29
3.4 Aplicação das enzimas Imobilizadas	29
3.4.1 Produção Enzimática de Ésteres por Esterificação	30
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO II - Aplicação da lipase imobilizada em suporte hidrofóbico em síntese de ésteres de aromas	37
Resumo.....	38
Graphical abstract.....	39
Lista de abreviaturas	39
1 Introdução.....	40
2 Materiais e métodos.....	41

2.1 Materiais	41
2.2 Métodos	42
2.2.1 Determinação da concentração de proteínas	42
2.2.2 Determinação da atividade hidrolítica	42
2.2.3 Imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos via Adsorção	42
2.2.4 Cálculo dos parâmetros de imobilização	43
2.2.5 Análise eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	44
2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	45
2.2.7 Produção de aromas.....	45
2.2.8 Testes de estabilidade do biocatalisador.....	45
2.2.9 Estatística.....	46
3 Resultados e discussão	46
3.1 Determinação da concentração de proteínas	46
3.2 Determinação da atividade hidrolítica	46
3.3 Imobilização de lípases em suportes hidrofóbicos via adsorção física	46
3.4 Análise eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	49
3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	51
3.6 Esterificação enzimática	52
3.7 Testes de estabilidade operacional	54
4 Conclusão	56
Agradecimentos	56
Referências	57
Material suplementar	64

CAPÍTULO III - Metodologia da superfície de resposta (MSR) aplicada para melhoria da síntese de éster de aroma de casca de maçã e citrus (butirato de hexila).....	65
Resumo.....	66
Graphical abstract.....	67
Lista de abreviaturas	67
1 Introdução.....	68
2 Materiais e Métodos	69
2.1 Materiais	69
2.2 Métodos	69
2.2.1 Preparação de biocatalisadores por adsorção física em suporte hidrofóbico	69

2.2.2 Determinação da atividade hidrolítica e parâmetros de imobilização.....	70
2.2.3 Síntese de esterificação do aroma de casca de maçã e citrus (Butirato de hexila).....	71
2.2.4 Design experimental Box-Behnken.....	71
2.2.5 Teste de reutilização	74
2.2.6 Purificação do éster (butirato de hexila).....	74
2.2.7 Cromatografia gasosa	74
2.2.8 Estatística.....	74
3 Resultados e discussão	75
3.1 Determinação da atividade hidrolítica e parâmetros de imobilização.....	75
3.2 Otimização da síntese do butirato de hexila pelo planejamento Box-Behnken	75
3.3 Reuso	82
3.4 Cromatografia gasosa	83
4. Conclusão	84
Agradecimentos.....	84
Referências	85

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: Referencial Teórico

- Figura 1** - Principais técnicas de imobilização enzimática..... 27
- Figura 2** - Mecanismo de ativação interfacial de lípases em suportes hidrofóbicos. 32
- Figura 3** - Reações Catalisadas por lipases..... 33
- Figura 4** - Imobilização de lipases por adsorção física em suportes hidrofóbicos. 34

CAPÍTULO II: Aplicação da lipase imobilizada em suporte hidrofóbico em síntese de ésteres de aromas.

- Figura 1** - Perfil de eletroforese em Análise eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE das soluções enzimáticas: lipase de *C. rugosa* (CRL), lipase de *Mucor javanicus* (MJL) e lipase de *Candida sp.*(CALA). (a) CRL, (c) MJL e (e) CALA antes imobilização e (b) CRL, (d) MJL e (f) CALA após imobilização..... 53
- Figura 2** - Microscopia eletrônica de varredura da resina adsorvente Diaion HP 20, usada como suportes hidrofóbicos na imobilização de enzimas: superfície dos poros da estrutura do Diaion HP 20 sem enzima imobilizada (A), com a enzima lipase de *C. rugosa* - CRL (B), com a enzima lipase de *Mucor javanicus* - MJL (C), e com a enzima lipase de *Candida sp.* - CALA (D) imobilizada.. 54
- Figura 3** - Reações catalisadas por biocatalisadores CRL-Diaion HP 20, MJL-Diaion HP 20 e CALA-Diaion HP 20. Em sínteses de ésteres de aromas. As reações foram realizadas a 500 mM de cada reagente em meio de heptano, 40 ° C e concentração de biocatalisador de 10% m / v. Os valores são representados como média \pm desvio padrão de três repetições. (A) Butirato de Hexila, (B) Butirato de Geranila e (C) Butirato de Propila..... 55
- Figura 4** - Estudos de reutilização de CRL-Diaion HP 20 após ciclos sucessivos de butirato de hexila síntese em meio heptano. As reações foram realizadas por 150 min de incubação a 500 mM de cada reagente, 40 ° C, 10% m / v de biocatalisador e agitação de 200 rpm. Todos os valores são representados como média \leq desvio padrão de três repetições..... 56

CAPÍTULO III: Metodologia da superfície de resposta (MSR) aplicada para melhoria da síntese de éster de aroma de casca de maçã e citrus (butirato de hexila).

- Figura 1** - Diagrama de Pareto, (a) 60 min, (b) 180 min e (c) 480 min. 75
- Figura 2** - Superfície de resposta entre as variáveis independentes: temperatura, % biocatalisador e razão molar. Nos tempos 60 min (a), (b) e (c), 180 min (d), (e) e (f) e 480 min (g), (h) e (i). As figuras foram obtidas no STATISTICA® v.12..... 78
- Figura 3** - Testes de reutilização da reação de esterificação do éster butirato de hexila, catalisada por CRL – Diaion HP 20 após dez reações consecutivas em sistemas descontínuos. As reações foram realizadas nas condições ótimas informada pelo modelo de designer Box-Behnken..... 82
- Figura 4** - Cromatograma CG – FID de éster butirato de hexila. (a) cromatograma ilustrativo do éster butirato de hexila sintetizado, (b) cromatograma ilustrativo do padrão butirato de hexila.. 84

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II: Aplicação da lipase imobilizada em suporte hidrofóbico em síntese de ésteres de aromas.

Table 1 - Parâmetros de Imobilização de Diferentes Enzimas no suporte hidrofóbico Diaion HP 20	47
Table 3 - Conteúdo de proteínas, atividade de lipase e estudo de atividade específica para lipases (CRL, MJL e CALA) livre e imobilizada, determinada a partir das soluções contendo proteínas e enzimas antes e depois do processo de imobilização.....	64
Table 3 - Conversão de síntese de ésteres de ácido carboxílico de cadeia curta a 40°C durante 30 h, catalizados por suporte Diaion HP 20 e lipases comerciais CRL, MJL e CALA. Concentração da reação: 0,5 M em heptano para ácidos e álcoois.....	56

CAPÍTULO III: Metodologia da superfície de resposta (MSR) aplicada para melhoria da síntese de éster de aroma de casca de maçã e citrus (butirato de hexila).

Tabela 1 - Matriz Box-Behnken com os valores reais e codificados para os variáveis temperatura (° C), biocatalisador (% m/v) e razão molar (ácido:álcool) para a síntese de butirato de hexila em 60, 180 e 480 min.....	73
Tabela 2 - Análise de variância para ajuste do modelo quadrático com um nível de confiança de 95 %. Em tempos de (60, 180 e 480 minutos).....	77
Tabela 3 - Modelo proposto pela MSR com pontos ótimos descodificados em diversos tempos.....	81

LISTA DE ABREVIACOES

ΔG	Energia livre de Gibbs
AE	Atividade Especifica
AH	Atividade Hidrolítica
BSA	Albumina de soro bovino
CALA	Lipase de <i>Candida sp.</i> Recombinante, expresso em <i>Aspergillus oryzae</i>
CALB	Lipases <i>Candida antarctica B</i>
CG	Cromatografia gasosa
CRL	Lipase de <i>Candida Rugosa</i>
DIC	Detector de ionizao de chama
FFA	cidos gordos livres
Ke	Constante de equilibrio
LEU	Lipase <i>phospholipase Lecitase Ultra</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MJL	Amano Lipase M de <i>Mucor javanicus</i>
MSR	Metodologia de superfície de resposta
PI	Proteína Imobilizada
RI	Rendimento de Imobilizao
RML	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
SDS-PAGE	Análise Eletroforese em gel de poliacrilamida
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
UI	Unidade de Atividade

SANTOS, M. M. O. **CATÁLISE ENZIMÁTICA APLICADA NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMAS** Itapetinga – BA: UESB, 2020. 86 p. Dissertação. Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos, Área de concentração em Ciência de Alimentos.

RESUMO

Os compostos aromaticos considerado um processo “verde” que é uma tendência da química moderna e por isso são de interesse industrial. Diante disso este trabalho teve como objetivo o preparo de biocatalisadores e suas caracterizações, via adsorção física de lipases comerciais: *Mucor javanicus* (MJL), *Candida* sp. (CALA) e *Candida rugosa* (CRL) em suporte hidrofóbico (Diaion HP 20), para a produção de ésteres de aromas butirato de hexila – aroma de casca de maçã e citrus, butirato de geranila – aroma de maçã e rosa e butirato de propila – aroma de damasco e abacaxi. Esse trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foram realizados a imobilização das lipases no suporte com carregamento enzimático inicial padronizado de 40 mg/g de suporte. Propriedades catalíticas foram determinadas tais como carga protéica imobilizada e atividade hidrolítica. A concentração para o biocatalisador CRL-Diaion HP 20 apresentou a maior atividade hidrolítica ($34.802,6 \pm 0,2$ U/mL) e carga proteica imobilizada ($30,2 \pm 2,4$ mg/g). Energia livre de Gibbs (ΔG) evidenciou a espontaneidade do processo ($-17,9$ kJ/mol $\leq \Delta G \leq -5,1$ kJ/mol). Aplicando o microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), foi possível confirmar a imobilização para as três enzimas. O rendimento máximo de conversão de 89,1 % foi atingido após 150 minutos para a síntese de butilato de hexila, seguida pela síntese de butirato de geranil (87,3% após 240 min) e butirato de propilo (80,0% após 150 min) em 150 min em condições de 500 mM de cada reagente em meio de heptano, 40 ° C e concentração de biocatalisador de 10% m/v. Este biocatalisador foi testado em 6 ciclos consecutivos e manteve sua sua atividade inicial com 93% de conversão. A segunda etapa foi a aplicação do delineamento de planejamento Box-Behnken) para otimização da síntese do butirato de hexila. Três variáveis foram testados (temperatura, razão molar (ácido/alcool) e % do biocatalisador) com três tempos diferentes (90, 180 e 489 min). Foram obtidos três superfícies de resposta, aplicando o estudo da metodologia superfície de resposta (RSM), Assim através do experimento o aumento na conversão do éster de butirato de hexila aumentou conforme as combinações enperimental sendo determinadas pelo tempo: 60 min (proporção ácido/alcool 1,0:1,4, temperatura 47,25 °C e carregamento enzimático 17,65%) previstos para 87,15 % de conversão do éster, e o valor obtido foi de 90,86%, para 180 min (proporção ácido/alcool 1:2, temperatura 59,5 °C e carregamento enzimático 15,8%) previstos para 100% de conversão do éster, e o valor obtido foi de 94,6%, para 480 min (proporção ácido/alcool 1:2, temperatura 47 °C e carregamento enzimático 16,9%) previstos para 100% de conversão do éster, e o valor obtido foi de 95,01%. Assim a síntese de ésteres empregando MSR demonstrou ser promissor devido ajuste do modelo. O teste de reuso demosntraram que após dez ciclos o biocatalisador manteve atividade de 59,44, 44,63 e 25,99%, variando conforme o tempo (60, 180 e 480 min). O uso da cromatografia a gás (CG) confirmou o pico do éster sintetizado butirato de hexila semelhante ao padrão. Com isso biocatalisadores desenvolvidos a partir de enzimas como a Lipase de *Candida rugosa*, empregadas em suporte hidrofóbico como Diaion HP 20 demonstrou potencial na produção de éster e assim empregando o delineamento Box-Behnken os valores de conversões de ésteres são promissores para aplicação em indústrias.

Palavras-chave: MSR, biocatalisador enzimático, imobilização de lipases, biocatálise, ésteres de aromas.

SANTOS, M. M. O. **ENZYMATIC CATALYSIS APPLIED IN THE PRODUCTION OF AROMA COMPOUNDS** Itapetinga - BA: UESB, 2020. 86 p. Dissertation. Master in Engineering and Food Sciences, Area of concentration in Food Science.

ABSTRACT

Aromatic compounds considered in a "green" process that is a trend in modern chemistry and therefore are of industrial interest. Therefore, this work aimed to prepare biocatalysts and their characterizations, via physical adsorption of commercial lipases: *Mucor javanicus* (MJL), *Candida sp.* (CALA) and *Candida rugosa* (CRL) on hydrophobic support (Diaion HP 20), for absorption of hexyl butyrate aroma esters - apple and citrus peel aroma, geranyl butyrate - apple and rose aroma and propyl butyrate - apricot and pineapple aroma. This work was divided into two stages. In the first stage, immobilization of unsupported lipases was carried out with the initial standardized enzymatic loading of 40 mg/g of support. Catalytic properties were selected as immobilized protective charge and hydrolytic activity. The concentration for the CRL-Diaion HP 20 biocatalyst showed the highest hydrolytic activity ($34,802.6 \pm 0.2$ U / mL) and immobilized protein load (30.2 ± 2.4 mg/g). Gibbs' free energy (ΔG) showed a spontaneity of the process (-17.9 kJ/mol $\leq \Delta G \leq -5.1$ kJ/mol). Applying scanning electron microscopy (SEM) and analysis of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), it was possible to confirm the immobilization for three enzymes. The maximum conversion yield of 89.1% was reached after 150 minutes for the demonstration of hexyl butylate, followed by the exposure of geranyl butyrate (87.3% after 240 min) and propyl butyrate (80.0% after 150 min) in 150 min in conditions of 500 mM reagent in heptane medium, 40 °C and biocatalyst concentration of 10% w/v. This biocatalyst was tested in 6 consecutive cycles and maintained its initial activity with 93% conversion. The second step was the application of the Box-Behnken planning design to optimize the history of the hexyl butyrate. Three variables were tested (temperature, molar ratio (acid / alcohol) and % of the biocatalyst) with three different times (90, 180 and 489 min). Three response surfaces were selected, applying or studying the response surface method (RSM), as well as experimenting or increasing the conversion of the hexyl butyrate ester, which is according to the experimental combinations whose duration is 60 min (alcohol/alcohol) 1.0:1.4, temperature 47.25 °C and enzymatic loading 17.65%) predicted for 87.15% ester conversion, and the value obtained was 90.86%, for 180 min (acid / alcohol ratio 1:2, temperature 59.5°C and enzymatic loading 15.8%) predicted for 100% ester conversion, and the value was reached 94.6%, for 480 min (acid / alcohol ratio 1: 2, temperature 47°C and enzymatic use 16, 9%) predicted for 100% ester conversion, and the value was 95.01%. Thus, the demonstration of esters using MSR shows that it is promising due to model adjustment. The subsequent demonstration test that after ten cycles or biocatalyst maintained an activity of 59.44, 44.63 and 25.99%, varying according to time (60, 180 and 480 min). The use of gas chromatography (CG) confirmed the peak of the synthesized butylated hexyl ester similar to the standard. As a result, biocatalysts develop from enzymes such as Lipase de *Candida rugosa*, used in hydrophobic support such as Diaion HP 20 demonstrated potential in the production of ester and thus using the Box-Behnken design, the conversion values of esters are promising for application in industries.

Keywords: RSM, enzymatic biocatalyst, lipase immobilization, biocatalysis, flavor esters.

CAPÍTULO I

1 Introdução

Nos últimos anos a biocatálise vem se destacando por ser uma ferramenta importante para indústria e tem sido explorado principalmente na área de biocatalisadores naturais, que tem por finalidade transformar reações químicas através de compostos orgânicos, assim destacando-se por ser uma tecnologia aplicada em síntese de produtos (SCHMID A et al., 2001; SUN et al., 2018).

Enzimas tem se destacado por suas condições de catalisadores naturais, entre elas a lipase (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3). Essas enzimas são encontradas comumente em organismos de microbiológico, plantas e reino animal, pertencem a um grupo de enzima que tem sido notada como uma ferramenta que catalisa a hidrólise, além de reações de esterificação e transesterificação envolvendo água ésteres insolúveis (REIS et al., 2009). As de origem microbiana são mais estudadas, devido à versatilidade de suas propriedades, como estabilidade a altas temperaturas, ampla faixa de atuação em relação ao pH e pela facilidade de produção em larga escala (LAGE et al., 2016). Elas atuam na interface orgânica aquosa catalisando a hidrólise das ligações éster-carboxílicas presentes em acilgliceróis liberando ácidos orgânicos e glicerol (POHANKA, 2019).

Apesar de serem catalisadores com alta especificidade pela reação que catalisam em condições amenas, as lipases tem restrição quando a sua aplicação em forma livre, devido a sua difícil remoção da solução, tornando o processo caro (LAGE et al., 2016; MENDES et al., 2012).

Sendo assim a imobilização surge como um processo que visa reduzir a perda de atividade ou inativação da enzima por influência de moléculas de substratos como ácidos graxos e álcoois (LAGE et al., 2016; MENDES et al., 2012). Para eficiência do processo de imobilização a escolha do método adequado é importante, pois irá promover um biocatalisador estável. Mendes e colaboradores (2011) afirmaram que deve ser feito testes com finalidade de identificar qual a melhor técnica e suporte para que haja efeitos eficientes para imobilização.

O método de imobilização por adsorção física é considerado um método simples, pois resulta em uma mistura do suporte com a solução enzimática em condições apropriadas. Esse processo ocorre devido as interações dos grupos superficiais da enzima com os grupos

superficiais do suporte através de atrações eletrostáticas interações, hidrofóbicas, força de Van der Waals, interações iônicas, adsorção física (ZHAO et al., 2015).

Com o devido crescimento do processo de imobilização (suportes com enzimas) nos últimos anos, a aplicação em reações de esterificação têm sido importante fonte de estudos, (BASSI et al., 2016; LAGE et al., 2016). Sendo através da esterificação que ocorre a formação de ésteres, estes são considerados de cadeia curta sendo um dos principais componentes de alguns sabores e fragrâncias naturais que são amplamente utilizados em comidas, indústrias de bebidas, cosméticos e farmacêutica (OLIVEIRA et al., 2018).

A partir dessas informações objetivo-se nesse trabalho a obtenção de um biocatalisador promissor, com alta atividade catalítica e reuso que seja aplicado na produção de ésteres de aromas. A otimização na síntese do éster se torna interessante para aplicações na escala industrial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esse trabalho visa o preparo de catalisadores imobilizados (Diaion HP 20 e lipases) e aplicação na síntese de ésteres de aromas.

2.2 Objetivo específico

- ✓ Realizar a determinação da concentração de proteínas livre;
- ✓ Realizar a determinação da atividade hidrolítica de proteínas livre;
- ✓ Imobilizar lipases de *Mucor javanicus* (MJL), *Candida* sp. (CALA) e *Candida rugosa* (CRL) em Diaion HP 20 suporte hidrofóbico via adsorção;
- ✓ Determinar atividade hidrolítica do biocatalisador após imobilização;
- ✓ Testar o biocatalisador em reações de esterificação (butirato de hexila, propila e geranila);
- ✓ Realizar análise eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);
- ✓ Analisar via microscopia eletrônica de varredura (MEV) o processo de imobilização do biocatalisador;
- ✓ Testar a estabilidade operacional do biocatalisador;
- ✓ Otimizar a produção do éster butirato de hexila, pelo delineamento de planejamento - Box Behnken;
- ✓ Caracterizar os aromas obtidos por meio de cromatografia gasosa (CG-FID) a síntese deste éster de aromas.

3 Revisão de Literatura

3.1 Biocatálise

A biocatálise é uma ferramenta que explora o uso de biocatalisadores naturais, com finalidade de transformar reações químicas através de compostos orgânicos, sendo que a biocatálise tem como a principal diferença dos processos químicos convencionais, a cinética enzimática, proteínas estabilizadas para aplicações industriais, uma ferramenta com amplas aplicações em processos indústrias (SCHMID et al., 2001).

Para a aplicação da biocatálise, é importante reconhecer que as enzimas podem ser obtidas de diversas fontes de organismos vivos, e que servem como referência para diversos tipos de reações orgânicas, assim os biocatalisadores se destacam por conter características importantes ligados a “Química verde” (OMORI et al, 2012). Estes possuem características como: uso de reagentes biodegradáveis (catalisadores de fontes naturais), alta seletividade, condições brandas de reações (temperatura e pressão) (OMORI et al, 2012), a mínima formação de produtos indesejáveis (produtos secundários), os produtos finais são de fáceis separações e recuperação (CASTRO et al, 2014).

Consequentemente, a biocatálise tem se destacado até agora como uma das principais tecnologias quando se trata da síntese de produtos. E mesmo com inúmeras histórias de sucesso no passado e presente, no entanto, uma série de desafios ainda existe, como a descoberta de novos biocatalisadores (SUN et al., 2018). Com isso as vantagens na utilização da biocatálise junto ao processo de imobilização se torna interessante para as indústrias (CASTRO et al, 2014).

3.2 Enzimas

As enzimas são proteínas que tem por características de serem catalisadores notáveis, que podem catalisar reações e alcançar taxas de acelerações de até dezenove ordens de magnitude dentro da sua especificidade. Pauling (1946) formulou o conceito catálise enzimática, sendo o estado que as enzimas aceleram as taxas de reação por ligação de transição, diminuindo assim a energia de ativação da reação, facilidade de processamento, matriz de substrato larga e capacidade para vencer transformações orgânicas em vários meios de reação.

Atualmente enzimas têm sido exploradas não só por ser altamente seletiva para a síntese de moléculas, mas também por conter atividades elevadas, estabilidade e por

conduzirem reações (SUN et al., 2018). Por serem biocatalisadores não-tóxicos, as enzimas aceleram a taxa de reação, com grande potencial de versatilidade na catálise (MENESES et al., 2017).

A crescente utilização de enzimas em diversos processos industriais tem feito a busca por tecnologias da aplicação de enzimas se destaque, objetivando o estabelecimento de padrões na sua qualidade, assim reduzindo o consumo energético e impactos ambientais dos processos, atendendo às normas ISO 9000 e 14000 (ABNT, 2015; NBR ISO 9000, 2000).

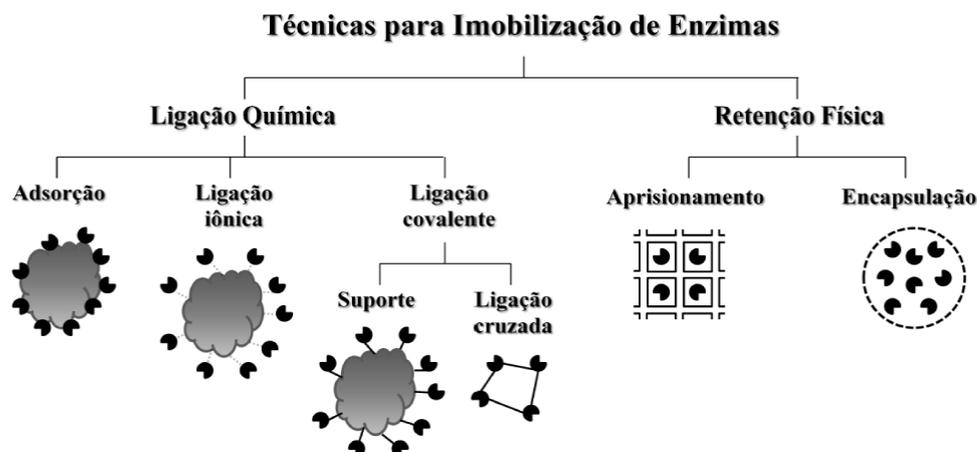
A utilização de enzimas, embora seja altamente atrativa, possui a grande desvantagem na sua utilização, seja na forma solúvel ou na forma de preparados em pó (forma livre) que é a sua remoção do meio para posterior aplicação, assim como a contaminação do produto final desejado. (LAGE et al., 2016; MENDES et al., 2012).

Com objetivo de evitar perdas e atender a qualidade, se faz necessário o processo de imobilização, permitindo a aplicação de enzimas como biocatalisadores em processos produtivos e a utilização em indústrias. (ANTONY; MOHANAN, 2019). Chibata e colaboradores (1978), definiu como imobilização enzimática sendo a técnica que mantém o biocatalisador fisicamente confinado ou localizado numa região específica do suporte com retenção da sua atividade catalítica, podendo ser reutilizado continuamente (FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010).

Em 1916, iniciou-se o processo de imobilização de enzimas, com trabalhos de Nelson e Griffin que observaram a enzima sacarose invertase (beta-frutofuranosidase) sendo adsorvida em carvão, catalisava a hidrólise da sacarose. Também ocorreu em 1926 com o Prof. James Sumner (Universidade de Cornell) que realizou o primeiro isolamento da enzima uréase via cristalização dessa enzima em NH_3 e CO_2 . Com este trabalho o pesquisador ganhou o prêmio Nobel em 1946 (ALVES; CREN; MENDES, 2016; ZHAO et al., 2015).

São conhecidos vários métodos de imobilização enzimática (Figura 1), aplicando diferentes protocolos no processo de imobilização em que suportes sólidos são baseados em imobilizações físicas e químicas. De maneira geral pode-se classificar os métodos de imobilização enzimática em 3 categorias, sendo elas: via interação física (adsorção), interação química (ligações iônicas, ligações covalentes, suporte e ligação cruzada) e na retenção física da mesma (aprisionamento e encapsulação) (NEKTARIA MARKOGLOU, 2003).

Figura 1: Principais técnicas de imobilização enzimática (JEGANNATHAN; ABANG, 2008).



Com o processo de imobilização algumas características da enzima podem sofrer alterações, tais como atividade catalítica e a sua conformação, isso irá variar conforme método escolhido de imobilização, podendo ser retenção (química ou física), como também das forças da interação que ocorre entre a enzima e o suporte utilizado, ao qual causar distorções estruturais na proteína, assim podendo ocorrer uma possível ineficiência do método aplicado (NEKTARIA MARKOGLOU, 2003).

Sendo assim diversos protocolos têm sido empregados no processo de imobilização. Segundo Adlercreutz (2013), a imobilização é uma estratégia que é definida pelo confinamento da enzima em um suporte sólido, com finalidade de reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos dispendioso (WALKER et al., 2003).

Esse processo está ligado a vantagens e desvantagens, sendo vantagem o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, aplicação com maior controle do processo, podendo ser usadas elevadas concentrações de enzimas, permitindo a sua reutilização sem perda significativa da sua atividade catalítica (MENESES et al., 2017; ZHAO et al., 2015). Em contra partida as suas desvantagens estão em alteração da conformação nativa da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização (ADLERCREUTZ, 2013). Por essa razão é importante o conhecimento sobre os diferentes tipos de suporte.

3.2.1 Suportes

Os suportes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, em relação à morfologia podem ser classificados em porosos, não porosos e estrutura em gel (DALLAVECCHIA; NASCIMENTO, 2004). A importância de conhecer as características físicas do

suporte (polaridade, razão molar de hidrófilo para grupos hidrofóbicos, tamanho de partícula, área superficial, porosidade e tamanho de poro) irá definir a quantidade de lipase ligada e a atividade da lipase após a imobilização. (STOYTICHEVA et al., 2011). De maneira geral os suportes que tem características de porosidade tem vantagens por conter uma área superficial maior onde a lipase pode ser adsorvida tanto na parte externa quando interna dos poros (OZTURK, 2001).

Os polímeros naturais como os sintéticos são muito utilizados em processos de imobilizações (MATEO et al., 2007). Os polímeros naturais apresentam características de serem de baixo custos e degradáveis na natureza, enquanto os polímeros sintéticos são versáteis e apresentam características de variedades em suas formas físicas como também na estrutura química apresentando-se como um suporte ideal (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO, 2004).

Com a finalidade de permitir que ocorra o aprimoramento das características das enzimas tais como atividade e estabilidade a imobilização e a escolha do suporte são extremamente importantes para eficácia do processo de imobilização (RODRIGUES et al., 2019).

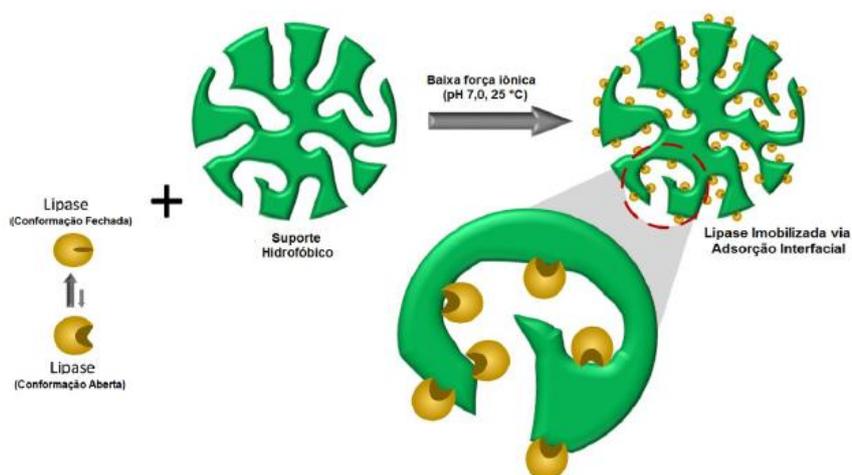
3.2.2 Lipases

Entre as enzimas de interesse industrial, lipases desfrutam de uma posição privilegiada e destacam-se por sua importância, devido ao grande número de reações que são catalisadas por elas em sistemas orgânicos, com elevada estabilidade, e baixo custo comercial (MENESES et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas ubíquas, que são encontrados na maioria dos micro-organismo, plantas e reino animal. Pertencem a um grupo de enzimas que é uma ferramenta poderosa para catalisar a hidrólise como também reações de esterificação e transesterificação envolvendo água ésteres insolúveis (REIS et al., 2009) Assim as lipases catalisam a quebra de diversas moléculas tais como moléculas de acil glicerol de maneira aleatória, e assim produzindo intermediários como ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis (POHANKA, 2019).

As lipases possuem uma propriedade estrutural particular que é presença de uma “tampa” ou “borda”, que pode mudar a sua conformação de maneira a controlar o acesso das moléculas de substrato ao sítio ativo da enzima, na figura 2 encontra-se uma ilustração do mecanismo de ativação interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos.

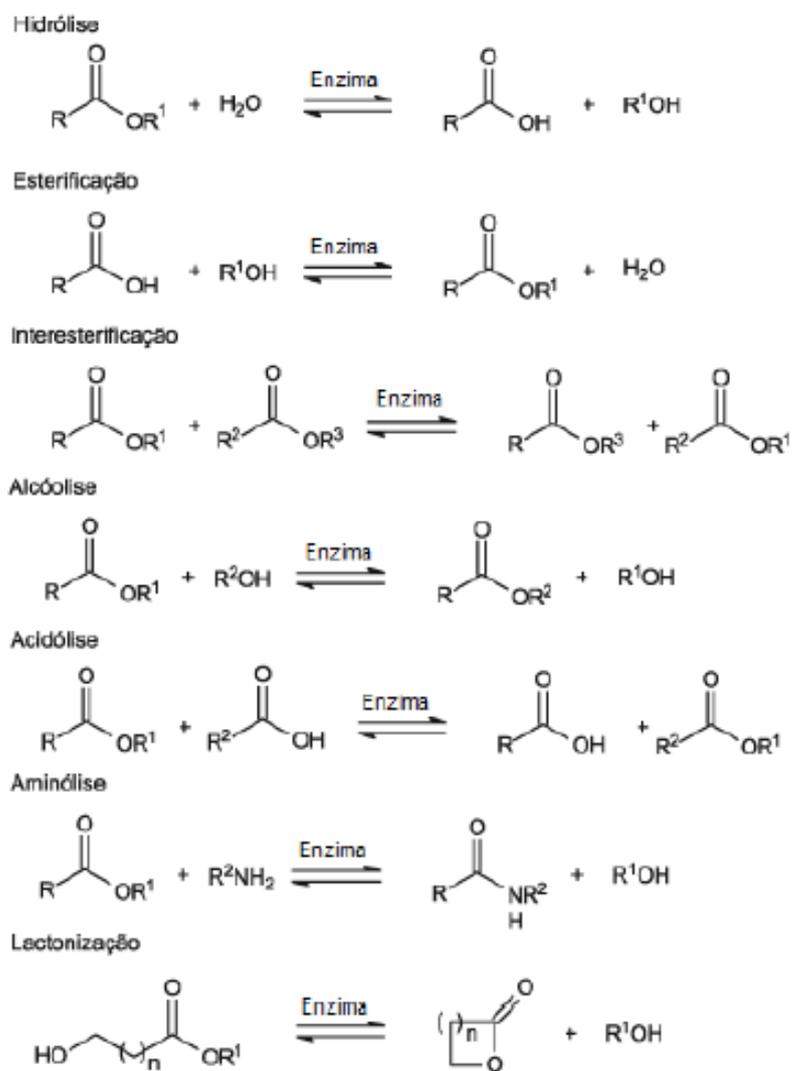
Figura 2: Mecanismo de ativação interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos (BASSI et al., 2016).



A “tampa” é uma cadeia polipeptídica que possui duas conformações em meio aquoso: quando em forma fechada o subdomínio cobre o sítio ativo de forma que a lipase se mantenha inativa. Porém em forma aberta o sítio ativo fica acessível às moléculas de substrato, sendo ativa, com isso a enzima expõe uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase ao substrato. Através dessa propriedade de rearranjos que as lipase possui na sua conformação que de forma geral induzem a adsorção da enzima em uma interface hidrofóbica ou a um substrato de ligação dando origem ao mecanismo de ativação interfacial de lipase (BASSI et al., 2016).

Através das características que a lipase apresenta, a figura 3 demonstra as ligações que essa enzima realiza através da catálise.

Figura 3: Reações Catalisadas por lipases (WIERMANN; ALVES, 2006).



Conhecendo essas características a imobilização é essencial a sua aplicação, pois estas dependem das características que a enzima possui, ao qual pode-se determinar a aplicação e as condições que a enzima atua. Sendo assim o método a ser escolhido deve ser avaliado, para determinar qual o melhor a ser aplicado e adaptado ao processo, levando em consideração custo e tempo, para viabilizar o método, pois estes parâmetros influenciam diretamente no processo, bem como no custo do produto final (FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010).

3.3 Lipases imobilizadas

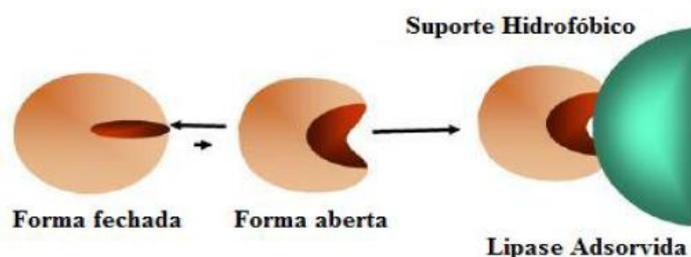
Para utilização das lipases se faz necessário a imobilização, para serem aplicadas, contudo, é importante conhecer os métodos de imobilização para melhorar as propriedades

das lipases, conhecendo vantagens, desvantagens e custos de cada processo (RODRIGUES et al., 2019).

3.3.1 Imobilização por adsorção física

A adsorção física é considerado o método mais simples de imobilização (Figura 4), pois se trata uma mistura com condições apropriadas envolvendo o suporte insolúvel em uma determinada solução enzimática, ao qual é realizado posteriormente uma separação do derivado. Esse processo ocorre devido as interações dos grupos superficiais da enzima com os grupos superficiais do suporte através de atrações eletrostáticas e interações não-covalentes estão envolvidos nesse processo de imobilização: interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, força de Van der Waals, interações iônicas, adsorção física (ZHAO et al., 2015). Comparando a imobilização por adsorção física com as demais técnicas, a adsorção é vantajosa por seguintes aspectos: custo baixo dos materiais e procedimento, condições de fáceis operações, fácil regeneração para a reciclagem, recuperação de elevada atividade da lipase e nenhuma necessidade de utilização de aditivos químicos no processo de imobilização. (ZHAO et al., 2013)

Figura 4: Imobilização de lipases por adsorção física em suportes hidrofóbicos. Adaptado de (MATEO et al., 2007).



A partir da hidrofobicidade do suporte é encontrado a influência da atividade da lipase após a imobilização. Já a atividade relativa da lipase aumenta conforme a enzima é adsorvida de forma seletiva no suporte hidrofóbico, uma vez que as lipase conseguem reconhecer as superfícies e também aos dos seus substratos naturais e que sofrem ativação interfacial durante a imobilização. (BASSI et al., 2016; ZHAO et al., 2015). Foi relatado por Wu (2007), que a estabilidade e atividade da lipases imobilizadas, podem ser melhoradas por tratamento com uso de solventes polares, que auxilia na ativação dos sítios da enzima. Outros parâmetros no processo de imobilização como, pH e força iônica do meio e a relação entre concentração

da enzima e o suporte também são importantes na eficiência da imobilização. A influência da força iônica pode afetar diretamente a capacidade de ocorrer uma adsorção eficiente, como também o pH do tampão é igualmente importante uma vez que as interações iônicas são cruciais para a imobilização. De maneira geral a adsorção máxima é observada a valores de pH perto do ponto isoelétrico da enzima. (CHELARU et al., 2008) No processo de imobilização a interação eletrostática e hidrofóbica é a força motriz que direciona a imobilização (ZHAO et al., 2015)

3.3.2 Imobilização por ligação iônica

Ocorre no processo de imobilização por ligação iônica a ligação feita através de ligação de sal, onde o suporte possui grupos funcionais ionizáveis que interagem especificamente com os grupos funcionais da enzima. Também nesse processo podem ocorrer interações por adsorção, porém prevalecem as iônicas por serem mais fortes e ligações químicas (FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010).

Nesse processo os suportes iônicos são carregados negativamente (suportes catiônicos) ou positivamente (suportes aniônicos) e a eficiência da imobilização por ligação iônica pode ser analisada de acordo com as condições de operação do processo, como propriedade tamponantes do meio que devem ser compatíveis com o suporte ao qual deverá favorecer a substituição dos seus íons pelos grupos ionizados da enzima (VICHENEWSKI, 1995).

Assim para que ocorra a imobilização via ligação iônica, é necessário que ocorra o controle principalmente do pH e da força iônica do meio onde a preparação será realizada (LIM et al., 2001). Já como desvantagem, esse método faz com que a ligação iônica promova pequenas alterações na conformação e o local ativo da lipase, restando a atividade da lipase na maioria dos casos. (ZHAO et al., 2015). Contudo, dentre as vantagens de se aplicar esse método, está na sua reutilização, simplicidade do processo e diminuição na lixiviação. Porém alguns estudos já demonstraram que diferentes níveis de estabilização podem ser efetivos utilizando diferentes métodos de imobilização (RUEDA et al., 2016).

3.3.3 Imobilização por Ligação Covalente

A ligação covalente refere-se ao processo de imobilizar enzimas através da reação química entre os resíduos de aminoácidos ativos fora do sítio catalítico e de ligação ativo da enzima para com os grupos ativos da transportadora (STOYTCHIEVA et al., 2011).

A imobilização enzimática pelo método de ligação covalente é um dos métodos mais utilizados e estudados (MOHAMAD et al., 2015a). Assim a força que ocorre pela imobilização por ligação covalente é a mais estável dentre todas as interações possíveis nos processos de imobilização. Ocasionalmente melhorias na estabilidade da enzima, ao qual dentre suas vantagens estão que a metodologia de imobilização por ligação covalente evita o fenômeno de dessorção, que não é desejado nesse processo, além de favorecer o aumento da vida útil e da estabilidade térmica da enzima, ocorrendo a diminuição da velocidade de desativação espontânea enzimática (PEREZ et al., 2007).

Além disso, esse procedimento favorece a rigidez na estrutura da enzima, o que consequentemente limita o seu movimento quando submetida às altas temperaturas ou mudanças de pH (KIM et al., 2006). Entretanto as condições de pré-paração para imobilização covalente é rigoroso com o uso de alguns e a enzima pode perder a sua atividade durante o processo de imobilização, assim pode ocorrer uma facilidade de alteração na estrutura terciária nativa da enzima, assim causando subsequente redução da atividade catalítica enzimática. Ocorre nesse processo as condições mais drásticas e o maior número de etapas de reação, levando a mais tempo para a sua realização, são inconvenientes deste método de imobilização, portanto, o custo dessa imobilização é alta (ZHANG; WENG; XU, 2012).

3.3.4 Imobilização por aprisionamento (encapsulação)

A imobilização por aprisionamento está relacionada à captura de enzimas dentro de uma rede polimérica ou microcápsulas de polímeros que permite que o substrato e os produtos a passar através dela, a enzima fica livre no meio reacional, mas restrita a um espaço físico (ZHANG; WENG; XU, 2012).

Contudo, após o aprisionamento das enzimas, a lipase não ficam ligadas na matriz polimérica ou cápsula, mas a sua difusão é limitada. Comparando com as lipases fisicamente adsorvidas, as lipases imobilizadas via encapsulação são mais estáveis devido a não correr interações físicas ou ligações químicas estabelecidas entre a enzima e o suporte. Com isso a disponibilização de grande área superficial para o contato entre o substrato e a enzima no interior de um volume relativamente pequeno, aumenta a atividade catalítica da enzima (MENDES et al., 2011).

Também podem ocorrer possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa, sendo assim uma grande vantagem oferecida pela utilização deste método de imobilização (VILLENEUVE et al., 2000). Esse processo é considerado

simples e a atividade da lipase é mantida. Porém, a desvantagem está em que a lipase imobilizada mostram em um aprisionamento relativamente diminuindo a sua estabilidade. Em produção de biodiesel a taxa de conversão é baixa, devido a proteínas que contêm elevadas massas molares são impedidas de penetrar no interior de uma cápsula, porém os substratos e produtos de menor massa molar podem passar livremente pela membrana semipermeável. Como resultado somente substrato de baixa massa molar podem ser empregados com este tipo de enzima imobilizada, e esta é uma das principais desvantagens deste tipo de imobilização (ROSEVEAR et al., 1987).

3.3.5 Imobilização por reticulação

O processo de imobilização por reticulação refere-se ao processo para imobilizar a enzima utilizando formação de ligações cruzadas intermoleculares. Essa ocorre através da adição reagentes de reticulação multifuncionais, tais como o glutaraldeído (OZTURK BANU, 2001).

De maneira geral esta técnica de imobilização ocorre de maneira livre, sem o apoio, envolve unir enzimas uns aos outros para formar uma estrutura tridimensional. Assim apenas as lipases podem ser imobilizadas diretamente do seu caldo fermentativo e recuperados como reticulados agregados de enzimas (GUPTA et al., 2009).

Com todas as vantagens, do processo de ligação cruzada, essas reações são geralmente realizadas em condições relativamente severas, fazendo uso de reagentes de ligação cruzada que podem alterar a conformação de lipases e potencialmente ocasionar a significativa perda de escala de atividade. Outras desvantagens desse processo são os baixos rendimentos de imobilização, como também a ausência de propriedades mecânicas desejáveis. Com finalidade de minimizar estes dois problemas, a reticulação deve ser sempre combinada com outras técnicas de imobilização, tendo como exemplo a adsorção física (ZHAO et al., 2015).

3.4 Aplicações das enzimas imobilizadas

A reação natural das lipases é catalisar a hidrólise de ligações éster o que permite que estas enzimas sejam utilizadas em diversas reações (BON et al., 2008). E quando essas enzimas encontram-se imobilizadas em suportes, as suas características tornam vantajosas, pois são mais promissoras na aplicação industrial em relação às enzimas solúveis (FERNANDES et al., 2006).

Assim as lipases têm se destacado em aplicações nas indústrias de enzimas imobilizadas ao qual está a produção de xarope de glicose e frutose utilizando o amido de milho, a produção de ácido 6-amino penicilínico, penicilina semi sintética com o uso da enzima penicilina-G ou L-acilase, produção de acrilamida em que empregando células imobilizadas na produção de aspartame com a termolisina imobilizadas. Também ocorre a utilização de enzimas imobilizadas para a produção de vários L-aminoácidos (como a L-alanina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-triptofano e L-valina), usados com finalidade de aumentar o valor nutricional de alimentos industrializados e para hidrólise da lactose presente no soro do queijo (BON et al., 2008).

Atualmente a economia, estima que a produção e venda de lipase é de cerca de 10% de todas as enzimas comercializadas (GUERRAND, 2017). Na aplicação na indústria de produtos alimentares, bebidas e alimentos para animais é o mais típico para lipase ao qual representa cerca de 55% de lipase comercializados. Já na utilização de fabricação de produtos de limpeza é de cerca de 25% do mercado de lipase e a produção de biocombustíveis é de 10%. Na aplicação em biotecnologia moderna, as lipases microbianas prevalece como o tipo mais comercializado de lipase. Estima-se que 90% das lipases vendido têm uma origem microbiana (POHANKA, 2019).

3.4.1 Produção enzimática de ésteres por esterificação

A partir da reação de esterificação, ésteres alifáticos são obtidos. Estes são considerados de cadeia curta são considerados os principais componentes de alguns sabores e fragrâncias naturais que são amplamente utilizados em comidas, indústrias de bebidas, cosméticos e farmacêutica (OLIVEIRA et al., 2018). A lipase *Burkholderia cepacia* foi imobilizada em suporte Accurel MP 1000 e utilizadas na hidrólise de triacetina e metilmandelato, na esterificação de ácido oleico e etanol, alcançando conversão de 99% após 24 h (MANOEL et al., 2015).

Já Lima e colaboradores (2018), compararam a eficiência da imobilização da lipase de *Candida antarctica* tipo B, *Pseudomonas fluorescens* e *Thermomyces lanuginosus* em suportes como contas de acrílico secas e sílica macroporosa aplicando em ésteres com propriedades de sabor e foram sintetizados por esterificação de ácidos acético e butílico. Corradini e colaboradores (2017), relataram a síntese enzimática aprimorada de valerato de etila imobilizando lipase de *Thermomyces O lanuginoso* em partículas de poli-hidroxibutirato, obtendo 82% após 120 min de reação.

A pesquisa de Oliveira e colaboradores (2018), imobilizaram a lipase de *Rhizomucor miehei* em quitosana e testou na síntese dois ésteres de aromas de frutas, butilato de metila e etila, obtendo sucesso nos ésteres butirato de etila e butirato de metila com 92 e 89% de esterificação.

Assim a literatura expõe as diversas aplicações que podem ser realizadas através do biocatalisador utilizando lipases.

REFERÊNCIAS

- ABNT. Introdução à abnt nbr iso 14001. Environmental Compliance: **A Web-Enhanced Resource**. p. 41, 2015.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media . Chem. Soc. Rev., V. 42, 2013.
- ALVES, M. D. et al. Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2016.
- ANTONY, N.; MOHANAN, P. V. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Template synthesized polypyrroles as a carrier for diastase alpha amylase immobilization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101164, 2019.
- BASSI, J. J. et al. International Journal of Biological Macromolecules 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.
- CASTRO, A. M. C. et al. Redução enzimática do 4-(dimetilamino)benzaldeído com pedaços de cenoura (daucus carota): um experimento simples na compreensão da biocatálise. **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 699–708, 2014.
- CHELARU, C. et al. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, p. 350–361, 2008.
- CORRADINI, M. C. C. et al. Improvement of the enzymatic synthesis of ethyl valerate by esterification reaction in a solvent system. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 100–109, 2017.
- DALLAS-VECCHIA, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V. Aplicação sintéticas de lipases mobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, p. 623-630, 2004
- FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. **Revista Processos Químicos**, v. 4 (7), p. 53–58, 2010.

GROGER, H. Enzyme catalysis in the synthesis of pharmaceuticals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 1239–1240, 2018.

GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **TWB Toulouse White Biotechnology**, v. 24, n. 4, 2017.

GUPTA, P. et al. Bioresource Technology Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4074–4076, 2009.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase — A Critical Review Eng Seng Chan and Pogaku Ravindra. p. 253–264, 2008.

LAGE, F. A. P. et al. Enzyme and Microbial Technology Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56–67, 2016.

LIMA, L. C. D. Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk particles. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2018.

MANOEL, E. A. et al. Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia*: Application to the kinetic resolution of myo -inositol derivatives. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 10, p. 1557–1564, 2015.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity , stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MENDES, A. A. et al. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109–115, 2011.

MENDES, A. A. et al. International Journal of Biological Macromolecules Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503–511, 2012.

MENESES, A. C. DE et al. Trends in Food Science & Technology A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food , cosmetics and pharmaceuticals industries. **Tends in food science & technology**, v. 69, 2017.

MOHAMAD, N. et al. Simple Adsorption of *Candida rugosa* Lipase onto Multi-walled Carbon Nanotubes for Sustainable Production of the Flavor Ester Geranyl Propionate. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2015.

Nbr iso 9000. Sistemas de gestão da qualidade - fundamentos e vocabulário. **Instituto portugues da qualidade**, v. 7, p. 1–46, 2000.

Nektaria. M, et al. Immobilized enzyme reactors in liquid chromatography: on-line bioreactors for use in synthesis and drug discovery. **Bioanalytical separations**, v. 4, n. 1, p. 233–234, 2003.

OLIVEIRA, U. M. F. DE et al. Efficient biotechnological synthesis of flavor esters using a low-cost biocatalyst with immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. **Molecular Biology Reports**, 2018.

OMORI, ÁLVARO TAKEO, V. B. P. E C. DE S. DE O. Revisão. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 435–437, 2012.

OZTURK BANU. Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. **İzmir Institute of Technology**, 2001.

Pauling, I. I. N. U. S. Molecular architecture and biological reactions. **Chem eng news**, v. 24, p. 1375–1377, 1946.

PEREZ, V. H. et al. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 13–19, 2007.

POHANKA, M. Biosensors and Bioassays Based on Lipases, Principles and Applications, a Review. **Molecules**, v. 24 (3), 2019.

REIS, P. et al. Lipases at interfaces : A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147–148, p. 237–250, 2009.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports : immobilization mechanism , advantages , problems , and solutions. *Biotechnology Advances*. **Biotechnol Advances**, v. 37 (5), p. 0–1, 2019.

RUEDA, N. et al. Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts Drawbacks and Opportunities. **Biotechnology Advances**, p. 1436–1455, 2016.

SCHMID A et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, n. January, p. 258–268, 2001.

STOYTICHEVA, M. et al. The Immobilized Lipases in Biodiesel Production. **Intechop**, 2011.

SUN, H. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1275–1284, 2018.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis : a survey of chemical , physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v. 9 (4-6), p. 113-148, 2000.

Wiermann, f.; alves, g. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais fernanda. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, 2006.

WIERMANN, F.; ALVES, G. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, 2006.

WU, J. C. et al. Enhanced activity and stability of immobilized lipases by treatment with polar solvents prior to lyophilization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 108–112, 2007.

ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Applied Microbiol Biotechnol**, p. 61–70, 2012.

ZHAO, X. et al. Enzyme and Microbial Technology Kinetics of lipase recovery from the aqueous phase of biodiesel production by macroporous resin adsorption and reuse of the adsorbed lipase for biodiesel preparation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4–5, p. 226–233, 2013.

ZHAO, X. et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production : Enzyme immobilization , process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 44, p. 182–197, 2015.

CAPÍTULO II

APLICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM SUPORTE HIDROFÓBICO EM SÍNTESE DE ÉSTERES DE AROMAS

Marta Maria Oliveira dos Santos^a, Rafaela Santos Gama^b, Iasnaia Maria de Carvalho Tavares^a, Eduardo Valério de Barros Vilas Boas^c, Adriano Aguiar Mendes^b, Marise Silva de Carvalho^d, Julieta Rangel de Oliveira^d, Marcelo Franco^{d*}.

^a*Department of Exact Sciences and Natural, State University of Southwest Bahia, 45700-000, Itapetinga, Brazil.*

^b*Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, 37130-001, Alfenas, Brazil*

^c*Department of Food Science, Federal University of Lavras, 37200-000, Lavras, Brazil*

^d*Department of Exact Sciences and Technology, State University of Santa Cruz, 45654-370, Ilhéus, Brazil.*

*Corresponding Author: Phone = +55 073 3231 4158; Fax = +55 073 3680 5355;

e-mail = mfranco@uesc.br

Artigo publicado no Journal of Biotechnology and Applied Biochemistry em 18/05/2020
páginas 1-9

APLICAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA EM SUPORTE HIDROFÓBICO EM SÍNTESE DE ÉSTERES DE AROMAS

Marta Maria Oliveira dos Santos^a, Rafaela Santos Gama^b, Iasnaia Maria de Carvalho Tavares^a, Eduardo Valério de Barros Vilas Boas^c, Adriano Aguiar Mendes^b, Marise Silva de Carvalho^d, Julieta Rangel de Oliveira^d, Marcelo Franco^{d*}.

^aDepartment of Exact Sciences and Natural, State University of Southwest Bahia, 45700-000, Itapetinga, Brazil.

^bInstitute of Chemistry, Federal University of Alfenas, 37130-001, Alfenas, Brazil

^cDepartment of Food Science, Federal University of Lavras, 37200-000, Lavras, Brazil

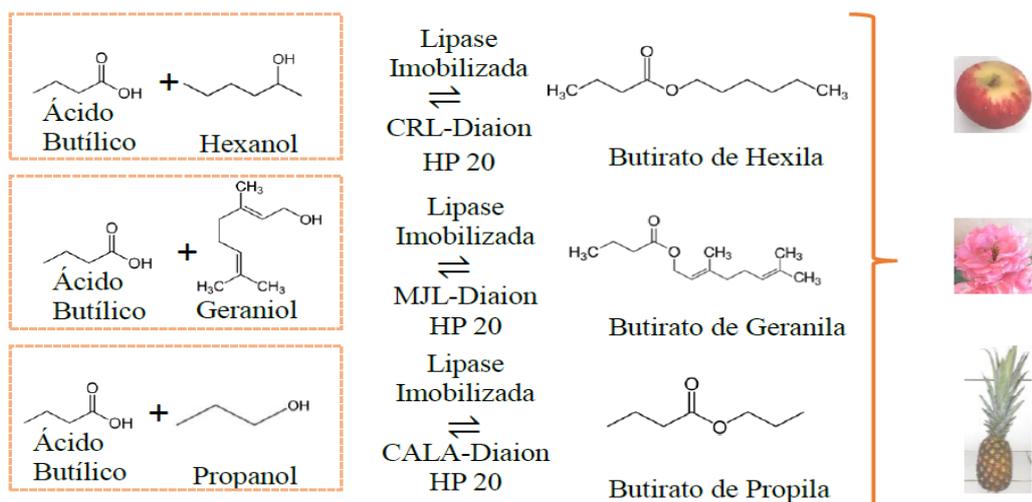
^dDepartment of Exact Sciences and Technology, State University of Santa Cruz, 45654-370, Ilhéus, Brazil.

Resumo

O uso de processos verdes é uma tendência da química moderna, entre estes processos existentes destaca-se a biocatálise. Diante disto preparamos biocatalisadores utilizando lípases de *Candida rugosa* (CRL), *Mucor javanicus* (MJL) e *Candida* sp. (CALA), imobilizadas em suporte Diaion HP 20 via adsorção física e posteriormente aplicados nas sínteses dos aromas de casca de maçã e citrus, maçã e rosa e damasco e abacaxi. Foram aplicados os métodos microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para confirmar a imobilização das enzimas que foram evidenciados através das imagens projetadas. Para obtenção de um catalisador efetivo, estes biocatalisadores foram aplicados em sínteses de aromas e entre os três biocatalisadores estudados, o CRL-Diaion HP 20 foi o que apresentou destaque por obter maior carga proteica imobilizada ($30,2 \pm 2,4$ mg/g), processo de imobilização espontânea $\Delta G -1,57$ e valor de atividade hidrolítica elevado ($34.802,6 \pm 0,2$ U/mL), assim obtendo maiores valores de conversão na em esterificação de 89,09%, 87,33% e 80,01% para os ésteres butirato de hexila, butirato de geraniol e butirato de propila respectivamente. Este biocatalisador também foi testado em 6 ciclos de reuso, mantendo 93,8% da sua atividade relativa inicial no final do 6º ciclo. Biocatalisador desenvolvido a partir da imobilização da lipase de *Candida Rugosa*, utilizando o suporte Diaion HP 20, tem grande relevância na produção de ésteres de aromas e demonstra potencial para ser aplicado na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Biocatálise, imobilização de lipase, síntese de aromas, química verde, adsorção física.

Graphical Abstract



Keywords: Biocatalysis, lipase immobilization, flavor demonstration, green chemistry, physical adsorption.

Lista de abreviaturas

ΔG	Energia livre de Gibbs
AE	Atividade Especifica
AH	Atividade Hidrolítica
BSA	Albumina de soro bovino
CALA	Lipase de <i>Candida sp.</i> Recombinante, expresso em <i>Aspergillus oryzae</i>
CALB	Lipases <i>Candida antarctica B</i>
CRL	Lipase de <i>Candida Rugosa</i>
FFA	Ácidos gordos livres
Ke	Constante de equilibrio
LEU	Lipase <i>phospholipase Lecitase Ultra</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MJL	Amano Lipase M de <i>Mucor javanicus</i>
PI	Proteína Imobilizada
RI	Rendimento de Imobilização
RML	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
SDS-PAGE	Análise Eletroforese em gel de poliacrilamida
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
UI	Unidade de Atividade

1. Introdução

A biocatálise consiste no uso de catalisadores, onde as reações químicas são catalisadas de maneira altamente seletiva na presença de proteínas enzimáticas. Devido a sua versatilidade, quimio e enantio-seletividade os biocatalizadores torna se bastante promissor nas indústria químicas e de alimentícias [1]–[5]. Com isso, a biocatálise tem alcançado inúmeras aplicações em síntese orgânica, além do processo ser considerada uma tecnologia verde e sustentável. [4], [6], [7].

Lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são uma ferramenta poderosa para catalisar a hidrólise como também reações de esterificação e transesterificação envolvendo água ésteres insolúveis [8]–[12], destaca-se por exibem um alto grau de seletividade, assim as tornando úteis [13], [14].

Essas lipases podem ser produzidas por microorganismos e são conhecidas na literatura as lípases *Candida rugosa* (CRL), *Mucor javanicus* (MJL) e *Candida* sp. (CALA), por terem sido aplicadas em diversas reações como a CRL aplicada em sínteses de oleato de etila em meio hexano [15], acetato de geranyl em solvente orgânico [16], polimerização e produção de ácido polilático [17]. A MJL aplicada em produção de éster cetoprofeno-trifluoroetílico [18], éster propionato [19] e oleato de n-octilo [20]. E a CALA utilizado na produção de oleato de etila [21], transesterificação 2-fenilbut-3-in-2-ol racêmica em isooctano [22] e resolução cinética de (\pm) -1,2-propanodiol [23].

Devido a essas características as proteínas enzimáticas no processo de imobilização estão cada vez mais sendo aplicadas como biocatalisadores em ambientes industriais [6]. Atualmente estas são usadas para aplicações biocatalíticas que representam um número limitado de participação no mercado global de enzimas, que em 2015 representou US \$ 8,18 bilhões e deve chegar a US \$ 17,50 bilhões até 2024. [5].

Vários métodos de imobilização foram estudados, incluindo reticulação, aprisionamento, adsorção e ligação covalente. [24]. O método de imobilização por adsorção é o mais comum, pois apresenta baixo custo, condições de fáceis operações, poucos efeitos deletérios para a atividade, seletividade da enzima, recuperação de elevada atividade da lípase e nenhuma necessidade de utilização de aditivos químicos no processo de imobilização [25], [26].

A adsorção física ocorre devido as interação dos grupos superficiais da enzima com os grupos superficiais do suporte através de atrações eletrostáticas (interações

eletrostática, interações hidrofóbicas, força de Van der Waals, interações iônicas, adsorção física [24], [27].

Com finalidade de obter uma boa estabilização no processo de imobilização a escolha do suporte é essencial [28], como características físicas do suporte (polaridade, razão molar de hidrófilo para grupos hidrofóbicos, tamanho de partícula, área superficial, porosidade e tamanho de poro) são características importantes na escolha do suporte [24], [29].

Atualmente polímeros sintéticos são muito utilizados em processos de imobilizações, uma vez que os polímeros sintéticos são versáteis e apresentam diversidade em suas formas físicas como também na estrutura química objetivando obter um suporte ideal no processo de imobilização, ou seja, aprisionamento da enzima para posterior reutilização em processo industrial [7], [11], [30]. Entre os suportes sintéticos, o Diaion HP 20, polímero altamente poroso [31], se destaca, por ser utilizado como suporte para a imobilização das lipases, enzimas dos fungos: *Geotrichum candidum* [32], *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Penicillium camembertii* [33], *Thermomyces lanuginosus* [34], [35].

Nesse contexto, e devido a busca incessante de novas tecnologias para redução de custo e maior reutilização no processo, o trabalho teve como objetivo desenvolver biocatalisadores a partir do suporte hidrofóbico Diaion HP 20, utilizando as enzimas *Candida rugosa* (CRL), *Mucor javanicus* (MJL), *Candida sp.* (CALA). Foram determinados vários parâmetros de imobilização, como concentração de proteínas, rendimento, atividade hidrolítica, atividade específica e energia de Gibbs. Os biocatalisadores foram aplicados em síntese de ésteres de aromas: butirato de hexila (aroma de casca de maçã e citrus), de geranila (aroma de maçã e rosa) e de propila (aroma de damasco e abacaxi). Com base em nosso conhecimento a imobilização dessas lipases em suporte Diaion HP 20 para posterior aplicação na síntese desses ésteres ainda não foi relatada na literatura.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

O suporte Diaion HP 20, com média de diâmetros de partículas de 300–700 µm e tamanho de poro de 170 Å (Supelco technical informações), adquiridos da Supelco

(Bellefonte, PA, EUA). A Lipase de *Candida rugosa*, Lipase de *Candida sp.* recombinante, expresso em *Aspergillus oryzae*, Amano Lipase M de *Mucor javanicus* e albumina de soro bovino (BSA) foram adquirida da Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Goma arábica foi adquirida da Synth® (São Paulo, SP, Brasil). O azeite de Carbonell baixa acidez (Córdoba, Espanha) foi comprado no comércio local (Alfenas MG e Itabuna BA, Brasil). Reagentes de eletroforese foram obtidos da Bio-Rad (Itapevi, Brasil). Os demais reagentes químicos e solventes orgânicos e foram adquiridos da Synth (São Paulo, SP, Brasil).

2.2 Métodos

2.2.1 Determinação da concentração de proteínas

As concentrações de proteínas das preparações enzimáticas comerciais foram determinadas pelo método de Bradford [36], a albumina de soro bovino (BSA), foi usada como padrão na construção da curva de calibração na faixa de 0 a 0,6 mg.mL⁻¹.

2.2.2 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica foi determinada de acordo com os métodos utilizando azeite e titulometria [37]–[39].

Em frascos de Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 5 mL do substrato preparado 15 g de azeite, 45 g de solução de goma arábica a 3% m/v) e 5 mL de solução tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7) e adicionado quantidade de 0,1 mL da enzima livre e 0,1 g de enzima em forma imobilizado separadamente e para o controle 0,1 mL de H₂O. A reação de hidrólise foi realizada a 37 ° C por 5 min em um agitador orbital QUIMIS (Diadema, BR) sob agitação (240 rpm). Após o período de incubação a reação foi interrompida pela adição de 10 mL de uma solução etanol a 95%. A concentração de ácidos graxos livres (FFA) liberado foi medido por titulação com NaOH 30 mM, usando fenolftaleína. Uma unidade de atividade de lipase (UI) foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto sob as condições do ensaio.

2.2.3 Imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos via adsorção física

O procedimento de imobilização via adsorção física foi realizado e adaptado de acordo com a metodologia descrito por Mendes e colaboradores [40]. O suporte Diaion

HP 20 (1 g) foi imergido em 25 mL de etanol (95%) sob condições estáticas por 24h em temperatura ambiente. Os suportes foram lavados com água destilada e filtrados em um funil de Buchner sob vácuo. Foi preparado 19 mL de solução enzimática (tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,0), contendo a proteína (carga proteica de 40 mg/g de suporte) e centrifugado em centrífuga CentriBio (Piracicaba, Brasil) a 4000 rpm por 10 min. Suportes úmidos foram incubados na solução proteica em um agitador orbital QUIMIS (Diadema, Brasil), (200 rpm) à temperatura ambiente (25°C) por 12h. Os biocatalisadores foram filtrados (papel de filtro Whatman) em um funil de Buchner sob vácuo, lavados com água destilada (relação de volume 1:5) e armazenados a 4°C por 24h antes da aplicação [40]. Todas as experiências foram realizadas em triplicata.

2.2.4 Cálculo dos parâmetros de imobilização

A concentração de proteína imobilizada (PI) foi determinada através da equação (Eq.1):

$$PI \text{ (mg/g)} = \frac{V \cdot (C_o - C_f)}{m} \quad (1)$$

Onde: PI: Proteína imobilizada, V: Volume da Solução, C_o: Concentração Proteína inicial; C_f: Concentração Proteína final e m: massa do suporte imobilizado.

A atividade hidrolítica foi medida através da equação abaixo (Eq.2):

$$AH \text{ (U/g)} = \frac{(V_a - V_b) \times M_{(NaOH)} \times 1000}{t \times m} \quad (2)$$

Onde: V_a = volume do NaOH da amostra titulada; V_b = volume do NaOH do branco titulado; M_(NaOH) = molaridade da solução padronizada do NaOH; t = tempo de reação; m (enzima) = quantidade da alíquota da solução enzimática que foi usada.

Para medir o rendimento de imobilização (Eq.3), e atividade específica foram aplicados às equações abaixo (Eq.4):

$$RI \text{ (%) } = \frac{(A_o - A_f)}{A_o} \times 100\% \quad (3)$$

Onde: A_o: Atividade Inicial e A_f: Atividade final.

A atividade específica foi medida conforme equação abaixo:

$$AE(U/mg) = \frac{AH}{PI} \quad (4)$$

Onde: AE: Atividade Específica, AH: Atividade Hidrolítica e PI: Proteína Imobilizada.

A variação da energia livre de Gibbs foi calculada como mostrado nas Eq. (5 e 6).

$$K_e = \frac{AH_{(imob)}}{AH_{(res)}} \quad (5)$$

Onde: K_e : Constante de equilíbrio, $AH_{(imob)}$: Atividade hidrolítica do sólido imobilizado e $AH_{(res)}$: Atividade hidrolítica do sobrenadante residual.

$$\Delta G \text{ (kJ/mol)} = RT \cdot \ln K_e \quad (6)$$

Onde: ΔG (kJ/mol): Variação da energia livre, R: constante dos gases ideais ($8,314 \times 10^{-3}$ kJ / mol.K), T: temperatura em Kelvin e $\ln(K_e)$: Logaritmo natural da constante de equilíbrio.

2.2.5 Análise eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Amostras contendo 20 μ l de proteínas e foram adicionadas a 5 μ l de tampão (glicerol 10% m/v, β -mercaptoetanol 5% m/v, SDS 2,3% m/v, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 M), desnaturadas no termociclador protômica por sete minutos e aplicadas no gel. Os géis de 12,5% m/v de SDS poliacrilamida [41]

Conforme metodologia de Laemmli [41], com 1 mm de espessura foram submetidos a uma corrente de 30 mA, com voltagem constante por 4 h, em um sistema de mini-gel GE Healthcare (Amersham Pharmacia Biotech - Reino Unido). Aplicamos o gel conforme Kirsch [42] em seguida os géis foram imersos em Coomassie Brilliant Blue e posteriormente digitalizados no scanner One touch, da Visioneer.

2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras do Diaion HP 20 foram fixadas a um suporte “Stub” e em seguida foram metalizadas com uma fina camada de ouro, cerca de 20 a 30 nm de espessura por um sistema de evaporação “sputtering” utilizando equipamento JSM-6610LV, da JEOL (Peabody, Massachusetts, USA), conforme procedimento padrão.

2.2.7 Produção de aromas

A síntese de ésteres de aroma por esterificação direta de ácidos carboxílicos e alcoóis em meio de solvente orgânico foram conduzidas em frascos fechados (frascos de Duran) de 25 mL, contendo 4 mL de meios reacionais. Foram preparados três meios reacionais, sendo o aroma de casca de maçã e citrus (butirato de hexila) preparado com ácido butírico e hexanol, o aroma de maçã e rosa (butirato de geranila) com o ácido butírico e geraniol e o aroma de damasco e abacaxi (butirato de propila), com ácido butírico e propanol. Todos os meio reacionais foram preparados na razão molar ácido:álcool de 1:1 (500 mM de cada reagente em meio ao solvente orgânico heptano). O biocatalisador imobilizado e os meios de reacionais (10% m/v) foram incubados em shaker orbital QUIMIS - BR com controle de temperatura 40 °C a 200 rpm e por 30 h. Alíquotas de 200 µL foram retiradas e diluídas em 10 mL da mistura etanol:acetona (1:1) (v/v) para a quantificação do ácido residual por titulação com solução de NaOH 30 mM, empregando fenolftaleína como indicador. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de conversão em ésteres foi determinada de acordo com a Eq. 7 para medir a concentração de ácido butírico residual após dado tempo de reação [43].

$$\text{Conversão (\%)} = \left(\frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \right) \times 100 \quad (7)$$

Em que: A_{inicial} e A_{final} é concentração de ácido graxo inicial e final no meio reacional (mM).

2.2.8 Testes de estabilidade do biocatalisador

A estabilidade e reutilização do biocatalisador foi realiados a partir da escolha do biocatalisador que obteve melhor rendimento de conversão nos ésteres testados,

aplicando as mesmas condições citadas em 2.2.4. Formam realizados 10 ciclos por 180 min. Ao final de cada ciclo o biocatalisador foi removido do meio reacional e lavado com hexano a frio. [20], [44].

2.2.9 Estatística

Todas as análises e procedimentos descritos anteriormente foram realizados em triplicata, e todos os valores foram expressos como média \pm DP. Microsoft Excel (2010) e Origin Pro 8.0 foram utilizado para realizar todas as análises estatísticas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Determinação da concentração de proteínas

Para caracterizar as enzimas estudadas (CRL, MJL e CALA) foram analisadas a concentração de proteínas que apresentaram resultados de 27,42 m/g para CRL, 126,10 m/g para MJL 17,70 m/g, para CALA conforme material suplementar.

Através dos dados apresentados o cálculo de carregamento enzimático de 40 mg/g de suporte, foi aplicado na imobilização das enzimas. O aumento da carga enzimática no processo de imobilização promove a aceleração da esterificação, mas levam a um custo mais alto [45], por isso a escolha da carga fixa para todas as enzimas estudadas.

3.2 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica foi medida para caracterizar as enzimas obtendo os seguintes resultados 37.591,20 U/g para CRL, 1.375,26 U/g MJL e 12.503,16 U/g CALA.

3.3 Imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos via adsorção física

O suporte Diaion HP 20 possui uma massa específica de $1,09 \text{ g/cm}^3$, diâmetro de partícula de 300 a 700 m, área de superfície específica de $500 \text{ m}^2/\text{g}$ e tamanho médio de poros de 170 Å (informações técnicas da Supelco), o que resulta em condições fundamentais para o processo de imobilização. A partir da cada proteica disponibilizada (40 mg/g de suporte), resultados obtidos de rendimento imobilização foram de CRL (75,5%), MJL (48,25%) e CALA (45,82%).

Tabela 1: Parâmetros de Imobilização de Diferentes Enzimas no suporte hidrofóbico Diaion HP 20

Enzima	PI (mg/g)	% RIAH _{sup}	AH (U/g _{sup})	AE (U/mg)	ΔG (kJ/mol)
CRL	30,2 ± 2,4	93 ± 0,6	126 ± 1,9	4,17 ± 0,04	-1,569
MJL	19,3 ± 0,1	100 ± 0,9	53,32 ± 3,4	2,76 ± 0,2	-9,85
CALA	18,33 ± 1,6	88,5 ± 0,5	64,04 ± 2,0	3,49 ± 0,8	-1,16

PI, Proteína imobilizada; RIAH, Rendimento de imobilização da atividade hidrolítica; AH, Atividade Hidrolítica observada no suporte; AE Atividade específica no suporte; ΔG, Variação de energia livre.

A carga de proteínas imobilizadas PI, foi observado o resultado com valor máximo para a imobilização da CRL (30,2 ± 2,4 mg/g de suporte), seguidos MJL > CALA, esse resultado evidenciam que os materiais porosos são geralmente preferidos em processo de imobilização, devido à sua alta área superficial, o que permite uma maior carga enzimática imobilizada [20].

As lipases imobilizadas demonstraram possuir diâmetro molecular menor que os poros presente no suporte, assim favorecendo o processo de imobilização, porém a diferença de percentual imobilizado está relacionado ao fato da afinidade da enzima com o suporte, em que a CRL se destacou [20] [46].

Estudos como o de Cunha e colaboradores [47] afirmaram que suportes à base de poliestireno, indicaram que a composição química do material pode exercer efeito significativo sobre desempenho do biocatalisador contribuindo para o processo de imobilização. Já Ferreira e colaboradores [32] imobilizou a lipase de *Geotrichum candidum* em Diaion Hp 20 e obteve PI de 28,54. Por fim Bassi e colaboradores⁽²⁰¹⁶⁾, imobilizou quatro enzimas: lipases de *Pâncreas porcino* (PPL), *Mucor javanicus* (MJL), *Candida sp.* (CALA), *Rhizomucor miehei* (RML) e *Thermomyces lanuginosus* (TLL) no suporte Diaion HP 20 e obteve carga de proteína imobilizada variando de 17,1 a 27,3 mg/g de suporte. Assim afirmando que os resultados obtidos são semelhantes e superiores aos demais relatados na literatura até o momento.

A atividade das enzimas CRL, MJL e CALA imobilizadas em suporte foi testada através da hidrólise da emulsão de azeite, onde a atividade desaparecida no sobrenadante da imobilização foi atribuída à adsorção de lipases na superfície de suporte. Conforme tabela 1, rendimento imobilizado da atividade hidrolítica RIAH foram apresentados de 93% CRL (34.802,60 U/mg), 100% MJL (1.375,26 U/mg) e 88,5% CALA (11.066,40 U/mg). A enzima CRL demonstrou que quase toda a atividade

da lipase disponível na solução enzimática foi imobilizadas no suporte por meio de adsorção física (ativação interfacial na superfície de suporte), confirmando a afinidade da enzima para o suporte hidrofóbico (Diaion HP 20).

A enzima MJL apresentou total imobilização da lipase no suporte, isso ocorreu devido ao mecanismo de ativação interfacial realizado pela lipase em superfícies altamente hidrofóbicas como a do suporte.

A literatura relata que lipases comerciais são comuns conterem outros compostos como uma baixa concentração de proteínas contaminantes em sua composição (proteínas e carboidratos) e no processo de adsorção ocorre à preferência de lipases por suportes hidrofóbicos o que é considerado um processo de purificação parcial de lipase durante a adsorção [48].

Com base nessa afirmação o processo de imobilização via adsorção física contribuiu para purificar a lipase MJL.

A atividade hidrolítica AH do suporte imobilizado apresentou valores baixos comparados à quantidade de atividade oferecida no processo de imobilização, isso deve a limitação difusional moléculas grandes do substrato (gotículas de azeite) para acessar a superfície interna do suporte, éo importante o contato superficial e áreas internas dos poros para medir a atividade hidrolítica das enzimas que encontra-se imobilizadas dentro desses poros, e conforme o resultado demonstrado na tabela 1, a atividade do suporte imobilizado não quantificou a atividade das enzimas que encontra-se imobilizadas nos poros do suporte. Bassi e colaboradores [20], definiu que esse tipo de resultado são explicados devido a adsorção de moléculas de enzimas estarem na superfície interna do suporte e a efeito de impedimentos estéricos. Os resultados também demonstraram que a AH da enzima CRL foi aproximadamente três vezes maior que a MJL e duas vezes maior que a CALA.

De acordo com os resultados exibidos na Tabela 1 e materiais suplementar a atividade específica AE iniciais (preparações de lipase livre líquida ou em pó) apresentaram valores de CRL $1.370,90 \pm 1,40$ UI/mg, MJL $10,90 \pm 1,60$ UI/mg e CALA $706,39 \pm 1,90$ UI/mg e após a imobilização os valores foram de CRL $4,17$ UI/mg $\pm 0,04$, MJL $2,76 \pm 0,2$ UI/mg e CALA $3,49 \pm 0,8$ UI/mg de unidades de enzimas / mg total de proteína. Valores de AE após a imobilização semelhantes a este também foram encontrados por Bassi e colaboradores [20] que antes da imobilização encontrou os valores de MJL $49,1 \pm 0,9$ UI/mg e CALA $50,1 \pm 1,7$ UI/mg) e após a

imobilização das enzimas via adsorção física em suporte Diaion HP 20 encontrou os valores MJL $1,21 \pm 0,06$ UI/mg e CALA $1,17 \pm 0,10$ UI/mg.

As variações desses resultados ocorrem possivelmente devido a algumas moléculas de lipase serem adsorvidas na área interna dos poros e por efeitos e impedimento estérico, não possibilitaram o contato com a gotícula de azeite que apresenta tamanho maior que a abertura dos poros do suporte. [20]. A atividade específica varia de acordo com o método imobilizado, como a influência pela natureza do suporte. [49]

A imobilização de lipase via adsorção é considerado um método, onde a diminuição a energia de ativação proporciona a espontaneidade do processo que é comprovado através dos valores encontrados pela energia de Gibbs, conforme esperado a imobilização realizada confirmaram serem processos espontâneos em que a imobilização de lipase via adsorção é considerado um método, onde a diminuição a energia de ativação proporcionando a espontaneidade do processo [48]. Devido a isso obtivemos o melhor resultado para o biocatalisador MJL-Diaion HP 20 valor $\Delta G - 9,85 \pm 1,2$ kJ/mol, confirmando a afinidade da lipase pelo suporte Diaion HP 20. Esse resultado é superior aos demais biocatalisadores, devido a atividade da enzimática e % RIAH ter sido completamente imobilizada no suporte, seguida dos bicatalisadores CRL-Diaion HP 20 e CALA-Diaion HP 20.

3.4 Análise eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

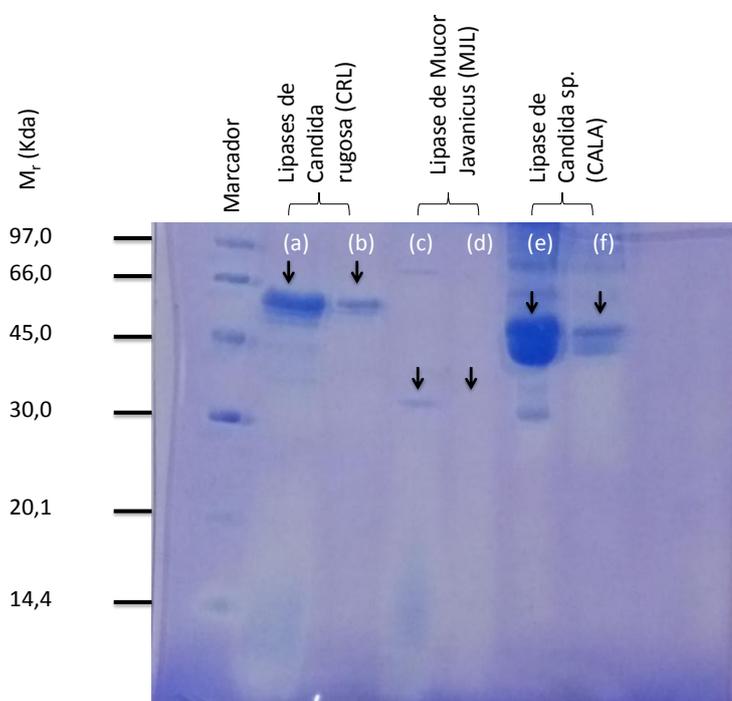
A figura 1 demonstra a presença de enzimas nos líquidos. Sendo o primeiro marcador alíquotas da solução enzimática antes de imobilizar e o segundo marcador referente ao sobrenadante após o processo de imobilização, nesta figura, a enzima CRL apresenta variações nas marcações (a) e (b) evidenciando a imobilização conforme os dados do RIAH de 93% enzima imobilizado. Observando as marcações (c) e (d), nota-se que o segundo marcador (d) para a lipase MJL não apresentou banda aparente o que confirma o RIAH de 100% enzima imobilizado e para a lipase CALA, comparando as marcações (e) e (f) também foi possível observar que houve imobilização conforme valores de RIAH de 88,5% enzima imobilizado. Essa análise confirma que houve imobilização efetiva das lipases no suporte.

Observamos também nessa figura que as massas moleculares foram representadas, sendo CRL de 58 kDa, Pernas e colaboradores [50] informou que a CRL possuem de 58 a 62 kDa, a enzima MJL apresentou 32 kDa e Garcia-Galan e

colaboradores [51], descreveram a massa molecular dessa enzima de 21 a 42 kDa e por fim a CALA apresentou a banda em 45 kDa e Kruis e colaboradores [52] afirmou que esta enzima possui massa molecular de 45 kDa. Também foi possível observar que essas enzimas apresentaram marcações de outras bandas, confirmando a presença de materiais contaminantes junto às enzimas estudada [48].

Na literatura também foram encontrados trabalhos semelhantes que utilizaram a análise de SDS-PAGE para confirmar o processo de imobilização em biocatalisadores. Rios e colaboradores [53] confirmaram a imobilização em biocatalisadores tendo por suporte glioxil-octilagarose e lipase *Pseudomonas fluorescens*. Também foi aplicado o método SDS-PAGE por Arana-Peña e colaboradores [54] usando as lipases *Candida antarctica* (CALB), lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) e *phospholipase Lecitase Ultra* (LEU) em suporte glioxil-octil agarose.

Figura 1: Perfil de eletroforese em Análise eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE das soluções enzimáticas: lipase de *C. rugosa* (CRL), lipase de *Mucor javanicus* (MJL) e lipase de *Candida sp.*(CALA). (a) CRL, (c) MJL e (e) CALA antes imobilização e (b) CRL, (d) MJL e (f) CALA após imobilização.



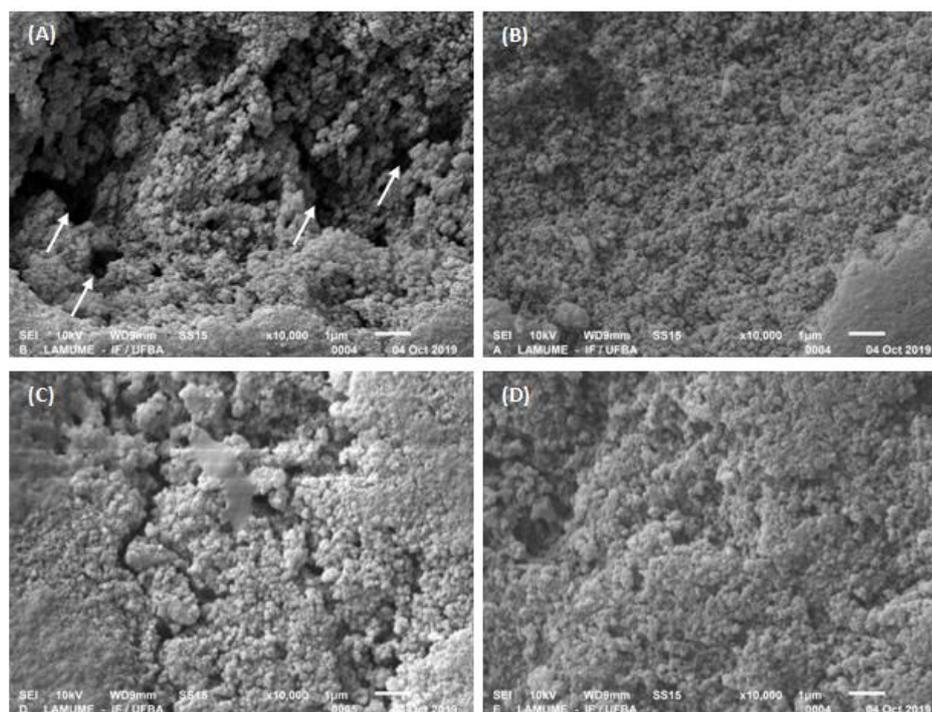
3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV) quando aplicado na imobilização é uma tecnologia pertinentes que pode avaliar a eficácia de uma determinada técnica de imobilização enzimática e desenvolvimento de futuras estratégias [55].

Neste trabalho a microscopia eletrônica de varredura demonstrou a estrutura do suporte e a interação suporte-enzimas. Conforme a imagem (Fig. 2A) o suporte Diaion HP 20 possui estrutura com superfícies porosas, que servem como locais de fixação para as enzimas. A figura (2B) a qual é referente à enzima CRL imobilizada nesse suporte, a figura permite observar que houve uma uniformidade na estrutura imobilizada preenchendo os poros com a enzima, comprovando o que foi obtido no valor calculado de proteína imobilizada PI ao qual foi superior as demais enzimas imobilizadas. A figura (2C) mostra a imobilizada da enzima MJL e a figura (2D) é referente a enzima CALA, em ambas foram observados na estrutura do suporte a presença das enzimas, devido ao preenchimento parcial de poros presentes no suporte. O conjunto de enzima e suporte passa a ser chamado de biocatalisador.

Trabalhos semelhantes também foram observados por Francolini e colaboradores [56], que aplicaram o MEV para medir o desempenho da imobilização da lipase de *Candida rugosa* em suportes de nanocompósitos magnéticos, observando agregados da enzima na superfície do suporte testado. Também foi possível observar o uso do MEV por Szokol e colaboradores [57] que aplicaram a técnica para visualizar a lipase amano em sílicas, demonstrando que as partículas do seu biocatalisador apresentaram monodispersão e imobilização efetiva.

Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura da resina adsorvente Diaion HP 20, usada como suportes hidrofóbicos na imobilização de enzimas: superfície dos poros da estrutura do Diaion HP 20 sem enzima imobilizada (A), com a enzima lipase de *C. rugosa* - CRL (B), com a enzima lipase de *Mucor javanicus* - MJL (C), e com a enzima lipase de *Candida sp.* - CALA (D) imobilizadas.



3.6 Esterificação enzimática

Os biocatalisadores CRL-Diaion HP 20, MJL-Diaion HP20 e CALA-Diaion HP20 foram testados em sínteses de esteres.

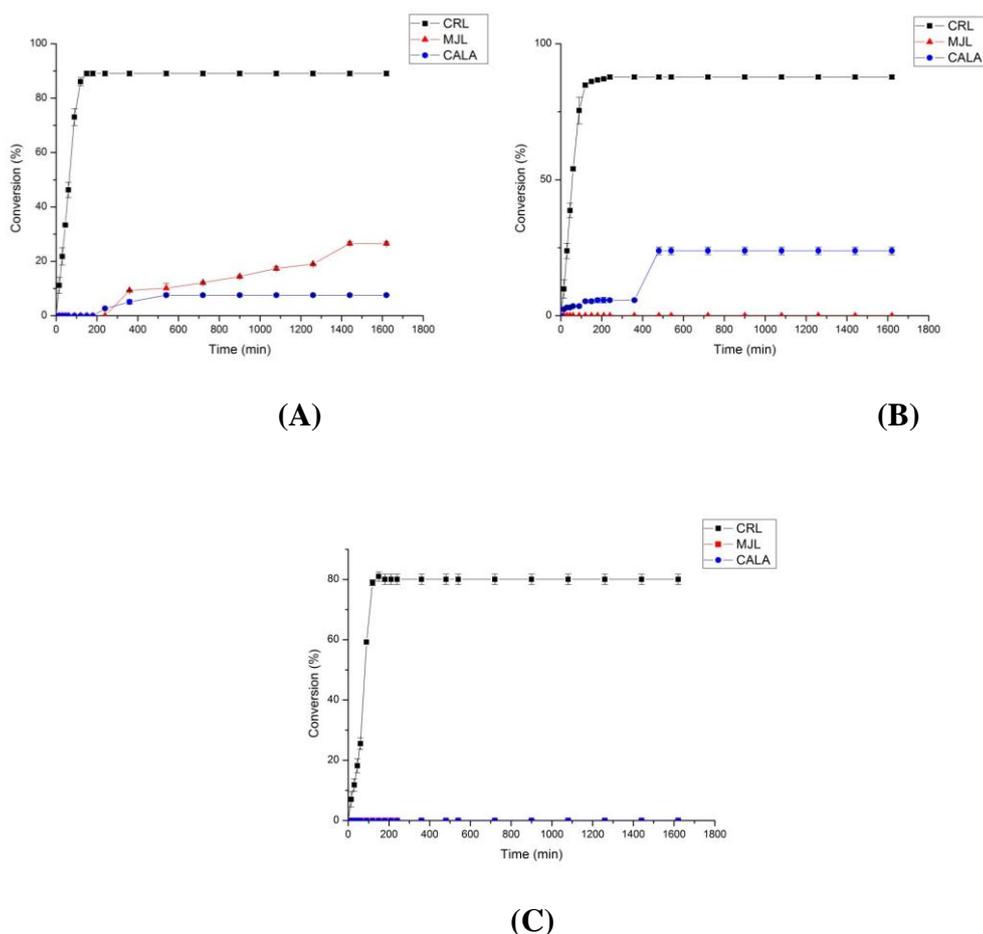
Os esteres de butirato hexila (aroma de casca de maçã e citrus), butirato de geranila (aroma de maçã e rosa) e butirato de propila (aroma de damasco e abacaxi), obtiveram resultados conforme figura 3). O biocatalisador CRL-Diaion HP 20 foi o mais eficiente, devido ao processo de imobilização em que foi o biocalizador com maior percentual de rendimento de imobilização e atividade hidrolítica [58], [59]. Tendo como resultados a conversão para as três reações de esteres (fig. 3A, 3B, 3C) ocorrendo em curto período de tempo sendo para o butirato de hexila 89,09% de conversão de éster em 150 min, butirato de geranila 87,33% em 240 min e butirato de propila 80,01% em 180 min). Corradini e colaboradores [58] também afirmaram que podem ocorrer

variabilidade na eficácia de enzimas de diferentes fontes, e conforme os diferentes tipos de alcoois (hexanol, geraniol e propanol) podem ter causado diferentes efeitos na síntese, sendo assim confirmados pelo resultados dos demais biocatalisadores, como o MJL-Diaion HP 20 a esterificação se mostrou eficiente na produção apenas da síntese de butirato de hexila com 26,58% de conversão de éster em 1.440 min, já o biocatalisador CALA-Diaion HP 20, foi efetivo para as reações de butirato de hexila, com baixo percentual de conversão de 7,58 % em 540 min e butirato de geranila 23,9% de conversão de éster em 480 min (material complementar).

Welsh e colaboradores [60] afirmaram que preparações de lipases de diferentes fontes, resultam em diferentes resultados, onde testaram 27 tipos de lipases comerciais, assim observaram a variação por afinidade no processo de esterificação de acetato de isopentil, butirato de etil e butirato de isopentil. Larios e colaboradores [61], utilizaram a lipase *candida antarctica* e obtiveram resultados de conversões de esteres também utilizando o ácido butírico (77 e 76% em 10 h, respectivamente), e estes afirmaram que diferenças de conversão está atribuído a possível diferença de polaridade entre álcoois que são usados nas reações de esterificação. Por sua vez Sá e colaboradores [59], justificam que a diferença de conversão está atribuídos a fonte da enzima, a imobilização (método e suporte), assim como ocorreu neste trabalho a utilização de três tipos de enzimas diferentes, assim podendo ter ocorrido a modificação das propriedades enzimáticas e atividades, ao qual em condições similares de reação afeta a eficiência do biocatalisador.

A figura 3, demonstra quão evidente e promissor o biocatalisador CRL-Diaion HP 20 se destaca nas três reações testadas.

Figura 3: Reações catalisadas por biocatalisadores CRL-Diaion HP 20, MJL-Diaion HP 20 e CALA-Diaion HP 20. Em sínteses de ésteres de aromas. As reações foram realizadas a 500 mM de cada reagente em meio de heptano, 40 ° C e concentração de biocatalisador de 10% m / v. Os valores são representados como média \pm desvio padrão de três repetições. (A) Butirato de Hexila, (B) Butirato de Geranila e (C) Butirato de Propila.



3.7 Testes de estabilidade operacional

O biocatalisador CRL-Diaion HP 20 configurou as melhores condições de síntese de butirato de hexila e devido a isso foi submetido a teste operacional.

O teste de estabilidade operacional foi realizado para determinar a capacidade que o biocatalisador tem de ser reutilizado em esterificação sucessivas. A figura 4 ilustra a estabilidade operacional do biocatalisador CRL-Diaion HP 20 testado por 6 ciclos sucessivos, assim determinando a capacidade que este biocatalisador tem de ser reutilizado em esterificação. A atividade máxima do biocatalisador (1º reação manteve 89,09% de conversão após 150 min de reação) foi definido como 100% de atividade

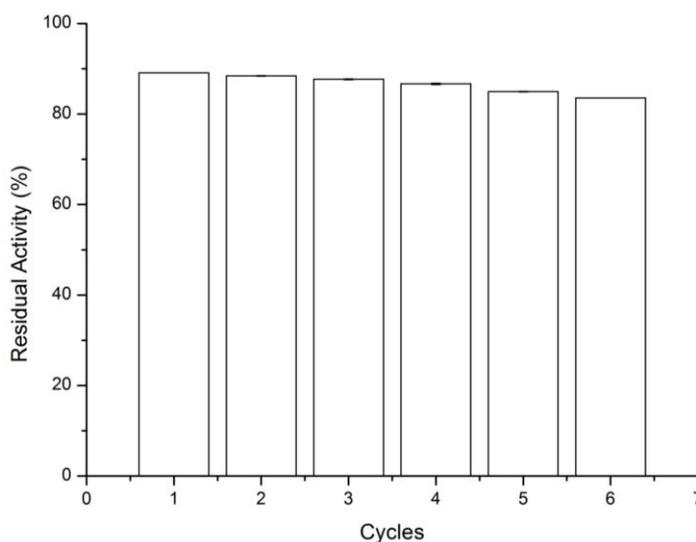
relativa. Assim a atividade após os 6 ciclos subredito obteve atividade de 93,8% da sua atividade inicial.

O processo de diminuição da atividade catalítica é comum, ao qual ocorre devido a inativação da enzima, por efeitos das moléculas reagentes, temperatura ou demais efeitos que podem promover a dessorção de algumas proteínas no suporte [58].

Esse resultado representa que a lipase CRL teve uma boa interação com a superfície do suporte Diaion HP 20, obtendo uma estabilidade na sua conformação, assim evitando o processo de dessorção ou inativação da enzima [11]. O resultado obtido configura que esse biocatalizador pode ser reutilizado por ser estável em ciclos de reuso.

Gao et al. [62] utilizaram a enzima CRL na imobilização por reticulação e testou a estabilidade da enzima imobilizada por 6 ciclos, obtendo o resultado atividade inicial de 80,5% da atividade inicial. Já Wu e colaboradores [63] utilizou a CRL imobilizada em sílica vesicular e o biocatalisador passou por 6 ciclos e obtendo 35% da atividade inicial, assim demonstrando ter baixa estabilidade, concluindo que isso ocorra devido a interações fracas entre suporte e enzima.

Figura 4. Estudos de reutilização de CRL-Diaion HP 20 após ciclos sucessivos de butirato de hexila síntese em meio heptano. As reações foram realizadas por 150 min de incubação a 500 mM de cada reagente, 40 ° C, 10% m / v de biocatalisador e agitação de 200 rpm. Todos os valores são representados como média \pm desvio padrão de três repetições.



4. Conclusão

O preparo dos biocatalisadores utilizando lipases em suporte Diaion HP 20 demonstrou eficiência devido as características porosas e a capacidade de aprisionar enzimas. O processo de imobilização das lipases de *Candida rugosa* (CRL), *Mucor javanicus* (MJL) e *Candida* sp. (CALA), permitiu a preparação de biocatalisadores ativos. O uso de métodos como SDS-PAGE e MEV confirmaram a imobilização das enzimas no suporte.

O biocatalisador CRL-Diaion HP 20 destacou por ser ativo para reação de esterificação. Obtendo resultados de conversão em sínteses de ésteres butirato de hexila (89,09%), butirato de geraniol (87,33%) e butirato de propila (80,01%), assim evidenciando a eficiência do biocatalisador CRL-Diaion HP 20 que por sua vez manteve 93,8% da sua atividade inicial após 6 ciclos sucessivos. Com base nos resultados obtidos da esterificação, podemos afirmar que o biocatalisador CRL-Diaion HP 20 é apropriado para aplicações em indústrias.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Laboratório Multiusuaria de Microscopia Eletronica – Lamume da Universidade Federal da Bahia UFBA, que disponibilizou o equipamento para serem realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura e a Universersidade Estadual de Santa Cruz, pelo espaço cedido. M. M. O. Santos gostaria de agradecer a CAPES por sua bolsa de estudo.

Referências

- [1] U. T. Bornscheuer, “Industrial Biotransformations,” *Biotechnol. Second. Complet. Revis. Ed.*, vol. 8–12, pp. 275–294, 2008.
- [2] J. M. Woodley, “New frontiers in biocatalysis for sustainable synthesis,” *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 21, pp. 22–26, 2020.
- [3] K. Pomeisl, N. Lamatová, V. Šolínová, R. Pohl, and J. Brabcová, “Bioorganic & Medicinal Chemistry Enantioselective resolution of side-chain modified gem - difluorinated alcohols catalysed by *Candida antarctica* lipase B and monitored by capillary electrophoresis,” *Bioorg. Med. Chem.*, no. October 2018, pp. 1–8, 2019.
- [4] H. Sun, H. Zhang, E. Lui, and H. Zhao, “Bioorganic & Medicinal Chemistry Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 26, no. 7, pp. 1275–1284, 2018.
- [5] A. Pellis, S. Cantone, C. Ebert, and L. Gardossi, “Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities,” *N. Biotechnol.*, vol. 40, pp. 154–169, 2018.
- [6] S. Simić *et al.*, “Development of an efficient biocatalytic system based on bacterial laccase for the oxidation of selected 1,4-dihydropyridines,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 132, no. July 2019, p. 109411, 2020.
- [7] R. C. Rodrigues *et al.*, “Immobilization of lipases on hydrophobic supports : immobilization mechanism , advantages , problems , and solutions,” *Biotechnol. Adv.*, no. April, pp. 0–1, 2019.
- [8] P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, M. E. Leser, and R. Miller, “Lipases at interfaces : A review,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 147–148, pp. 237–250, 2009.
- [9] M. Pohanka, “Biosensors and Bioassays Based on Lipases, Principles and Applications, a Review,” 2019.
- [10] M. S. Barbosa *et al.*, “Optimization of the enzymatic hydrolysis of *Moringa oleifera* Lam oil using molecular docking analysis for fatty acid specificity,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 66, no. 5, pp. 823–832, 2019.
- [11] N. S. Dosanjh and J. Kaur, “Immobilization, stability and esterification studies of a lipase from a *Bacillus* sp.,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 36, no. 1, p. 7, 2002.

- [12] P. F. Tamires Carvalho, Priscilla V. Finotelli, Renata C.F. Bonomo, Marcelo Franco and F. Amaral., "Evaluating Aqueous Two-Phase Systems for *Yarrowia lipolytica* Extracellular Lipase Purification," *Process Biochem.*, 2016.
- [13] T. D. Nalder, I. Kurtovic, C. J. Barrow, and S. N. Marshall, "Enzyme and Microbial Technology A simplified method for active-site titration of lipases immobilised on hydrophobic supports," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 113, no. December 2017, pp. 18–23, 2018.
- [14] A. G. B. Wanna *et al.*, "This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please see," *Laryngoscope*, pp. 2–31, 2014.
- [15] M. Cea, M. Eugenia, M. Abarzúa, and R. Navia, "Enzymatic esterification of oleic acid by *Candida rugosa* lipase immobilized onto biochar," *J. Environ. Manage.*, vol. 242, no. March, pp. 171–177, 2019.
- [16] B. H. Rosa *et al.*, "Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Application of partially concentrated *Candida rugosa* lipase in the enzymatic synthesis of geranyl acetate in organic solvent," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 12, no. June, pp. 90–95, 2017.
- [17] Y. Whulanza, S. Fauziyah, and E. Agus, "Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Use of *Candida rugosa* lipase as a biocatalyst for L-lactide ring-opening polymerization and polylactic acid production," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 16, no. September, pp. 683–691, 2018.
- [18] K. Kato, Y. Gong, T. Saito, and H. Kimoto, "Efficient Preparation of Optically Active Ketoprofen by *Mucor javanicus* Lipase Immobilized on an Inorganic Support," vol. 90, no. 3, pp. 332–334, 2004.
- [19] K. C. Badgujar and B. M. Bhanage, "Enhanced Biocatalytic Activity of Lipase Immobilized on Biodegradable Copolymer of Chitosan and Polyvinyl Alcohol Support for Synthesis of Propionate Ester: Kinetic Approach," *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2014.
- [20] J. J. Bassi *et al.*, "International Journal of Biological Macromolecules Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 92, pp. 900–909, 2016.
- [21] P. M. Neang, M. Subileau, V. Perrier, and E. Dubreucq, "Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Peculiar features of four enzymes of the CaLA

- superfamily in aqueous media : Differences in substrate specificities and abilities to catalyze alcoholysis,” *Journal Mol. Catal. B, Enzym.*, vol. 94, pp. 36–46, 2013.
- [22] A. J. Bäckvall, J. Löfgren, T. Görbe, and M. S. Humble, “Transesterification of a Tertiary Alcohol by Engineered *Candida Antarctica* Lipase A,” *J. Chem. Biol.*, 2019.
- [23] A. R. Aguilón *et al.*, “Immobilized lipase screening towards continuous- flow kinetic resolution of,” *Mol. Catal.*, vol. 467, no. September 2018, pp. 128–134, 2019.
- [24] K. L. Chang, T. C. Teng, C. K. Fu, and C. H. Liu, “Improving biodegradation of Bisphenol A by immobilization and inducer,” *Process Saf. Environ. Prot.*, vol. 128, pp. 128–134, 2019.
- [25] N. Kharrat, Y. Ben, S. Marzouk, Y. Gargouri, and M. Karra-châabouni, “Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption : Comparison with the free enzyme,” *Process Biochem.*, vol. 46, no. 5, pp. 1083–1089, 2011.
- [26] X. Zhao, M. Fan, J. Zeng, W. Du, C. Liu, and D. Liu, “Enzyme and Microbial Technology Kinetics of lipase recovery from the aqueous phase of biodiesel production by macroporous resin adsorption and reuse of the adsorbed lipase for biodiesel preparation,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 52, no. 4–5, pp. 226–233, 2013.
- [27] X. Zhao, F. Qi, C. Yuan, W. Du, and D. Liu, “Lipase-catalyzed process for biodiesel production : Enzyme immobilization , process simulation and optimization,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 44, pp. 182–197, 2015.
- [28] L. Dal, J. F. Kornecki, M. P. Klein, R. C. Rodrigues, and R. Fernandez-lafuente, “Enzyme and Microbial Technology Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 132, no. August 2019, p. 109397, 2020.
- [29] M. Stoytcheva, G. Montero, V. Gochev, and B. Valdez, “The Immobilized Lipases in Biodiesel Production,” *INTECHOPEN*, 2011.
- [30] A. Albino Gomes *et al.*, “Improved enzymatic performance of graphene-immobilized β -glucosidase A in the presence of glucose-6-phosphate,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 65, no. 2, pp. 246–254, 2018.

- [31] H. S. Shin and J. Kim, "Isotherm , kinetic and thermodynamic characteristics of adsorption of paclitaxel onto Diaion HP-20," *Process Biochem.*, vol. 51, no. 7, pp. 917–924, 2016.
- [32] M. M. Ferreira *et al.*, "Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies," vol. 67, no. January, pp. 55–63, 2018.
- [33] R. N. V. Bôas, A. A. Ceron, H. B. S. Bento, and H. F. De Castro, "Biomass and Bioenergy Application of an immobilized *Rhizopus oryzae* lipase to batch and continuous ester synthesis with a mixture of a lauric acid and fusel oil," *Biomass and Bioenergy*, vol. 119, no. March, pp. 61–68, 2018.
- [34] M. C. C. Corradini *et al.*, "Optimization of Enzymatic Synthesis of n-Propyl Acetate (Fruit Flavor Ester) – Effect of the Support on the Properties of Biocatalysts Optimization of Enzymatic Synthesis of n -Propyl Acetate (Fruit Flavor Ester) – Effect of the Support on the Propert," vol. 6445, no. September, 2016.
- [35] F. A. P. Lage, J. J. Bassi, M. C. C. Corradini, L. M. Todero, J. H. H. Luiz, and A. A. Mendes, "Enzyme and Microbial Technology Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 84, pp. 56–67, 2016.
- [36] M. M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding," vol. 254, pp. 248–254, 1976.
- [37] C. M. F. Soares, H. F. De Castro, F. F. De Moraes, and G. M. Zanin, "Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica," *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.*, vol. 77–79, pp. 745–757, 1999.
- [38] L. M. Todero *et al.*, "Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 38, no. 8, pp. 1601–1613, 2015.
- [39] M. T.P. Silva, L.O. Souza, N.S. Reis, S. A. Assis, M.L.O. Ferreira, J.R. Oliveira, E. Aguiar-Oliveira and Franco, "Redalyc.CULTIVATION OF *Penicillium*

- roqueforti IN COCOA SHELL TO PRODUCE AND CHARACTERIZE ITS LIPASE EXTRACT,” *Rev. Mex. Ing. Química*, vol. 16, 2017.
- [40] A. A. Mendes, P. C. Oliveira, A. M. Vélez, R. C. Giordano, R. D. L. C. Giordano, and H. F. De Castro, “International Journal of Biological Macromolecules Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 50, no. 3, pp. 503–511, 2012.
- [41] U. K. LAEMMLI, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,” *Nature*, vol. 227, 1970.
- [42] R. Kirsch and B. R. Oakley, “Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Polyacrylamide Gels Proteins in,” vol. 363, pp. 361–363, 1980.
- [43] M. D. Alves, F. M. Aracri, É. C. Cren, and A. A. Mendes, “Isotherm , kinetic , mechanism and thermodynamic studies of resin,” *Chem. Eng. J.*, 2016.
- [44] M. D. Alves, F. M. Aracri, É. C. Cren, and A. A. Mendes, “Isotherm , kinetic , mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin,” *Chem. Eng. J.*, vol. 311, pp. 1–12, 2017.
- [45] B. Geng, M. Wang, W. Qi, R. Su, and Z. He, “Cinnamyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in a solvent-free system,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 59, no. 4, pp. 270–275, 2012.
- [46] R. C. Alnoch *et al.*, “Immobilization and Characterization of a New Regioselective and Enantioselective Lipase Obtained from a Metagenomic Library,” pp. 1–18, 2015.
- [47] A. G. Cunha *et al.*, “Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica*: Effect of the support nature on catalytic properties,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 100, pp. 59–67, 2014.
- [48] A. L. Paiva, V. M. Balca, and F. X. Malcata, “Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases □,” vol. 27, pp. 187–204, 2000.
- [49] P. Adlercreutz, “organic media,” 2013.
- [50] M. A. Pernas, C. Lo, L. Pastrana, and M. L. Ru, “Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation,” vol. 84, pp. 163–174, 2000.
- [51] C. Garcia-galan, O. Barbosa, C. Ortiz, R. Torres, R. C. Rodrigues, and R. Fernandez-lafuente, “Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

- Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*,” *Journal Mol. Catal. B, Enzym.*, vol. 93, pp. 34–43, 2013.
- [52] A. J. Kruis *et al.*, “Microbial production of short and medium chain esters: Enzymes, pathways, and applications,” *Biotechnol. Adv.*, no. May, pp. 0–1, 2019.
- [53] N. S. Rios *et al.*, “Immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on glyoxyl-octyl-agarose beads: Improved stability and reusability,” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1867, no. 9, pp. 741–747, 2019.
- [54] S. Arana-Peña, C. Mendez-Sanchez, N. S. Rios, C. Ortiz, L. R. B. Gonçalves, and R. Fernandez-Lafuente, “New applications of glyoxyl-octyl agarose in lipases co-immobilization: Strategies to reuse the most stable lipase,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 131, pp. 989–997, 2019.
- [55] N. R. Mohamad, N. H. C. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, and R. A. Wahab, “An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes,” *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 29, no. 2, pp. 205–220, 2015.
- [56] I. Francolini, V. Taresco, A. Martinelli, and A. Piozzi, “Enhanced performance of *Candida rugosa* lipase immobilized onto alkyl chain modified-magnetic nanocomposites,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 132, no. July 2019, p. 109439, 2019.
- [57] B. Szokol, G. Hornyánszky, and J. Nagy, “Covalent immobilization of lipases on activated hollow silica microspheres,” *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem.*, vol. 64, no. 2 T1, pp. 69–78, 2019.
- [58] M. C. C. Corradini *et al.*, “Improvement of the enzymatic synthesis of ethyl valerate by esterification reaction in a solvent system,” *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 47, no. 1, pp. 100–109, 2017.
- [59] A. gomes A. Sá *et al.*, “Biocatalysis of aromatic benzyl-propionate ester by different immobilized lipases,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 41, no. 5, pp. 585–591, 2018.
- [60] F. W. Welsh, H. Dawson, and R. E. Williams, “Lipase Mediated Synthesis of Low Molecular Weight Flavor Esters,” vol. 55, no. 6, pp. 1679–1682, 1990.
- [61] A. Larios, H. S. García, R. María, and G. Valerio-alfaro, “Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase,” pp. 373–376, 2004.

- [62] S. Gao, Y. Wang, X. Diao, G. Luo, and Y. Dai, "Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 11, pp. 3830–3837, 2010.
- [63] C. Wu, G. Zhou, X. Jiang, J. Ma, H. Zhang, and H. Song, "Active biocatalysts based on *Candida rugosa* lipase immobilized in vesicular silica," *Process Biochem.*, vol. 47, no. 6, pp. 953–959, 2012.

Material suplementar

Tabela 2. Conteúdo de proteínas, atividade de lipase e estudo de atividade específica para lipases (CRL, MJL e CALA) livre e imobilizada, determinada a partir das soluções contendo proteínas e enzimas antes e depois do processo de imobilização.

Enzima	Teor de Proteína Total			Atividade Total da Lipase			Atividade Especifica da Lipase	
	Carga Inicial (mg/g)	Imobilizado (mg/g)	Proporção Imobilizado (%)	Carga Inicial (U/mg)	Imobilizada (U/mg)	Proporção Imobilizada (%)	Carga Inicial (U/mg)	Imobilizada Calculada (U/mg)
CRL	40	30,2 ± 2,4	75,5	37591,20 ± 0,20	34802,6 ± 0,2	93 ± 0,6	1370,90 ± 1,40	1152,4 ± 0,32
MJL	40	19,3 ± 0,1	48,25	1375,26 ± 0,03	1375,26 ± 0,3	100 ± 0,9	10,90 ± 1,60	71,25 ± 0,71
CALA	40	18,33 ± 1,6	45,82	12503,16 ± 2,40	11066,4 ± 0,2	88,5 ± 0,5	706,39 ± 1,90	682,11 ± 0,22

Os valores são dados como valor médio ± desvio padrão.

Tabela 3. Conversão de síntese de ésteres de ácido carboxílico de cadeia curta a 40°C durante 30 h, catalizados por suporte Diaion HP 20 e lipases comerciais CRL, MJL e CALA. Concentração da reação: 0,5 M em heptano para ácidos e álcoois.

Reagentes e Produtos				Conversão (%) por Biocatalizador		
Ácido	Álcool	FEMA Perfil de aroma ¹	GRAS Ref.	CRL-Diaion HP 20	MJL-Diaion HP 20	CALA-Diaion HP 20
Butírico	Hexanol	Casca de maçã e citrus	2568	89,09 ± 0,00	26,58 ± 0,01	7,58 ± 0,2
Butírico	Geraniol	Maça e rosa	2512	87,33 ± 0,19	0	23,9 ± 0,04
Butírico	Propanol	Damasco e abacaxi	2934	80,01 ± 0,67	0	0

¹ Flavor & Extract Manufactures Association (FEMA), available in <https://www.femaflavor.org/flavor-library>

CAPÍTULO III

METODOLOGIA DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR) APLICADA PARA MELHORIA DA SÍNTESE DE ÉSTER DE AROMA DE CASCA DE MAÇA E CITRUS (BUTIRATO DE HEXILA)

Marta Maria Oliveira dos Santos^a, Iasnaia Maria de Carvalho Tavares^a, Luiz Henrique Sales de Menezes^c, Marise Silva de Carvalho^c, Márcia Soares Gonçalves^a, Julieta Rangel de Oliveira^c, Adriano Aguiar Mendes^b, Marcelo Franco^{c*}.

^aDepartment of Exact Sciences and Natural, State University of Southwest Bahia, 45700-000, Itapetinga, Brazil.

^bInstitute of Chemistry, Federal University of Alfenas, 37130-001, Alfenas, Brazil

^cDepartment of Exact Sciences and Technology, State University of Santa Cruz, 45654-370, Ilhéus, Brazil.

*Corresponding Author: Phone = +55 073 3231 4158; Fax = +55 073 3680 5355;
e-mail = mfranco@uesc.br

Artigo será publicado no Journal of Wiley Online Library

METODOLOGIA DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR) APLICADA PARA MELHORIA DA SÍNTESE DE ÉSTER DE AROMA DE CASCA DE MAÇA E CITRUS (BUTIRATO DE HEXILA)

Marta Maria Oliveira dos Santos^a, Iasnaia Maria de Carvalho Tavares^a, Luiz Henrique Sales de Menezes^c, Marise Silva de Carvalho^c, Márcia Soares Gonçalves^a, Julieta Rangel de Oliveira^c, Adriano Aguiar Mendes^b, Marcelo Franco^{c*}.

^a*Department of Exact Sciences and Natural, State University of Southwest Bahia, 45700-000, Itapetinga, Brazil.*

^b*Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, 37130-001, Alfenas, Brazil*

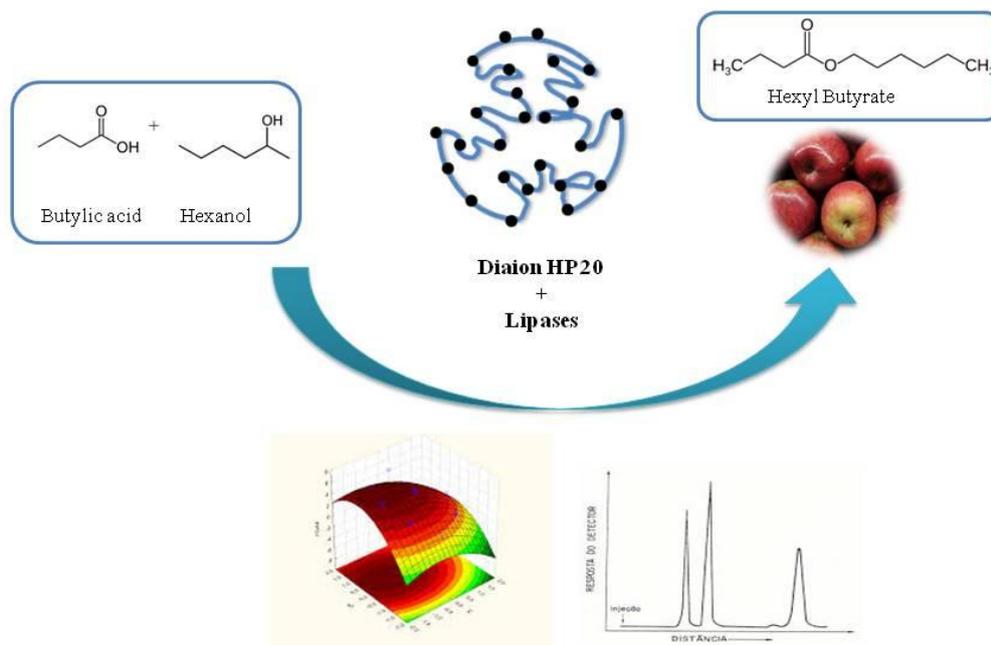
^c*Department of Exact Sciences and Technology, State University of Santa Cruz, 45654-370, Ilhéus, Brazil.*

Resumo

A produção do éster butirato de hexila (aroma casca de maçã e citrus) foi otimizado com o auxílio do planejamento experimental Box-Behnken, para avaliar o efeito de vários parâmetros do processo conversão de reação (temperatura, carregamento enzimático e razão molar). O biocatalisador aplicado foi preparado por adsorção física da lipase *Candida rugosa* (CRL) em suporte hidrofóbico (Diaion HP 20), obtendo o biocatalisador CRL-Diaion HP20. Através do experimento o aumento na conversão do éster de butirato de hexila aumentou conforme as combinações enperimental sendo determinadas pelo tempo: 60 min (proporção ácido/alcool 1:1,4, temperatura 47,25°C e carregamento enzimático 17,65%) previstos para 87,15% de conversão do éster, e o valor obtido foi de 90,86%, para 180 min (proporção ácido/alcool 1:2, temperatura 59,5°C e carregamento enzimático 15,8%) previstos para 100% de conversão do éster, e o valor obtido foi de 94,6%, para 480 min (proporção ácido/alcool 1:2, temperatura 47°C e carregamento enzimático 16,9%) previstos para 100% de conversão do éster, e o valor obtido foi de 95,01%. Assim a síntese de ésteres empregando MSR demonstrou ser promissor devido ajuste do modelo. O teste de reuso demonstraram que após dez ciclos o biocatalisador manteve atividade de 59,44, 44,63 e 25,99% , variando conforme o tempo (60, 180 e 480 min. O uso da cromatografia a gás confirmou o pico sendo o éster sintetizado butirato de hexila semelhante ao padrão.

Palavras-chave: Box-Behnken, biocatalisador enzimático, esterificação, ésteres de sabor.

Graphical Abstract



Keywords: Box-Behnken, enzymatic biocatalyst, esterification, flavor esters

Listas de Abreviaturas

BSA	Albumina de soro bovino
CG	Cromatografia gasosa
CRL	Lipase de candida rugosa
DIC	Detector de imobilização de chama
FFA	Ácidos graxos
MSR	Metodologia de superfície de resposta
PI	Proteína imobilizada
UI	Unidade internacional

1. Introdução

O butirato de hexila é um éster de cadeia curta e pertence ao grupo dos compostos aromatizantes de odores frutados chamados de notas verdes (Shieh & Chang, 2001), e atualmente são aplicados em alimentos, bebidas (Chang, Shaw, & Shieh, 2003) e produtos farmacêuticos, por possuir odor frutado de casca de maçã e citrus.

A obtenção desse éster tradicionalmente a partir das suas fontes naturais, porém estes não são geralmente utilizados, pois tem um custo elevado e baixo rendimento de extração consequentemente um maior gasto de matéria-prima (Gawas, Lokanath, & Rathod, 2018). Outra forma de obtenção é por via sintética, utilizando ácidos sulfúrico e para-tolueno-sulfônico como catalisador gerando um éster que não tem grande aceitação na indústria, por não serem considerados naturais. Ao serem sintetizados através reação de esterificação na presença ácido carboxílico, álcool, e presença de enzimas assim sendo considerados aromas produzidos através de uma rota verde (Gawas et al., 2018).

Em contrapartida os ésteres de sabores sintetizados a partir da utilização de enzimas são rotulados e semelhantes aos naturais e têm enorme demanda de mercado (Corradini et al., 2016). Assim a busca por tecnologias para produção de ésteres utilizando enzimas em processos industriais, favoreceu a busca por tecnologias da aplicação de enzimas com o objetivo de estabelecer padrões em sua qualidade e assim reduzir o consumo energético e impactos ambientais dos processos, (Fernandez-Lorente et al., 2008). Com isso, a imobilização dessas enzimas surge como a ferramenta que fornece a produção de um bicalisador potente, com características de não ser solúvel e ser um catalisador heterogêneo com reuso, facilidade para separação do produto final (Mateo, Palomo, Fernandez-lorente, Guisan, & Fernandez-lafuente, 2007).

A lipase (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) se destaca como enzima por sua importância, devido ao grande número de reações que são catalisadas por elas em sistemas orgânicos, com elevada estabilidade, e baixo custo comercial. (Meneses, A, Henrique, & Araújo, 2017), sendo capaz de catalisar a hidrólise como também reações de esterificação e transesterificação (dos Santos et al., 2020)

Precisamente, a lipase é um catalisador de enzimas proficiente devido à sua ampla variedade de substratos (Gawas et al., 2018; Jaiswal & Rathod, 2018) e também por seu potencial catalítico heterogêneo devido a suas características promissoras, como alta atividade, especificidade para substratos naturais e sintéticos e exigência de condições leves de reação (Bassi et al., 2016)

A síntese do éster de butirato de hexila pode se avaliada através de métodos estatísticos de análise multivariada, por se destacar em relação aos métodos univariados, pois é possível avaliar diferentes variáveis independentes, tais como temperatura, carga enzimática, rpm e tempo, além de minimizar o número de testes experimentais, assim reduzindo os custos (de Brito et al., 2017).

Com finalidade de melhorar o desempenho na produção da síntese do butirato de hexila (aroma de casca de maçã e frutas cítricas) e aumentar o rendimento do processo de produção sem aumentar o custo, a otimização a partir da ferramenta estatísticas metodologia da superfície de resposta (MSR) pode ser aplicado (Ba & Boyaci, 2007), sendo o design de Box-Behnken ferramenta capaz de definir melhores condições nas quais aplicar um procedimento que produz a melhor resposta possível (Almeida, Erthal, Padua, Silveira, & Am, 2008; Gawas et al., 2018).

O presente trabalho objetiva aplicar o biocatalisador obtido partir da enzima lípase de *Candida rugosa* (CRL) imobilizada no suporte Diaion HP 20 utilizados como catalisador na síntese de butirato de hexila, utilizando o design de Box-Behnken analisando os parâmetros que afetam a síntese catalisar tal como: a razão molar do substrato, a carga de enzima e a temperatura de reação.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

A Lipase de *Candida rugosa*, Ácido butírico, hexanol e de *Candida rugosa* contendo preparação de lipase com 40 mg de proteína = 18 mL de solução enzimática, foram adquirido da Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Partículas mesoporosas de Diaion HP 20, com média de diâmetros de 250–850 μm e tamanho de poro de 260 Å (Informações Técnicas Supelco), adquiridos da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Todos os outros reagentes químicos, incluindo solventes orgânicos hexano e heptano, foram de grau analítico fornecido pela Synth®. (São Paulo, SP, Brasil).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação de biocatalisadores por adsorção física em suporte hidrofóbico

O suporte Diaion HP 20 (19 g) foi submerso em 475 mL de solução de etanol (95%) por 24 h sob temperatura de 25°C. Após esse período o suporte foi filtrado com água destilada em funil de Buchner a vácuo. O suporte umedecido (19 g) foram inseidos em erlenmeyer de 500 ml contendo 361 mL de solução enzimática (14,06 mg de proteína em tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,0), esse material foi incubado em agitador orbital a 200 rpm e temperatura ambiente (25°C) por 12 h, seguindo a metodologia descrito por Mendes e colaboradores (2012). O material preparado foi filtrado em um sistema funil Buchner sob vácuo, lavado com água destilada (volume proporção 1:5) e armazenada a 4 ° C por 24 h antes do uso. Todas as experiências foram realizadas em triplica.

2.2.2 Determinação da atividade hidrolítica e parâmetros de imobilização

A determinação da atividade hidrolítica da lipase solúvel e imobilizada foi determinada na hidrólise da emulsão com azeite de oliva por titulometria (Carvalho et al., 2016). A emulsão/substrato foi preparada através da mistura de 15 g de azeite (0,5 de acidez da Carbonell, Córdoba, Espanha) com 45 g de solução de goma arábica a 3% m/v. Em erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 5 mL de emulsão e 5 mL de solução tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7 juntamente com 0,1 mL da solução enzimática ou 0,1 g de sólido com a enzima imobilizada. Essa mistura foi incubada em agitador orbital QUIMIS (Diadema, SP, Brazil) por 5 min a 37 ° C, sob agitação a 240 rpm. A reação foi interrompida por adição 10 mL solução etanol a 95%. A mistura foi titulada com uma solução padrão de NaOH 30 mM usando fenolftaleína como indicador. Ensaios de controle sem a adição da solução enzimática também foram realizada. Uma unidade internacional (UI) de atividade hidrolítica, foi definida como a massa de enzima necessário para liberar 1 mmol de ácidos graxos (FFA) por minuto de reação, nas condições experimentais descritas acima. A atividade hidrolítica foi determinada pela Eq. 1:

$$AH (U/g) = \frac{(V_a - V_b) \times M_{(NaOH)} \times 1000}{t \times m} \quad (1)$$

Onde: V_a = volume do NaOH da amostra titulada; V_b = volume do NaOH do branco titulado; $M_{(NaOH)}$ = molaridade da solução padronizada do NaOH; t = tempo de reação; m (enzima) = quantidade da alíquota da solução enzimática que foi usada.

A concentração de proteína imobilizada (PI) foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), sendo baseado pela ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à

proteína e monitorando a evolução da absorvância a 595 nm. A albumina de soro bovino (BSA), foi usada como padrão na construção da curva de calibração na faixa de 0 a 0,6 mg.mL⁻¹. Sendo calculado da seguinte forma (Eq. 2):

$$PI \text{ (mg/g)} = \frac{V \cdot (C_o - C_f)}{M} \quad (2)$$

Onde: PI: Proteína imobilizada, V: Volume da Solução, C_o: Concentração Proteína inicial; C_f: Concentração Proteína final e m: massa do suporte imobilizado.

2.2.3 Síntese de esterificação do aroma de casca de maçã e citrus (Butirato de hexila)

A configuração experimental consistiu em um frasco de vidro fechado (frascos de Duran) de 25 ml contendo um meio reaciona composto pela razão molar estequiométrica de n-hexanol e ácido butílico diluído em heptano. A reação foi iniciada pela adição do biocatalizador CRL-Diaion HP 20 e 6 mL do meio reacional em agitador orbital QUIMIS (Diadema, SP, Brazil) sob agitação contínua de 200 rpm, por temperatura controlada. Alíquotas de 200 µL foram retiradas e diluídas em mistura etanol:acetona (1:1) para a quantificação por titulação do ácido butílico residual. O método de titulação foi aplicado usando a solução de NaOH 30 mM, empregando fenolftaleína como indicador. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A conversão em ésteres foi determinada pela Eq. 3 (Alves, Aracri, Cren, & Mendes, 2016).

$$Conversão (\%) = \left(\frac{A_{inicial} - A_{final}}{A_{inicial}} \right) \times 100 \quad (3)$$

2.2.4 Design experimental Box-Behnken

A otimização da conversão do éster de butirato de hexila de acordo com a metodologia do projeto experimental, foi aplicado o design Box-Behnken, a matriz consistia em 15 experimentos (Tabela 1), incluindo três repetições no ponto central. Os níveis das variáveis foram escolhidos com base em ensaios preliminares e estudos anteriores realizados no nosso laboratório e de parceiros (Gawas et al., 2018). As variáveis independentes (fatores) analisadas foram: Temperatura (30, 45, 60 °C), % biocatalisador (1, 10, 19%) e razão molar (ácido:álcool) (1:2, 1:1, 2:1). A partir dos valores experimentais obtidos em resposta, um modelo em condições ótimas para Z foram validadas experimentalmente em triplicado. As

reações foram realizadas utilizando 500 mM de cada reagente sob agitação contínua num agitador orbital variando a o tempo de 60 min, 180 min e 480 min. A percentagem de consumo de ácido foi tomado como a resposta. O nível de significância estatística do modelo gerado foi avaliado pela análise de (ANOVA, $p < 0,05$), e os coeficientes de regressão foram avaliados a partir do teste de Fisher (F - teste) valoriza a nível significância 5%, e a qualidade do modelo avaliado pelo coeficiente de R^2 , e o coeficiente de determinação ajustado (R^2 -adj).

Os resultados foram analisados usando o software Statistica versão 12.5 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Tabela 1: Matriz Box-Behnken com os valores reais e codificados para os variáveis temperatura ($^{\circ}$ C), biocatalisador (% m/v) e razão molar (ácido:álcool) para a síntese de butirato de hexila em 60, 180 e 480 min.

N ^o Ensaios	Variáveis			Tempo					
	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Carregamento enzimático (% m/v)	Razão molar (ácido:álcool)	60 min		180 min		480 min	
				Conversão atual (%)	Conversão Predito (%)	Conversão atual (%)	Conversão Predito (%)	Conversão atual (%)	Conversão Predito (%)
1	-1 (30)	-1 (1)	0 (1:1)	08,20 \pm 0,19	9,97	08,22 \pm 1,56	14,31	37,14 \pm 2,04	40,06
2	1 (60)	-1 (1)	0 (1:1)	28,10 \pm 0,35	29,79	24,29 \pm 1,03	24,57	40,00 \pm 2,54	37,71
3	-1 (30)	1 (19)	0 (1:1)	85,71 \pm 0,10	84,02	84,29 \pm 0,78	84,01	80,00 \pm 1,74	82,29
4	1 (60)	1 (19)	0 (1:1)	82,86 \pm 0,11	81,09	81,43 \pm 0,96	75,34	84,29 \pm 2,02	81,37
5	-1 (30)	0 (10)	-1 (1:2)	52,30 \pm 0,04	54,09	86,96 \pm 1,03	79,58	92,75 \pm 1,79	83,8
6	1 (60)	0 (10)	-1 (1:2)	67,60 \pm 0,21	69,47	91,30 \pm 2,34	89,74	88,41 \pm 0,67	84,67
7	-1 (30)	0 (10)	1 (2:1)	44,60 \pm 0,64	42,73	53,96 \pm 0,89	55,52	43,17 \pm 0,82	46,91
8	1 (60)	0 (10)	1 (2:1)	46,04 \pm 1,58	44,25	39,57 \pm 2,04	46,95	33,81 \pm 1,92	42,76
9	0 (45)	-1 (1)	-1 (1:2)	13,04 \pm 0,07	9,48	14,50 \pm 1,93	15,79	28,98 \pm 2,05	35,01
10	0 (45)	1 (19)	-1 (1:2)	81,16 \pm 1,67	81,06	89,86 \pm 1,47	97,52	94,20 \pm 2,33	100,86
11	0 (45)	-1 (1)	1 (2:1)	00,00 \pm 0,00	0,10	11,51 \pm 0,96	3,86	25,18 \pm 1,89	18,52
12	0 (45)	1 (19)	1 (2:1)	50,30 \pm 0,53	53,86	43,88 \pm 1,65	42,60	44,60 \pm 0,07	38,57
13	0 (45)	0 (10)	0 (1:1)	70,00 \pm 0,79	71,43	80,50 \pm 1,35	80,83	82,86 \pm 1,03	81,91
14	0 (45)	0 (10)	0 (1:1)	72,86 \pm 1,02	71,43	81,20 \pm 0,86	80,83	81,43 \pm 0,81	81,91
15	0 (45)	0 (10)	0 (1:1)	71,43 \pm 0,98	71,43	80,80 \pm 1,07	80,83	81,43 \pm 0,05	81,91

2.2.5 Teste de reutilização

Para os teste de reutilização foram realizados 10 ciclos, em que a partir do tempo ótimo de cada design Box-Behnken e aplicado a metodologia descrita em 2.2.3 ao reuso, sendo que após a conclusão de cada reação de esterificação, o biocatalisador foi recuperado por filtração em um Funil de Buchner sob vácuo, lavado com hexano refrigerado (200 mL) para remover o reagente residual ou as moléculas do produto acumulado em seu microambiente e, posteriormente, usado para a próxima reação. O rendimento da conversão foi determinado no final de cada ciclo (Bassi et al., 2016).

2.2.6 Purificação do éster (butirato de hexila)

O biocatalisador foi separado do meio reacional por filtração em funil Buchner sob vácuo. O sobrenadante foi transferido para o funil de gotejamento de 50 mL, para remoção do ácido butílico e álcool hexanol foram realizados através de lavagem com água destilada a 50 ° C por 5 vezes. O éster purificado ainda com água foi seco por 24 horas em temperatura ambiente 25° C, usando 20% (m/v) do sal sulfato de magnésio seco em agitador orbital QUIMIS (Diadema, SP, Brazil) com rotação de 200 rpm.

2.2.7 Cromatografia gasosa

A conversão do butirato de hexila foi confirmada por GC usando Cromatógrafo Gasoso GC-2010 Plus - SHIMADZU (kyoto – Japão)- equipado com um detector de ionização de chama (DIC), uma coluna de enchimento Restek (0,25 mm de diâmetro, 0,25 µm de comprimento). A temperatura da coluna: 260 °C e temperatura do DIC 250 °C , sendo a temperatura inicial:100 °C em 1 min até 170 °C em 2 min com r = 5, em seguida, a temperatura constante. O tempo de corrida foi de 17 min. O método de cromatografia de gás foi utilizado para a identificação do produto.

2.2.8 Estatística

Todas as análises e procedimentos descritos anteriormente foram realizados em triplicata, sendo os resultados obtidos submetidos à análise de variância (ANOVA), e todos os valores foram expressos como média ± DP. GraphPad Prism (2007) , Microsoft Excel (2010) e Statistica versão 12.5.

3. Resultados e discussão

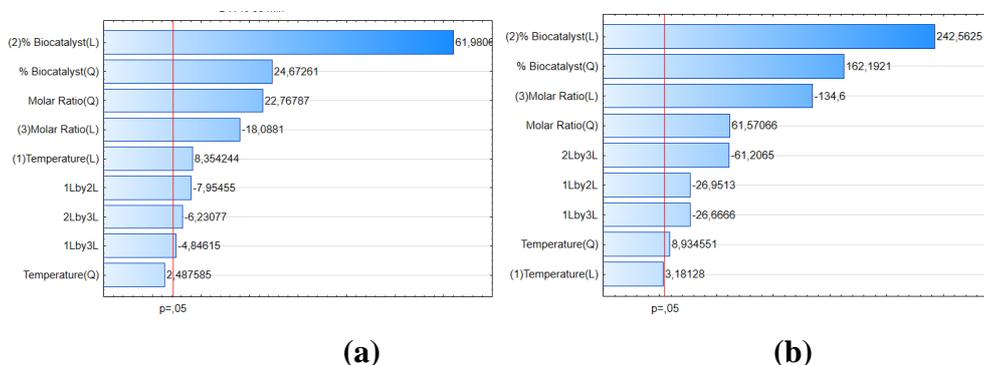
3.1 Determinação da atividade hidrolítica e parâmetros de imobilização

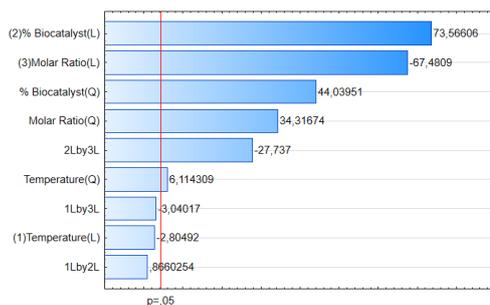
As propriedades catalíticas dos biocatalisadores preparados foram primeiramente determinada a partir de uma carga inicial oferecida de 40 mg por grama de suporte, obtendo o resultado de proteína imobilizada de 29,7 mg/g correspondendo a 74,2%. A atividade de hidrolítica da emulsão de azeite apresentou 32.157,6 U/mg de imobilização correspondente a 92,4% no suporte Diaion HP 20.

3.2 Otimização da síntese do butirato de hexila pelo planejamento Box-Behnken

Para análise da produção de butirato de hexila, se fez necessário a realização de três superfícies de respostas. O diagrama de Pareto (Figura 1) para a produção de ésteres em tempos variados 60, 180 e 480 min, demonstram que os comprimentos das barras são proporcionais à influência relativa desse fator sobre a análise. Isto significa que as interações das variáveis em duas dimensões (2D) foram significativas para o nível de confiança de 95%, comprovando o ajuste do modelo, sendo os termos quadráticos significativos. O diagrama de Pareto demonstrou que a % do biocatalisador foi a variável que demonstrou maior influência no processo de otimização do éster butirato de hexila. A razão molar do ácido: álcool sugere que a variável investigada foi importante para produção do butirato de hexila. A variável temperatura demonstrou ser significativa para a figura 1(a) (tempo de 60 min) e (b) (tempo de 180), enquanto para figura 1 (c) (tempo de 480 min) a temperatura não foi um variável influente.

Figura 1. Diagrama de Pareto, (a) 60 min, (b) 180 min e (c) 480 min.





(c)

Assim os termos não significativos foram removidos do modelo. Assim um novo modelo foi construído por análise de regressão e submetido a ANOVA ($p < 0,05$) (Tabela 2) para os respectivos tempos 60, 180 e 480 min. A aceitabilidade e significância deste modelo foram verificados pelo teste F (valores de F calculado maior que F tabelado), realizados pelo modelo ANOVA conforme na Tabela 3.

Observado a tabela foi possível verificar a aproximação dos valores reais aos valores previstos, o que mostra que os resíduos eram relativamente baixos e distribuídos aleatoriamente, tornando o modelo válido para construção da superfície de resposta e previsão das regiões desejadas.

Os valores de R^2 (60 min - 0,986, 180 min - 0,938 e 480 min - 0,890) demonstraram, que houve uma boa correlação entre os resultados experimentais e valores previstos, com os valores de R^2 -adj (60 min - 0,995, 180 min - 0,978 e 480 min - 0,961) próximo aos valores de R^2 , destacando a significância do modelo.

Já as equações 1, 2 e 3 representam os modelos reduzidos, ajustados com base no modelo experimental em que o rendimento representado por Z = conversão de éster produzido (resposta) enquanto as variáveis independentes como x = temperatura, y = % biocatalisador e k = razão molar são valores codificados. Respectivamente nos tempos 60 min (Eq.1), 180 min (Eq.2) e 480 min (Eq.3):

$$Z = 71,43 + 31,34y + 4,33x^2 - 2,89x^2 + 19,29y - 9,09xy - 17,97xy^2 - 5,75xk \quad \text{Eq.(1)}$$

$$Z = 80,83 + 0,39x - 1,63x^2 + 30,11y - 29,64y^2 - 4,73xy - 4,68k - 10,74y \quad \text{Eq.(2)}$$

$$Z = 81,91 + 21,47y - 18,92y^2 - 19,69x - 14,74x^2 + 11,45kx \quad \text{Eq.(3)}$$

Tabela 2. Análise de variância para ajuste do modelo quadrático com um nível de confiança de 95 %. Em tempos de (60, 180 e 480 minutos)

Tempo 60 min					
Fonte de variação	SS	df	MS	F calc.	F tab.
Modelo	11037.51	9	1226,4	111,83	4,772
Resíduo	54,83	5	10,97		
Erro puro	4,09	2	2,045		
Total	11092,3	14			
R ²	0,995				
R ² -adj	0,986				

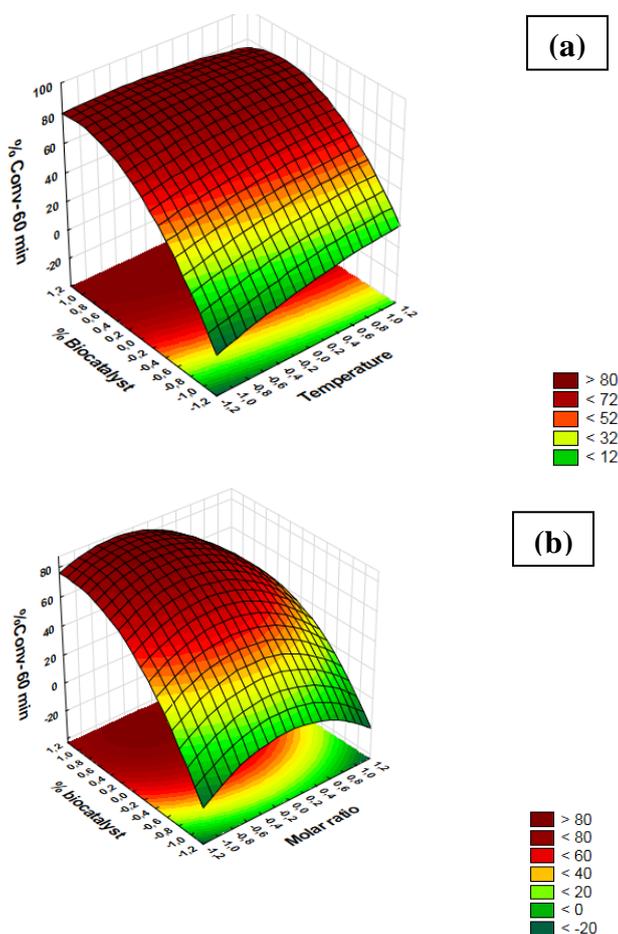
Tempo 180 min					
Fonte de variação	SS	df	MS	F calc.	F tab.
Modelo	13681.21	9	1520.13	24,61	4,772
Resíduo	308.88	5	61.78		
Erro puro	0,25	2	0,123		
Total	13990,1	14			
R ²	0,978				
R ² -adj	0,938				

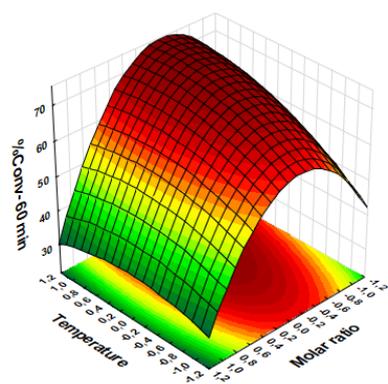
Tempo 480 min					
Fonte de variação	SS	df	MS	F calc.	F tab.
Modelo	9307.63	9	1034.18	13,65	4,772
Resíduo	378.82	5	75.76		
Erro puro	1.36	2	0,68		
Total	9686.44	14			
R ²	0,961				
R ² -adj	0,890				

SS - Soma quadrática; df - grau de Liberdade; MS - media quadrática

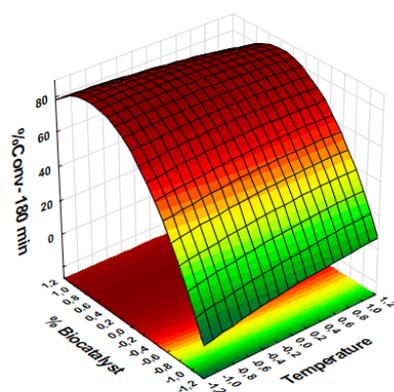
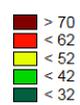
Os gráficos da superfície de resposta na figura 2, elaborados a partir das equações 1, 2 e 3 ilustram o efeito das variáveis e suas interações. As superfícies geradas a partir do modelo indicam que as condições experimentais analisadas estão dentro das áreas de rendimento máximo do éster.

Figura 2. Superfície de resposta entre as variáveis independentes: temperatura, % biocatalisador e razão molar. Nos tempos 60 min (a), (b) e (c), 180 min (d), (e) e (f) e 480 min (g), (h) e (i). As figuras foram obtidas no STATISTICA® v.12.

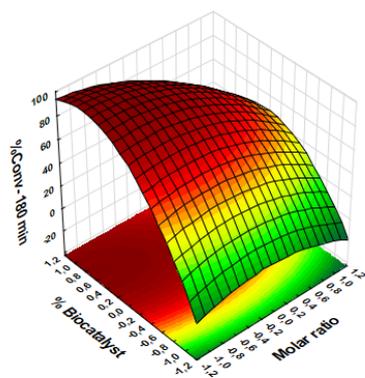
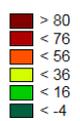




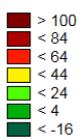
(c)

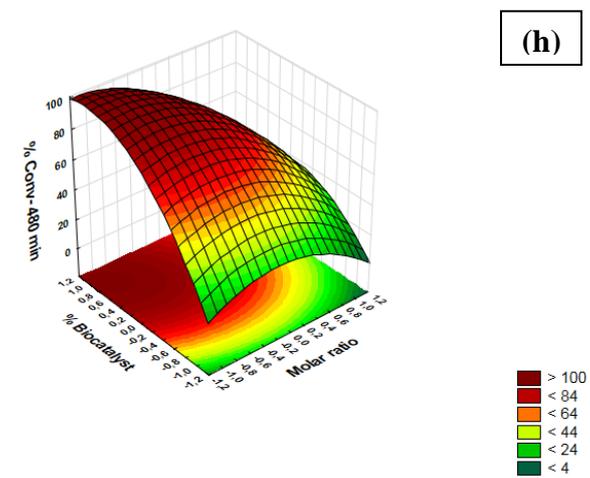
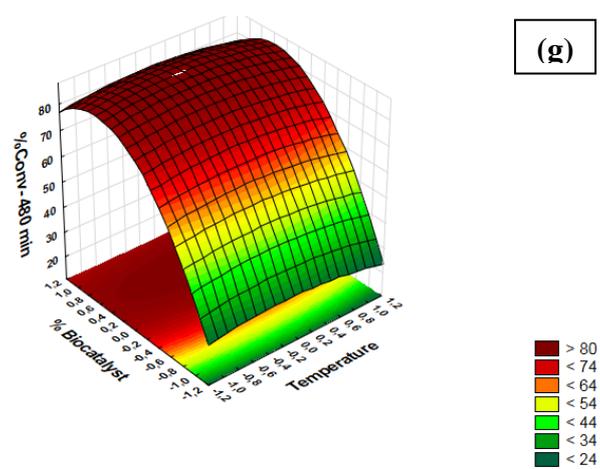
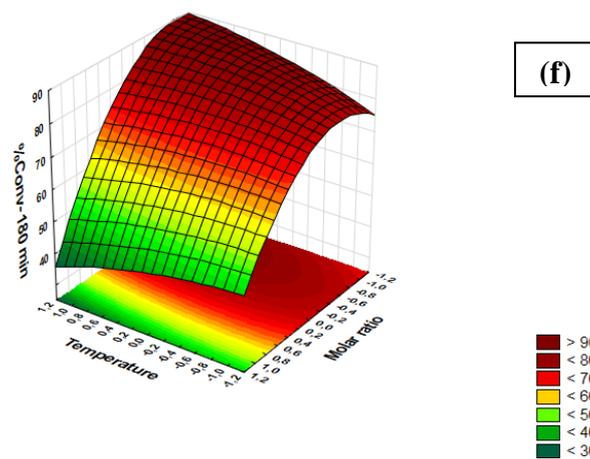


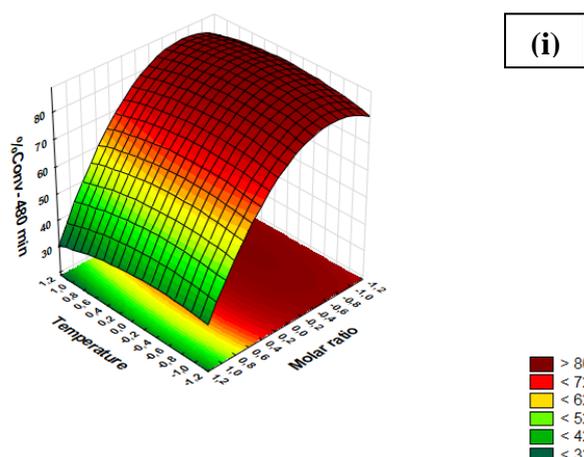
(d)



(e)







Sendo assim a partir dos resultados teóricos, foi possível prever um valor máximo para rendimento de butirato de hexila nos tempos de 60, 180 e 480 min. A tabela 3 informa os valores teóricos e reais validando (triplicata) pelo modelo estatístico.

Tabela 3: Modelo proposto pela MSR com pontos ótimos decodificados em diversos tempo.

Variáveis	Pontos Ótimos			% Pred.	% Obs.
	60 min	180 min	480 min		
Temperatura (°C)	0,16 (47,25)	0,97 (59,5)	0,15 (47,0)	87,15	90,86
Biocatalisador (% m/v)	0,86 (17,65)	0,66 (15,8)	0,88 (16,9)	100,00	94,50
Razão molar (ácido:álcool)	-0,42 (1:1,4)	-1 (1:2)	-1 (1:2)	100,00	95,01

Assim o modelo determinou que o ponto ótimo obtido (Tabela 3) para o tempo de 60 min apresentou porcentagem de conversão teórica de 87,15%, aplicando condições fornecidas o resultado obtido foi de 90,86%, semelhante ao previsto conforme Eq. (1). Para o tempo de 180 min a conversão prevista foi de 100%, aplicada as condições o que também se assemelha ao previsto obtivemos 94,5%, o que também se assemelha ao previsto conforme Eq. (2). Por fim, no tempo de 480 min o modelo predisse 100%, aplicarmos as condições a conversão foi de 95,01%, semelhante ao previsto conforme Eq. (3). Podendo afirmar que o modelo fornecido pelo design Box-Behnken prevê a conversão percentual apropriada.

Em termos de comparação Chang e colaboradores (2003) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para produção do éster de butirato de hexila, usando como biocatalisador a lipase (Lipozyme IM-77) de *Rhizomucor miehei*

imobilizada em resina aniônica fraca macroporosa. Estes obtiveram as condições ideais de síntese em tempo de reação 8,3 h, temperatura 50 °C, quantidade da carga enzimática de 42,7%, proporção de quantidade de substrato (em mol) 1,8: 1. O valor previsto era de 96,2% e o valor experimental real de 95,3% da quantidade (em mol) conversão. Comprando o resultado da literatura podemos observar que Chang e colaboradores (2003) necessitaram de duas vezes mais a quantidade de biocatalisador para a produção de 95% de éster. Enquanto que no presente trabalho foram realizados com valores menores que 19% de biocatalisador foi possível produzir a mesma quantidade de éster.

Para a indústria o tempo é um fator determinante, onde em comparação com os tempos de reação obtidos no trabalho deste mesmo autor, podemos concluir que no nosso tempo foi um fator que não determinou grandes alterações. Em 1 hora de reação obtivemos produção máxima do éster que de 91% enquanto em 8 horas a produção máxima foi de 95%. A temperatura (50 °C) encontrada por Chang e colaboradores (2003) como ponto ótimo, foi semelhante ao que encontramos em nossa trabalho (47 – 59 °C). Quanto a razão molar os valores relatados também foram semelhantes aos encontrados nesse trabalho.

3.3 Reuso

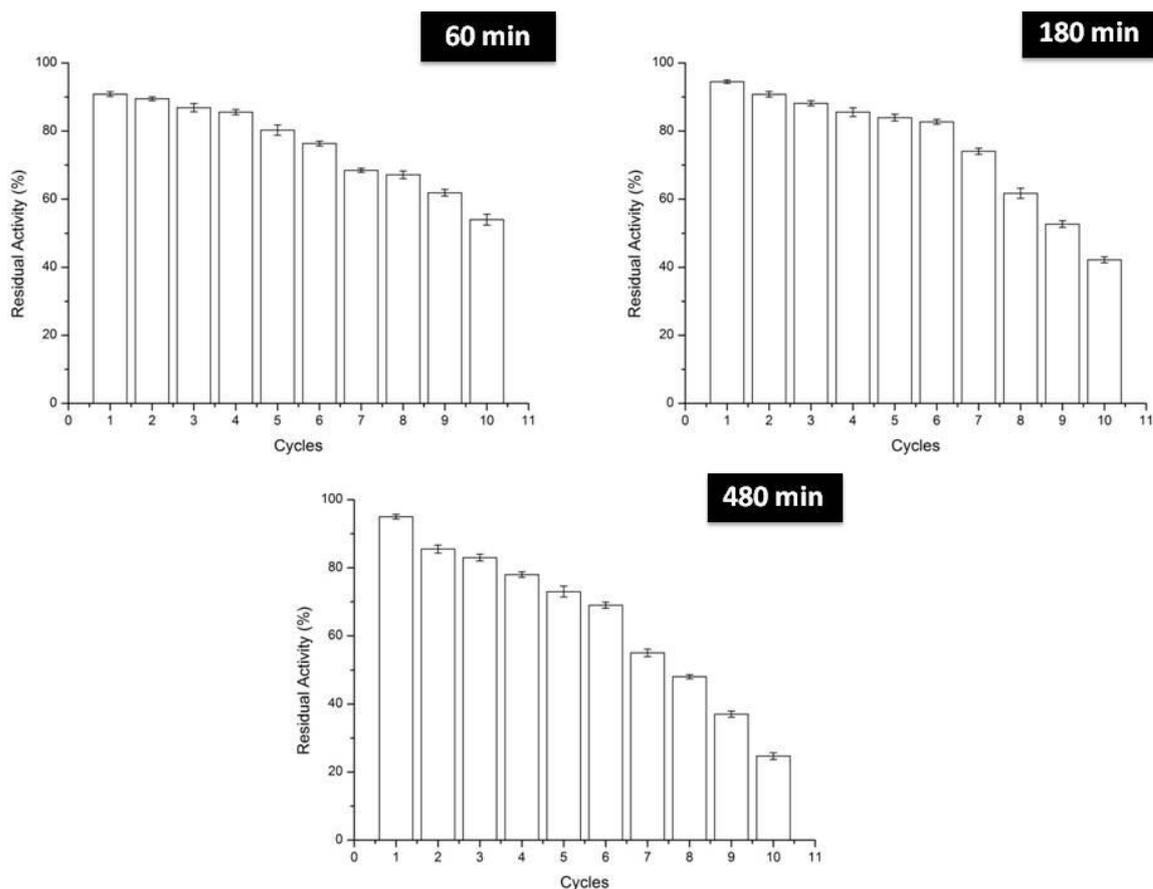
Neste estudo, os testes de reutilização foram realizados para determinar a capacidade que o biocatalisador tem de ser reutilizado em esterificação sucessiva. As reações foram realizadas sob condições experimentais ideais informadas pelo designer Box-Behnken.

A Figura 3 mostra a variação da atividade relativa do biocatalisador após dez ciclos sucessivos. Para o tempo de 60 min observamos que o biocatalisador no primeiro ciclo o biocatalisador obteve 90,86 % de conversão foi definido como 100% de atividade relativa. No termino do décimo ciclo o biocatalisador ainda reteve 59,55% da atividade inicial. No tempo de 180 min, o biocatalisador obteve 94,5% de conversão no primeiro ciclo e no décimo ciclo o biocatalisador reteve ainda 44,63% da atividade inicial e por fim no tempo de 480 min a conversão inicial foi de 95,01% e no termino do décimo ciclo o biocatalisador manteve 25,99% da atividade inicia.

Observamos o declínio na perda da atividade de acordo com o tempo que o biocatalisador fica exposto a reação. A redução da atividade catalítica pode ser atribuído à inativação das moléculas enzimáticas influenciado pela temperatura. Esses resultados estão em concordância com estudos anteriores relatados na literatura para testes de

reutilização da síntese enzimática de ésteres de (dos Santos et al., 2020; Gawas et al., 2018).

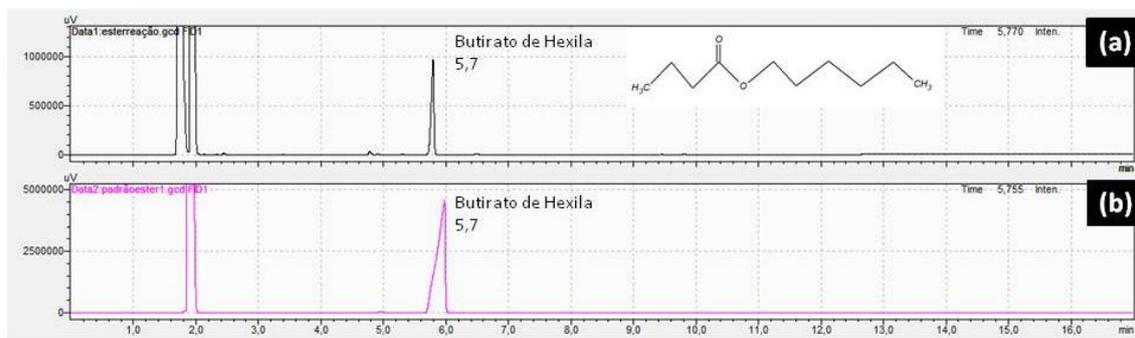
Figura 3. Testes de reutilização da reação de esterificação do éster butirato de hexila, catalisada por CRL – Diaion HP 20 após dez reações consecutivas em sistemas descontínuos. As reações foram realizadas nas condições ótimas informada pelo modelo de designer Box-Behnken. Todos os valores são representados como desvio padrão médio de três repetições.



3.4 Cromatografia gasosa

Gromatografia gasosa (CG) é realizada por técnicas analíticas baseadas em separação, que produzem resultados aceitáveis devido ao seu alto poder de resolução e automação (Shahwar, Young, Young, & Reaney, 2019). De acordo com o espectro detector de ionização por chama CG (FID), aplicando o éster butirato de hexila (éster sintetizado e padrão). Na figura 4 (éster sintetizado e purificado) destacou um pico intenso no tempo 5,7 min característico do composto $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COO}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ butirato de hexila. Observamos o mesmo pico no tempo 5,7 min para a figura 5b (éster padrão). Este resultado comprova a síntese do éster butirato de hexila.

Figura 4. Cromatograma CG – FID de éster butirato de hexila. (a) cromatograma ilustrativo do éster butirato de hexila sintetizado, (b) cromatograma ilustrativo do padrão butirato de hexila.



Conclusão

A síntese butirato de hexila usando o biocatalisador de partículas de Diaion HP 20 imobilizando lipase de *candida rugosa* foi realizada com sucesso, utilizando a modelagem da estatística e planejamento Box Behnken.

A NOVA demonstrou que o modelo havia sido satisfatório e que os fatores temperatura, razão molar e carregamento enzimático demonstraram efeito significativo na esterificação.

Esses resultados mostram que a aplicação do modelo estatístico Box-Behnken, por meio da MSR é vantajoso, pois reduz o número de experimentos e resultados que promovem um aumento na conversão de ésteres.

A confirmação da síntese do éster foi comprovado pelo uso do CG-FID que identificou o pico do éster sintetizado confirmando com o padrão.

O uso das metodologias aplicadas MSR junto ao biocatalisador preparado e CG-FID são estratégias interessantes na produção de éster de sabor como casca de maçã e citrus.

Agradecimentos

Agradecemos a Universidade Estadual de Santa Cruz e CAPES.

Referencias

- Almeida, M., Erthal, R., Padua, E., Silveira, L., & Am, L. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965–977.
- Alves, M. D., Aracri, F. M., Cren, É. C., & Mendes, A. A. (2016). Isotherm , kinetic , mechanism and thermodynamic studies of resin. *Chemical Engineering Journal*. 311, 1-12.
- Ba, D., & Boyaci, I. H. (2007). Modeling and optimization i: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836–845.
- Bassi, J. J., Toderó, L. M., Lage, F. A. P., Khedy, G. I., Ducas, J. D., Custódio, A. P., Mendes, A. A. (2016). Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 900–909.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, 254, 248–254.
- Chang, S., Shaw, J., & Shieh, C. (2003). Optimization of Enzymatically Prepared Hexyl Butyrate by Lipozyme IM-77, *Food Technology and Biotechnology*, 41(3), 237–242.
- Corradini, M. C. C., Gomes, R. A. B., Luiz, J. H. H., Carolina, M., Gomes, R. A. B., Luiz, J. H. H., ... Mendes, A. A. (2016). Optimization of Enzymatic Synthesis of n-Propyl Acetate (Fruit Flavor Ester) – Effect of the Support on the Properties of Biocatalysts. *Chemical Engineering Communications*, 203, 1432-1442.
- de Brito, A. R., Santos Reis, N. dos, Silva, T. P., Ferreira Bonomo, R. C., Trovatti Uetanabaro, A. P., de Assis, S. A., Franco, M. (2017). Comparison between the univariate and multivariate analysis on the partial characterization of the endoglucanase produced in the solid state fermentation by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(10), 977–985.
- dos Santos, M. M. O., Gama, R. S., de Carvalho Tavares, I. M., Santos, P. H., Gonçalves, M. S., de Carvalho, M. S., Franco, M. (2020). Application of lipase immobilized on a hydrophobic support for the synthesis of aromatic esters. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68, 1–9.
- Fernandez-Lorente, G., Godoy, C. A., Mendes, A. A., Lopez-Gallego, F., Grazu, V., de las Rivas, B., Guisan, J. M. (2008). Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* to improve its stabilization via covalent

- immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. *Biomacromolecules*, 9(9), 2553–2561.
- Gawas, S. D., Lokanath, N., & Rathod, V. K. (2018). Optimization of enzymatic synthesis of ethyl hexanoate in a solvent free system using response surface methodology (RSM), *Biocatalysis*, 4, 14–26.
- Jaiswal, K. S., & Rathod, V. K. (2018). Ultrasonics - Sonochemistry Acoustic cavitation promoted lipase catalysed synthesis of isobutyl propionate in solvent free system : Optimization and kinetic studies, *Sonochemistry Ultrasonics*, 40, 727–735.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity , stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Micobial Technology*, 40, 1451–1463.
- Mendes, A. A., Oliveira, P. C., Vélez, A. M., Giordano, R. C., Giordano, R. D. L. C., & Castro, H. F. De. (2012). International Journal of Biological Macromolecules Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(3), 503–511.
- Meneses, A. C. De, A, A. G. A. S., Henrique, P., & Araújo, H. De. (2017). A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as fl avor ingredients for food , cosmetics and pharmaceuticals industries, *Trends in Food Science & Technology* 69, 95-105.
- Shahwar, D., Young, L. W., Young, Y., & Reaney, M. J. T. (2019). Extractive silylation method for high throughput GC analysis of flaxseed cyanogenic glycosides. *Journal of Chromatography B*, 1132, 121816.
- Shieh, C., & Chang, S. (2001). Optimized Synthesis of Lipase-Catalyzed Hexyl Acetate in n -Hexane by Response Surface Methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1203–1207.
- Tamires Carvalho, Priscilla V. Finotelli, Renata C.F. Bonomo, Marcelo Franco, P. F., & Amaral., F. (2016). Evaluating Aqueous Two-Phase Systems for *Yarrowia lipolytica* Extracellular Lipase Purification. *Process Biochemistry*, 53, 259-266.