

Introdução

Ésteres de cadeia curta são compostos de aroma encontrados naturalmente em diversas frutas. Estes podem ser extraídos através de processos físicos, contudo esse método é muito escasso e caro para ser aplicado comercialmente. A legislação atual define os “aromas naturais” como os obtidos através de processos físicos ou rotas biotecnológicas.

As lipases são enzimas utilizadas na hidrólise de óleos e gorduras. Contudo, em condições adequadas, também atuam em reações de esterificação (Ácido + Álcool → Éster + Água). Essas enzimas apresentam comportamentos distintos dependendo do protocolo de imobilização, influenciando a taxa de conversão final.

Os objetivos desse trabalho foram comparar duas preparações imobilizadas de lipase B de *Candida antarctica* (CALB) como biocatalisadoras na síntese de butirato de etila e encontrar as melhores condições reacionais através do estudo dos diferentes parâmetros (temperatura de reação, razão molar de substrato, quantidade de enzima e água adicionada) que influenciam na taxa de conversão da reação. As variáveis foram avaliadas através de um delineamento composto central e da metodologia de superfície de resposta.

Materiais e Métodos

Reação:

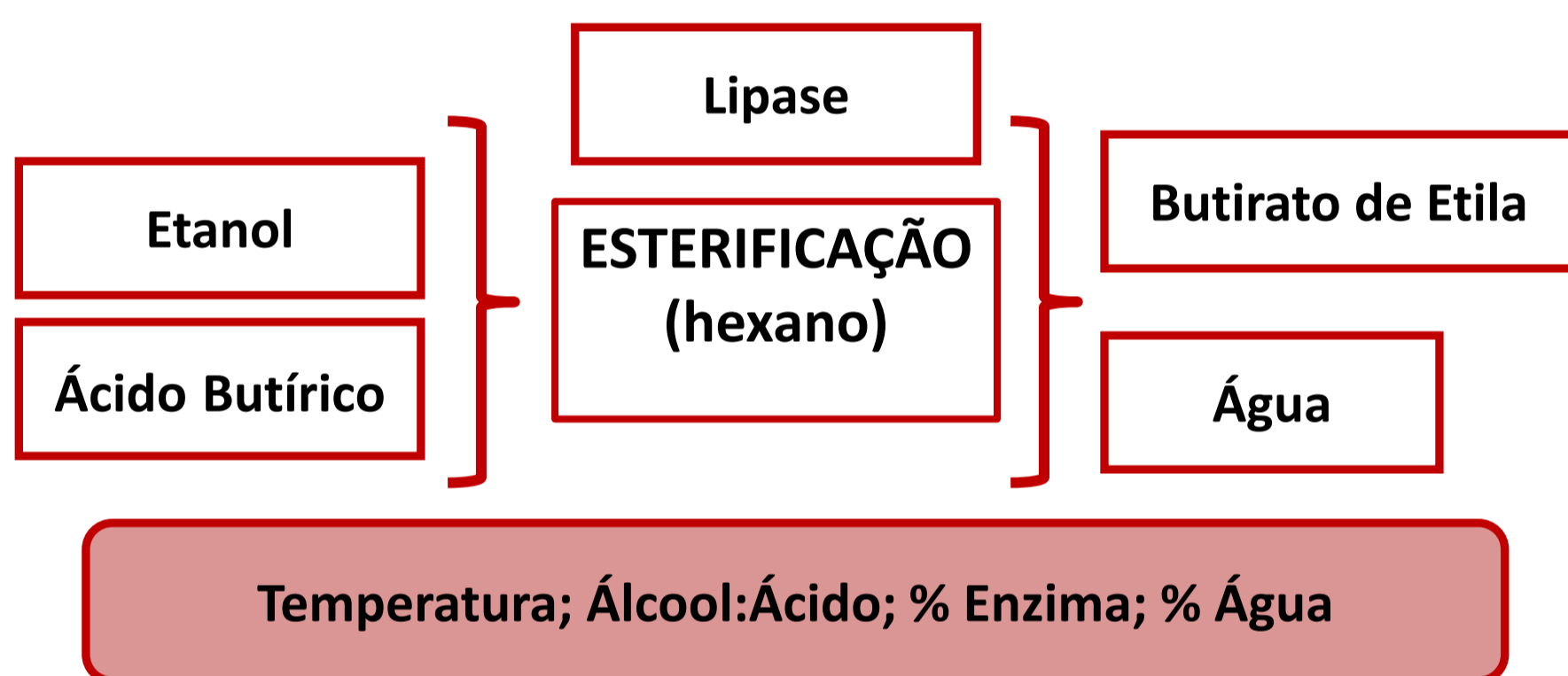


Figura 1. Esquema da reação de síntese do butirato de etila

Etanol foi adicionado ao ácido butírico em diferentes razões molares em Erlenmeyer de 50 mL, seguidos da adição de água, hexano como solvente, e enzima. As reações foram agitadas em shaker (200 rpm) por 1 h, com temperaturas distintas. As variáveis estudadas e suas faixas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Variáveis utilizadas no DCCR e seus níveis.

Variáveis	Nome	Níveis				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	Temperatura (°C)	25	31	37,5	44	50
X ₂	Razão Molar de Substrato ^a	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1
X ₃	Enzima ^b	1	2,5	5	7,5	10
X ₄	Água Adicionada ^b	0	0,25	0,5	0,75	1

^a álcool:ácido; ^b % por massa de substrato.

Rendimento:

O progresso da reação de esterificação foi monitorado pela determinação do teor de ácido residual por titulação de 1 mL de amostra contra o hidróxido de sódio (0,01 N) usando fenolftaleína como indicador e 5 mL de etanol como agente de parada, e calculado conforme eq. 1:

$$\text{Rendimento} = \left[\frac{[\text{ácido}]_i - [\text{ácido}]_f}{[\text{ácido}]_i} \right] * 100 \% \quad (1)$$

Resultados e Discussões

As variáveis foram avaliadas nos delineamentos compostos centrais. A quantidade de enzima foi a variável que apresentou maior efeito na reação de esterificação. Os resultados para cada derivado podem ser visualizados nas superfícies de resposta das Figuras 1 e 2.

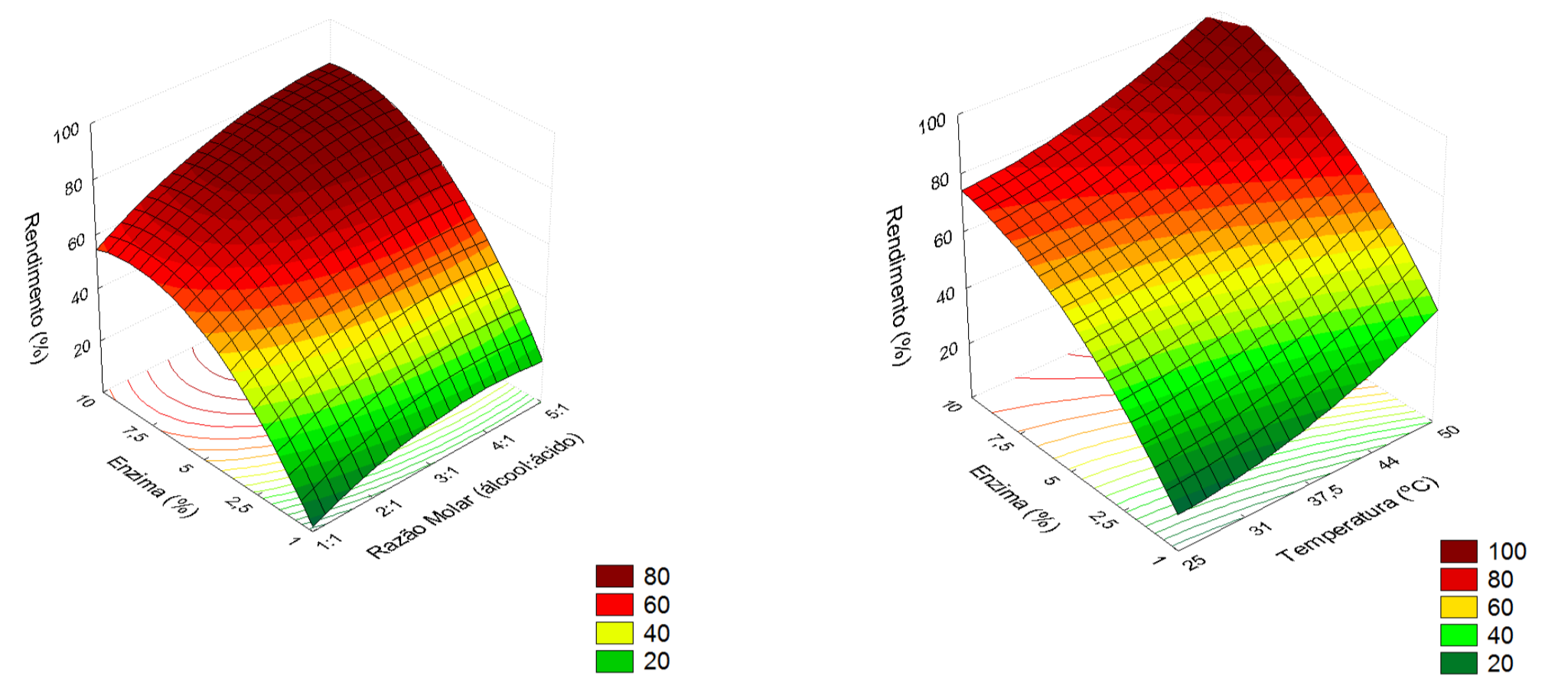


Figura 1. Superfície de resposta para a síntese de butirato de etila por Novozym 435. A temperatura foi fixada no nível 0 e a água adicionada no nível -1

Figura 2. Superfície de resposta para a síntese de butirato de etila por MCI-CALB. A razão molar do substrato foi fixada no nível 1 e a água adicionada no nível -1

As condições ótimas para cada enzima estão na Tabela 2. Na condição ótima foi possível obter um rendimento de conversão de cerca de 85 % em 1,5 h para as duas enzimas.

Tabela 2 – Condições ótimas para a síntese de butirato de etila

Variáveis	Novozym-435	MCI-CALB
Temperatura (°C)	37 °C	44 °C
Razão Molar de Substrato ^a	5:1	4:1
Enzima ^b	7,5 %	7,5 %
Água Adicionada ^b	0,25 %	0,25 %

A preparação MCI-CALB apresentou uma produtividade 1,6 vezes maior do que a Novozym 435 (Figura 3). Contudo, a principal diferença entre ambos os biocatalisadores foi em relação à estabilidade operacional (Figura 4). Realizando uma lavagem com n-hexano entre cada batelada, a Novozym 435 apresentou 20 % de sua atividade inicial após 8 ciclos, enquanto a MCI-CALB manteve 80 % de sua atividade inicial.

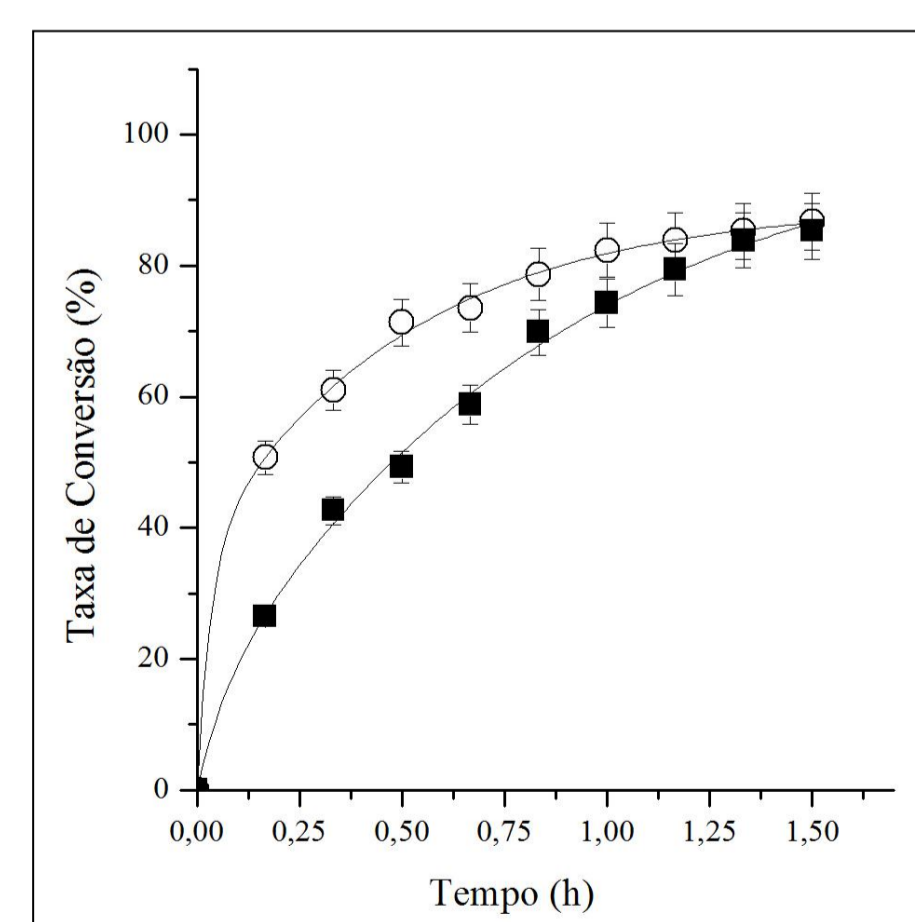


Figura 3. Cinética da síntese do Butirato de etila nas condições ótimas catalisada por Novozym 435 (■) e MCI-CALB (○)

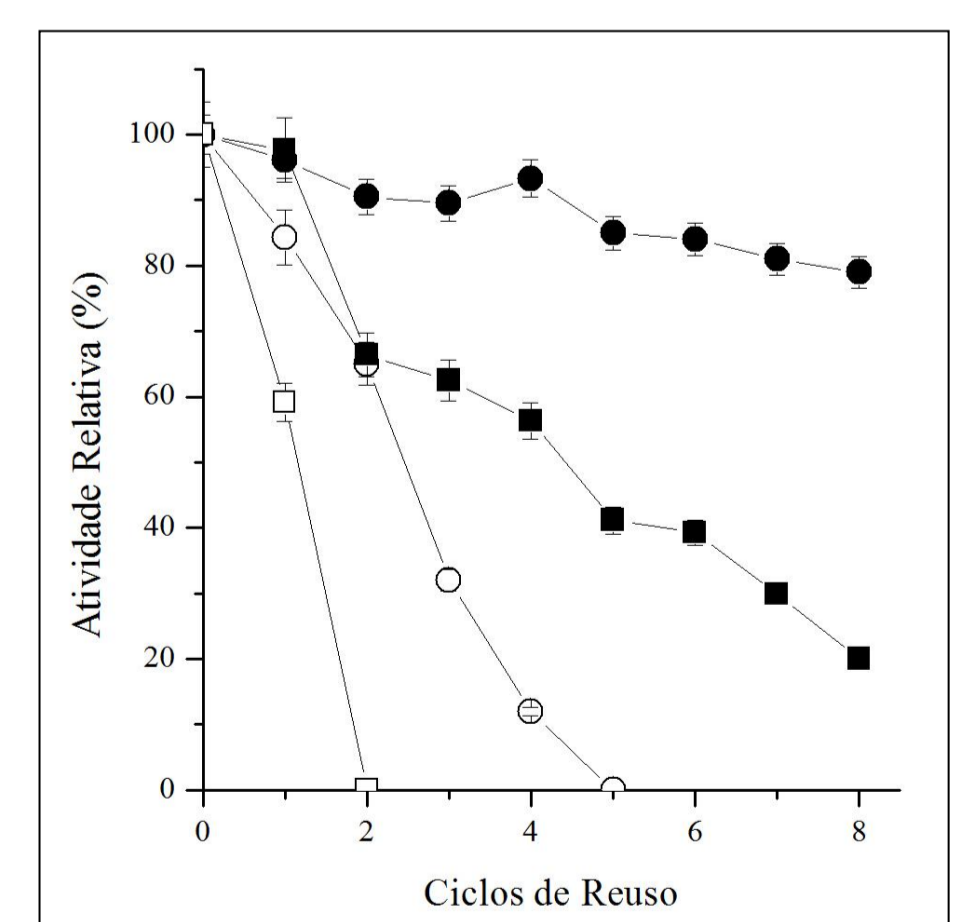


Figura 4. Estabilidade operacional do biocatalisador. (□, ■) Novozym 435 e (○, ●) MCI-CALB. Símbolos abertos: sem tratamento; símbolos fechados: tratamento com n-hexano

Conclusões

Os protocolos de imobilização enzimática promoveram diferença nas condições ótimas da reação de esterificação. O planejamento composto central permitiu avaliar as principais variáveis da reação enzimática que, em condições ótimas, a conversão foi de cerca de 85% em 1,5 h. Além disso, a enzima MCI-CALB pode ser reutilizada mantendo a uma atividade de 80% após 8 ciclos de reação, fazendo uma simples lavagem com n-hexano entre os ciclos, a fim de remover toda a água do suporte.