

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SÍNTESE DE ÉSTERES DE AROMAS CATALISADA POR LIPASE B DE *Candida antarctica* IMOBILIZADA EM PARTÍCULAS CORE-SHELL PS-co-DVB/ PS-co-DVB

Joana Silva Alves

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SÍNTESE DE ÉSTERES DE AROMAS CATALISADA POR LIPASE DE *Candida antarctica* IMOBILIZADA EM PARTÍCULAS CORE-SHELL PS-co-DVB/ PS-co-DVB

Joana Silva Alves

Trabalho de Conclusão de Curso
Apresentado à Universidade Federal
do Rio Grande do Sul como requisito
Parcial para obtenção do título de
Engenheiro de Alimentos

Porto Alegre

2016

SÍNTESE DE ÉSTERES DE AROMAS CATALISADA POR LIPASE DE *Candida antarctica* IMOBILIZADA EM PARTÍCULAS CORE-SHELL PS-co-DVB/ PS-co-DVB

Joana Silva Alves

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Rafael Costa Rodrigues (Orientador)
Departamento de Tecnologia dos Alimentos

Profº Dr. Plinho Francisco Hertz
Departamento de Ciência dos Alimentos

Natália Guilherme Graebin
MsC. Ciência e Tecnologia de Alimentos

AGRADECIMENTOS

À UFRGS e ao ICTA, de modo geral, por me proporcionarem uma formação profissional e pessoal de qualidade.

Aos professores Alessandro, Plinho, Erna[‡] e ao meu orientador Rafael, pelo contato com a iniciação científica e pela confiança creditada a mim e ao meu trabalho, além dos ensinamentos durante a vida acadêmica.

À família 210 e todos que lá passaram, em especial à Sheila que me ensinou com tamanha dedicação e didática. À família 123 e/ou 16 pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório, em especial à bolsista Vitória Conter que sempre se mostrou interessada e motivada com os experimentos.

Aos membros da banca por aceitarem o convite para avaliar, discutir e principalmente contribuir para este trabalho.

Às colegas que se tornaram amigas durante toda essa jornada Daiane, Juliana Venturini e Lívia. Com certeza nossa amizade é para sempre!

Ao meu namorado Maurício, pela pessoa que tu és e que eu sempre admirei. Obrigada por acreditar em mim. Te amo!

Aos meus pais pela educação proporcionada dentro e fora de casa. Obrigada por me darem a opção de estudar. Obrigada pelo amor incondicional que vocês tem comigo. Se cheguei até aqui também foi por mérito de vocês. Obrigada por tudo!

EPÍGRAFE

“If you can´t fly then run, If you can´t run then walk, if you can´t walk then crawl, but whatever you do, you have to keep moving forward”

Martin Luther King Jr.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. ENZIMAS	11
2.1.1. LIPASES.....	13
2.1.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	15
2.2. REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	20
2.3. AROMAS	21
2.4. ENERGIA ULTRASSÔNICA.....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
5. REFERÊNCIAS	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação dos suportes quanto a estrutura química	17
Figura 2: Principais métodos de imobilização de enzima: (a) adsorção; (b) ligação covalente; (c) encapsulamento; (d) ligação cruzada.	18
Figura 3: Reação de esterificação de Fischer.	20

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais enzimas empregadas na indústria de alimentos, sua fonte, ação e aplicação nos alimentos.	13
Quadro 2: Aplicação das lipases na indústria de alimentos: setor, ação e produto...15	
Quadro 3: Resumo dos principais métodos de imobilização: mecanismo/força das ligações, vantagens e desvantagens.	18
Quadro 4: Principais ésteres de aromas produzidos por lipases de diferentes fontes fúngicas.	22

RESUMO

Os aromas são amplamente empregados na indústria de alimentos, porém quando obtidos de fontes naturais são insuficientes e apresentam baixo rendimento, quando obtidos por síntese química são considerados artificiais, influenciando negativamente na escolha do consumidor, em virtude das tendências à alimentação saudável e ao consumo consciente. A biocatálise de aromas por enzimas é considerada um método natural e alternativo para tal problema. As lipases (E.C.3.1.1.3.), sob condições específicas, são capazes de sintetizar ésteres de aromas, empregados como flavorizantes na indústria de alimentos. Porém na sua forma livre apresentam desvantagens, sendo utilizada a técnica de imobilização em suportes para melhoria de alguns parâmetros e recuperação do biocatalisador. A aplicação de energia ultrassônica em reações biotecnológicas vem sendo amplamente estudada por promover uma maior interação entre fases, melhorando a homogeneidade e transferência de massa no meio reacional, sendo considerada uma tecnologia de alta eficiência, considerada verde. Além disso, com o intuito de aumentar ainda mais o rendimento da reação, as peneiras moleculares, zeólitas artificiais, podem ser empregadas a fim de deslocar equilíbrio da reação no sentido dos produtos. No presente trabalho, foi estudada a síntese de ésteres de aroma catalisada por lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em suporte sólido de poliestireno através do método *core-shell* utilizando divinilbenzeno como agente de *crosslinking*. A síntese do laureato de butila apresentou melhores rendimentos (84,05 %) em 1 h nos testes preliminares utilizando iso octano como solvente. A concentração máxima de substratos que pode ser utilizada foi de 1,0 M. Um delineamento composto central foi elaborado a fim de analisar a influência dos parâmetros como temperatura, razão molar dos substratos e quantidade de enzima. A metodologia de superfície de resposta foi elaborada, definindo-se a condição ótima de reação como sendo à 40 °C; 1,3:1 na razão ácido láurico:butanol; 8 % de enzima. A estabilidade operacional da enzima foi testada em banhos-maria de agitação mecânica e ultrassônica em bateladas seguidas com intervalo de 24 h. A enzima foi reutilizada por sete ciclos com rendimento relativo de aproximadamente 60 % em ambas agitações, demonstrando que a energia ultrassônica pode ser substituída sem prejuízos. As peneiras moleculares em diferentes concentrações foram testadas, aumentando o rendimento para 92,3%. Deste modo, a síntese otimizada de laureato de butila apresentou valores de rendimentos expressivos, podendo ser utilizada uma tecnologia considerada verde para sua obtenção.

Palavras-chave: ésteres de aroma, lipase B, enzimas imobilizadas, energia ultrassônica

ABSTRACT

Flavors are widely employed in the food industry, but when they are obtained from natural sources, they are insufficient and present a low yield and when they are obtained through chemical esterification, they are considered artificial, influencing on a negative way on consumer's choice, due to the trends of a healthy diet and a conscious consumption. The biocatalysis of aromas by enzymes is considered a natural and an alternative method for such a problem. Lipases (E.C.3.1.1.3.), under specific conditions, are able to synthesize flavor esters, used as flavorings in the food industry. However, in its free form, it shows disadvantages, due to this, it is used a technique of immobilization in solid carriers to improve some parameters and recover the biocatalyst. The ultrasonic energy has been widely studied in biotechnological reactions because it promotes better interactions between interfaces, improving the homogeneity and mass transfer in reaction media, being a high efficient technology and also considered an "eco-friendly" one. Besides this, in order to evaluate the reaction yield increase, molecular sieves, artificial zeolites, may be used with the purpose to shift the reaction equilibrium to synthesis direction. In the present work, it was studied a lipase B catalyzed reaction synthesis that was immobilized on polystyrene solid support by core-shell method using divinylbenzene as a crosslinking agent. Butyl laurate synthesis presented higher yields (84.05%) at 1h in preliminary tests using iso-octane as solvent. The maximum concentration of substrates that can be used is 1.0M. A central composite design was developed in order to analyze influence of temperature, molar ratio of substrates and enzyme content. The Response Surface Methodology was elaborated, defining an optimum reaction condition as being at 40°C; 1.3: 1 in the lauric acid: butanol ratio; 8 % enzyme content. The operational stability of the enzyme was tested in mechanical and ultrasonic agitation baths in consecutive batches drying the enzymes for 24 h. The enzyme was reused for seven cycles with relative yield of about 60 % in both cases, demonstrating that an ultrasonic energy can be replaced without damage. Molecular sieves in different concentrations were tested, increasing the yield to 92.3 %. In this way, the optimized synthesis of butyl laurate presented values of expressive yields, being able to be used as a technology considered green for its obtention.

Key words: flavour esters, lipase B, immobilized enzymes, ultrasonic energy

1. INTRODUÇÃO

As enzimas apresentam diversas vantagens no seu emprego como catalisadores de reações (DALLA-VECCHIA, 2004). Tais biocatalisadores tem capacidade de aumentar a velocidade da reação de interesse utilizando condições brandas e sem a formação de subprodutos (BRENA e BATISTA-VIEIRA, 2006). As lipases (EC 3.1.1.3), tem sido amplamente aplicadas na biotecnologia industrial (JAEGER e EGGERT, 2002) em diversas reações, capazes de promover principalmente hidrólises. Além disso sob condições específicas podem catalisar esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação (DALLA-VECCHIA, 2004).

Em alternativa a esterificação química de aromas, que produz um consumo elevado de energia, corrosão dos equipamentos, pouca seletividade, maior volume de efluentes e formação de subprodutos opticamente inativos (SILVA, 2014), a síntese catalisada por lipases tem demonstrado ser bastante interessante. Os ésteres flavorizantes podem ser obtidos pela reação de um ácido de cadeia curta ou média e um álcool (BRAULT *et al.*, 2014), produzindo normalmente aromas frutados e florais. Além do mais, estes compostos podem ser considerados naturais de acordo com a legislação internacional (SERRA *et al.*, 2005), fato que é vantajoso, devido ao aumento da informação sobre alimentação e vida saudável da população, sendo um fator decisivo na preferência do consumidor o emprego ou não de aditivos (CHIAPPINI, 2008).

Contudo o emprego das enzimas livres em caráter industrial é limitado (BITENCOURT e PEREIRA, 2009), pois são caras devido ao alto custo de purificação e isolamento se comparado ao custo operacional da biocatálise, além de serem sensíveis ao pH, temperatura e a outras substâncias quando expostas a condições diferentes de sua natureza (HOMAEI *et al.*, 2013). Para amenizar as limitações, a imobilização, que consiste no confinamento físico ou a localização das enzimas em uma determinada região do espaço, com retenção das suas propriedades catalíticas, tem sido amplamente estudada, visto que não existe um método geral assim como não existe um suporte ideal para todas as enzimas e aplicações (BRENA e BATISTA-VIEIRA, 2006). A fácil separação do meio e recuperação do biocatalisador estão entre

as principais vantagens da imobilização, pois diminuem os custos do processo (PIMENTEL, 2006).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a síntese de ésteres de aroma produzidos pela lipase B de *Candida antarctica*, imobilizada em partículas de poliestireno através do método *core-shell* utilizando divinilbenzeno como agente de ligação. Além disso, alguns objetivos específicos foram definidos, tais como:

- Analisar a influência de parâmetros como temperatura, razão molar dos substratos e quantidade de enzima na síntese de laureato de butila, além da interação entre estes fatores utilizando um delineamento composto central;
- Estudar o efeito do uso de peneiras moleculares no rendimento da reação;
- Avaliar o método de agitação, comparando a agitação mecânica com a agitação utilizando energia ultrassônica para a sínteses de laureato de butila;
- Avaliar a estabilidade operacional da enzima, frente às duas formas de agitação: mecânica ou ultrassônica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ENZIMAS

As enzimas são catalisadores biológicos, isto é, aumentam a velocidade de uma reação sem serem consumidas (CHAMPE *et al.*, 2006). A maioria das enzimas é composta principalmente de proteínas, deste modo apresentam estrutura primária, secundária, terciária e quaternária que influenciam diretamente nas suas características e atividade (LEHNINGER *et al.*, 2014). Alguns destes biocatalisadores necessitam de outras moléculas não proteicas para auxiliar seu desempenho, chamados de cofatores, coenzimas ou grupo prostético, como moléculas orgânicas de baixo peso molecular ou íons metálicos, que apesar de não participarem diretamente da catálise, influenciam nas propriedades físico-químicas e conferem sítios de reconhecimento celular na enzima (DAMODARAN *et al.*, 2008; SANTOS, 2012).

A nomenclatura das enzimas é definida pela IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) e pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) para facilitar a comunicação de informações bioquímicas. A abreviatura EC que precede a classificação significa *Enzyme Commission*, o primeiro número está relacionado às seis grandes classes que são catalogadas pelo órgão, o segundo número representa subclasse, o terceiro dígito refere-se à sub-subclasse e o quarto dígito ao número de série do biocatalisador na sub-subclasse (IUBMB, 2016).

A fonte para obtenção das enzimas podem ser células animais, plantas, e ainda microrganismos, tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (DALLA-VECCHIA, 2004; PEREIRA, 2014). De acordo com Sharma *et al.* (2001), a maioria dos biocatalisadores utilizados industrialmente provem de fonte microbiana, visto que, conforme Hasan *et al.* (2005) apresentam vantagens frente às células vegetais e às células animais, tais como:

- Grande variedade de atividade catalítica disponível;
- Alto rendimento;
- Facilidade de manipulação genética;
- Fornecimento contínuo devido a não existência de sazonalidade da fonte;

- Rápido crescimento dos microrganismos em meios de cultivo de baixo custo;
- Maior estabilidade se comparada a sua corresponde de fonte vegetal e animal;
- Produção mais prática e segura as extraídas de vegetais e animais;

Estima-se que o mercado mundial de enzimas industriais irá movimentar cerca de 6,3 bilhões de dólares entre 2017 e 2022, a uma taxa de crescimento anual de 5,8 %. A América do Norte detém a maior parcela devido ao aumento do uso dos biocatalisadores na produção de biocombustíveis, detergentes e processamento de alimentos, porém a região da Ásia-Pacífico é, em termos de valores, o maior consumidor com crescimento rápido abrangendo economias como China, Japão e Índia (RESEARCH AND MARKETS, 2016). A América Latina também deve apresentar crescimento para o período 2015-2020, liderado pelo Brasil. Atualmente, o país é um grande importador de enzimas, apesar de a aplicação industrial ser reduzida se comparada com outros países, demonstrando que o desenvolvimento da tecnologia enzimática nacional é necessário (MONTEIRO e SILVA, 2009; MORDOR INTELLIGENCE, 2016).

Devido a sua alta capacidade de catalisar reações sob condições brandas se comparadas a catalisadores químicos, e seu alto grau de especificidade, além da ausência de subprodutos formados, as enzimas são interessantes do ponto de vista industrial (BRENA e BATISTA-VIEIRA, 2006; DALLA-VECCHIA, 2004; GUIBAN, 2006). A compreensão do mecanismo de ação e da estrutura das moléculas possibilitou o emprego destas proteínas em diversos ramos do setor produtivo, como alimentício, têxtil, químico, papel e celulose entre outros (MUSSATO *et al.* 2012). As enzimas aplicadas em alimentos vêm sendo utilizadas há séculos, mas somente em 1874, quando Christian Hansen extraiu renina de estômagos secos de bezerras para a produção de queijo é que a produção de biocatalisadores para aplicação no processamento dos alimentos teve início (MONTEIRO e SILVA, 2009). O Quadro 1 apresenta as principais enzimas empregadas na indústria de alimentos, sua fonte, ação e aplicação nos alimentos.

Quadro 1: Principais enzimas empregadas na indústria de alimentos, sua fonte, ação e aplicação nos alimentos.

Enzima	Fonte	Aplicação nos alimentos
α -amilase	<i>Aspergillus</i> spp, <i>Bacillus</i> spp. <i>Microbacterium imperiale</i>	Amolecimento da massa, aumento do volume do pão, ajuda na produção de açúcares fermentecíveis.
Amiloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus</i> spp.	Produção de cervejas claras
Quimosina	<i>Aspergillus awamor</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>	Coagulação do leite para queijo
Ciclodextrina Glucanotransferase	<i>Bacillus</i> spp.	Microencapsulantes de grau alimentício para cores, sabores e vitaminas. Ajudam a aumentar o teor de fibras.
β -galactosidase (lactase)	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Kluyveromyces</i> spp.	Adoçantes de leite e soro; produtos para indivíduos intolerantes à lactose; redução da cristalização em sorvetes contendo soro de leite
Hemicelulose e xilanase	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Trichoderma reesei</i>	Melhoria da estrutura do miolo de pão
Lipase e esterase	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Candida</i> spp , <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Rhizopus</i> spp., <i>Bacillus subtilis</i>	Realce do sabor em queijos; modificação da função de gorduras por interesterificação; síntese de ésteres de aromas
Pectinase (poligalacturonase)	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium funiculosum</i>	Clarificação de sucos de frutas por despectinização
Pululanase	<i>Bacillus</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp.	Sacarificação do amido (melhora a eficiência)
Protease	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Cryphomectria parasítica</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>Bacillus</i> spp	Coagulação do leite para fabricação de queijos; produção de hidrolisados para sopas e alimentos salgados; melhora a massa do pão

Fonte: Adaptado de Food Ingredients Brasil (2011)

2.1.1. LIPASES

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas capazes de atuar principalmente em reações de hidrólise sobre ligações ésteres de acilglicerois, mas sob condições específicas podem catalisar reações de esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação (DALLA-VECCHIA, 2004). De acordo com Lotti e Alberghina (2007), tais biocatalisadores são potencialmente interessantes devido às suas sofisticadas seletividades como regioseletividade (posição da ligação éster no substrato é reconhecida); quimiosseletividade (a natureza do substrato é reconhecida); estereosseletividade (presença de isômeros é reconhecida).

Apesar de apresentarem diferenças em seus sítios ativos e na estrutura ao redor dos mesmos, as lipases apresentam características comuns (POPPE, 2012). De modo geral, sua natureza tridimensional apresenta um dobramento padrão na conformação α/β hidrolase e seu sítio catalítico é composto por uma tríade de resíduos de aminoácidos Ser- His-Asp/Glu protegidos por uma cadeia polipeptídica hidrofóbica em α -helice denominada *lid* ou tampa (MATTE, 2015; RODRIGUES, 2009; SUDBRACK, 2012). Rodrigues (2009) esclarece que estas características explicam o fenômeno de ativação interfacial, que segundo Jaeger e Reetz (1998) é um mecanismo específico das reações lipolíticas e que diverge do modelo cinético proposto por Michaelis-Menten. A ativação interfacial consiste em uma mudança na estrutura tridimensional da molécula quando ora está em contato com interfaces hidrofílicas ora com interfaces hidrofóbicas (RODRIGUES, 2009; POPPE, 2012). Quando em meio aquoso homogêneo, sem a presença de solventes orgânicos e interfaces, a tampa permanece fechada e a enzima exibe baixa atividade, entretanto quando estão presentes interfaces hidrofóbicas, a tampa é aberta, expondo uma ampla zona hidrofóbica na região do sítio ativo e permitindo o acesso dos substratos (DEREWENDA *et al.*, 1992; MATTE, 2015; RODRIGUES, 2009; POPPE, 2012). Contudo, a ativação interfacial e a presença da tampa, características singulares destas enzimas, não devem ser considerados critérios de classificação para que uma enzima seja ou não uma lipase, visto que lipases provenientes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae*, *Candida antarctica* B e a lipase pancreática de um roedor, não apresentam ativação interfacial, todavia possuem a tampa em volta do sítio ativo (BRIGIDA, 2000; JAEGER e REETZ, 1998).

A aplicação biotecnológica industrial das lipases vem crescendo de modo rápido e constante (JAEGER e EGGERT, 2002), sendo considerado o terceiro maior grupo de enzimas em volume de vendas (HASAN *et al.* 2005). Hasan *et al.* (2005) e Houde *et al.* (2003) descrevem que as principais aplicações em grande escala das lipases são em indústrias de alimentos, de detergentes têxtil, oleoquímica, farmacêutica, química, além de ferramenta para diagnóstico e tratamento de doenças. No Quadro 2, estão descritos os setores da indústria de alimentos, a ação e o produto em que são aplicadas as lipases.

Quadro 2: Aplicação das lipases na indústria de alimentos: setor, ação e produto.

Setor da indústria de alimentos	Ação	Produto
Lácteos	Hidrólise da gordura do leite; Maturação de queijos; Modificação da gordura da manteiga	Desenvolvimento de agentes de aromas no leite, queijo e manteiga
Panificação	Esterificação de ácido graxos de cadeia curta, desenvolvendo aromas e aumentando o <i>shelf life</i>	Pães
Bebidas	Esterificação para desenvolvimento de aroma	Bebidas alcoólicas tais como sake e vinho
Carnes e pescados	Hidrólise de gorduras e desenvolvimento de aromas	Produtos a base de carnes e pescados
Óleos e gorduras	Transesterificação e hidrólise para melhorias de características reológicas e organolépticas; Redução de custos	Substitutos da manteiga de cacau; manteiga, margarina, mono e diglicerídeos (emulsificantes)

Fonte: Adaptado de COLLA *et al.* (2013); HASAN *et al.*, (2005); RAJENDRAN *et al.* (2009)

2.1.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Apesar das vantagens de suas propriedades para aplicação em uso industrial, as enzimas livres apresentam limitações, tais como: alto custo de isolamento e purificação, instabilidade estrutural, sensibilidade às condições não ideais e à substâncias inibidoras que podem ser seus substratos ou produtos em altas concentrações, resultando em baixa estabilidade operacional, além de em meio aquoso serem dissolvidas, contaminando o produto e dificultando a recuperação para reutilização (KRAJEWSKA, 2004). Uma alternativa a estes inconvenientes na biocatálise industrial é a imobilização de enzimas, que consiste na retenção de suas propriedades catalíticas, podendo ser usada de modo contínuo e repetidas vezes (KATCHALSKI-KATZIR, 1993). De acordo com Mendes *et al.* (2011) e Mateo *et al.* (2007) as vantagens da imobilização são:

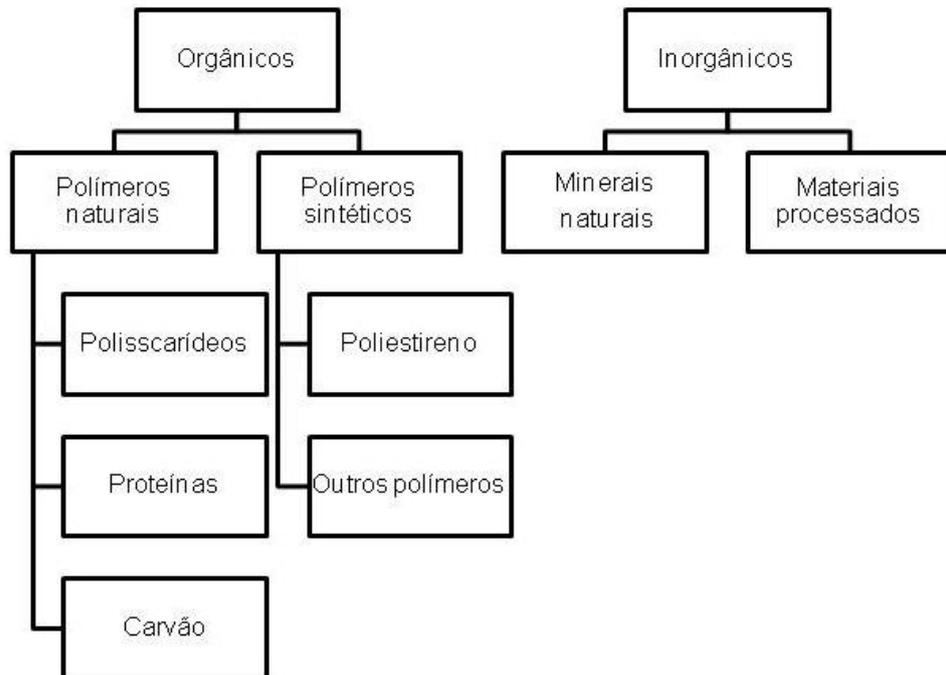
- Atividade catalítica por maior tempo;
- Possibilidade de processo contínuo;
- Facilidade de separação do produto final;

- Modificação das propriedades catalíticas como maior estabilidade ao pH e à temperatura, entre outros;
- Facilidade de interrupção da reação pela remoção da enzima;
- Ajuste do tempo de residência para reatores contínuos;
- Redução da inibição pelos substrato e produtos;

Conforme Tischer e Wedekind (1999), as propriedades bioquímicas e os parâmetros cinéticos das enzimas; as características químicas e mecânicas dos suportes; o método utilizado, os efeitos de transferência de massa bem como a estabilidade e performance do derivado imobilizado, devem ser levados em consideração para uma imobilização eficiente que apresente propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas distintas. Tal fato exemplifica que não há um método geral para imobilização de enzimas, e sim uma grande diversidade de métodos específicos para cada aplicação que permita um procedimento simplificado e de menor custo, porém com boa retenção das propriedades e alta estabilidade operacional (MENDES *et al.*2011).

Na escolha do suporte, as principais propriedades que devem ser observadas são área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo (MENDES *et al.*2011; KLEIN, 2010). Os suportes podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos conforme sua estrutura química (BRENA e BATISTA-VIEIRA, 2006). A classificação química dos suportes está descrita na Figura 1.

Figura 1: Classificação dos suportes quanto a estrutura química



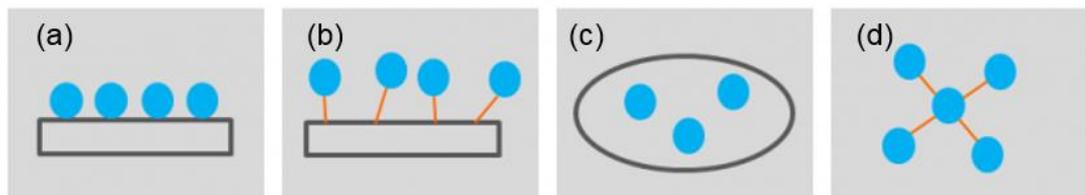
Fonte: Adaptado de Brena e Batista-Vieira (2006).

Quanto as suas características físicas, o suporte também pode ser classificado como poroso ou não-poroso, pois somente a característica química não considera dois parâmetros importantes como a área superficial e o diâmetro dos polímeros (KENNEDY e CABRAL, 1983). Os suportes porosos apresentam maior área superficial por unidade de peso, facilitando a imobilização, entretanto ocasionando problemas difusionais. Já os suportes não-porosos são caracterizados pela menor área superficial por unidade de peso, dificultando a imobilização, porém não há problemas de transferência de massa, visto que a enzima está alocada na superfície externa do suporte (KLEIN, 2010).

Assim como os suportes, não existe uma técnica padrão de imobilização para todas as enzimas e aplicações, devido a sua ampla variedade de características químicas e composição das proteínas, as diferentes propriedades de produtos e substratos, além dos diversos propósitos de emprego do produto (HOMAEI *et al.*, 2013; MOHAMAD *et al.*, 2015). Existem quatro principais métodos de imobilização (Figura 2): Ligação covalente entre enzima e um suporte insolúvel em água; ligação cruzada intermolecular de moléculas de enzimas utilizando um reagente

multifuncional; adsorção da enzima a um suporte insolúvel em água; encapsulamento de uma enzima dentro de uma rede polimérica insolúvel em água ou dentro de uma membrana semipermeável (IUPAC, 1995). No Quadro 3 estão resumidos os quatro principais métodos, mecanismos e força das ligações, além das vantagens e desvantagens.

Figura 2: Principais métodos de imobilização de enzima: (a) adsorção; (b) ligação covalente; (c) encapsulamento; (d) ligação cruzada.



Fonte: Adaptado de Biocatalysts (2016).

Quadro 3: Resumo dos principais métodos de imobilização: mecanismo/força das ligações, vantagens e desvantagens.

Método	Mecanismo de imobilização/ força da ligação	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	Ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações iônicas ou hidrofóbicas	Simples, baixo custo, procedimento pode ocorrer em condições brandas, fácil execução, preservação da atividade enzimática	Podem ocorrer perdas por lixiviação e desnaturação da enzima
Ligação covalente	Ligações covalentes	Ligações covalente apresentam-se mais estáveis, pouca perda por lixiviação	Pode ocorrer queda na atividade da enzima assim como inativação do sítio ativo. Em alguns casos é necessário imobilizar em presença do substrato.
Ligação cruzada	Ligação cruzada intermolecular formando uma rede com uma molécula ligante	Complexos enzimáticos fortes, não utilização de suportes	Pode ocorrer perda da atividade catalítica

Encapsulamento	Encapsulamento em uma membrana polimérica	Baixa lixiviação, melhora na estabilidade, substrato de baixo peso molecular não apresentam problemas difusionais.	Macromoléculas de substrato podem ter limitações de acesso
----------------	---	--	--

Fonte: Adaptado de Brena e Batista-Vieira (2006).

Apesar de seu amplo emprego na indústria, as lipases ainda são aplicadas na sua forma solúvel, contudo, diversos métodos de imobilização e suportes têm sido estudados (IVANOV e SCHENEIDER, 1997; PAIVA *et al.* 2000). Matte (2015) observou que a lipase proveniente de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em um suporte comercial mesoporoso, Immobead 150, através de ligação covalente multipontual apresentou melhor estabilidade à temperatura e ao solvente em relação ao biocatalisador na sua forma livre. Menoncin *et al.* (2009) imobilizaram por adsorção lipases produzidas por *Penicillium verrucosum* em carvão, suporte natural e de baixo custo, e relataram rendimento e retenção maiores dos que os valores encontrados na literatura utilizando o mesmo método, porém com suportes sintéticos. Com objetivo de aproveitamento de resíduos do comércio local, Brígida (2010), avaliou a imobilização com ligação covalente de lipase originária de *Candida antarctica* utilizando fibra de coco verde como suporte e obteve estabilidade operacional de 10 ciclos.

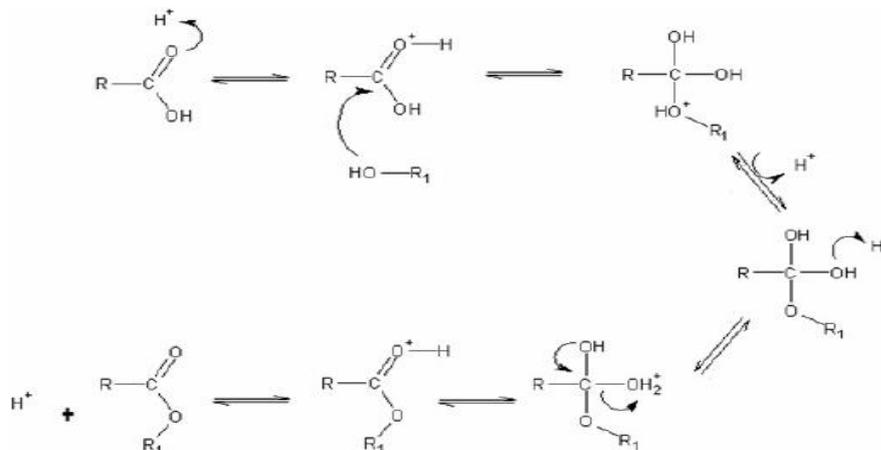
Devido aos grupos funcionais que podem ser ativados, à sua estabilidade mecânica e física, à resistência ao solvente e aos microorganismos, além do baixo custo e fácil obtenção, os suportes poliméricos são amplamente utilizados (BETESTEI *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2014). Especialmente para as lipases, devido a sua característica de ativação interfacial, a imobilização em suportes hidrofóbicos, como os poliméricos, apresenta melhorias nas propriedades, na estabilidade e na especificidade (MANOEL *et al.* 2016). A metodologia *core-shell* para a produção de partículas poliméricas pode ser empregada de modo efetivo com a finalidade de fornecer suportes para imobilização de enzimas, visto que permite a adsorção de uma quantidade alta de biocatalisador, assim como viabiliza a modificação das propriedades químicas e físicas do suporte para que enzimas específicas sejam aderidas (PINTO *et al.*, 2014). O resultado da técnica de polimerização *core-shell* são partículas, de poliestireno por exemplo, formadas por uma estrutura não-porosa (*core*) elaborada na primeira etapa de suspensão, cobertas por uma estrutura

altamente porosa (*shell*) produzida em uma etapa subsequente de emulsão (BETESTEI *et al.*, 2013). Ao testarem diferentes composições para *core* e para *shell*, Cunha *et al.* (2014) encontraram bons resultados para todos os suportes produzidos, entretanto em alguns casos específicos como PS-*co*-DVB/ PS-*co*-DVB (*core/shell*), os autores relatam que as partículas apresentaram melhor performance para reação de esterificação se comparada com o suporte Accurel MP 1000 (Akzo Nobel Faser, Obemburg, Germany), um suporte hidrofóbico e macroporoso.

2.2. REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

A reação de esterificação de Fischer, como é conhecida, consiste em uma reação de substituição nucleofílica do grupamento acila de um ácido carboxílico com um álcool, formando éster e água (MC MURRY, 2005). A formação de ésteres tem caráter reversivo, assim para deslocar o equilíbrio a favor da esterificação deve-se remover a água ou utilizar em excesso os reagentes, álcool ou ácido (NEVES, 2008). O mecanismo de reação mais comum é quando um ácido carboxílico é protonado por um ácido de Bronsted, que torna o ácido carboxílico muito mais reativo e facilita o ataque do álcool à carbonila, formando um composto intermediário que sofre rearranjo e perde uma molécula de água e uma molécula de éster demonstrado na Figura 3 (LEÃO, 2009; MEDEIROS, 2008).

Figura 3: Reação de esterificação de Fischer.



Fonte: Medeiros (2008)

Apesar do mecanismo de reação ser bastante notório, diversos estudos têm sido desenvolvidos para otimização das esterificações e para aplicação industrial, como a adição de novos catalisadores e modificação das condições da reação como análise da temperatura e pressão do meio, além da concentração limitante dos reagentes (MEDEIROS, 2008). O consumo elevado de energia, corrosão dos equipamentos, pouca seletividade, tratamento de efluentes, formação de subproduto opticamente inativos, são exemplos de desvantagens da esterificação catalisada por ácidos (SILVA, 2014). Em alternativa a esterificação catalisada por agentes químicos, a reação biocatalisada por lipases, apresenta diversas vantagens tais como: ocorrer em condições de temperatura e pressão moderadas; pH próximo ao neutro sem que haja reação secundária nem a formação de produtos secundários, redução da necessidade de processos de separação catalisador-produto, reduzindo custo de processos (RAJENDRAN *et al.*, 2009; SALIHU *et al.*, 2014).

2.3. AROMAS

De acordo com a legislação brasileira, a definição técnica de aromatizante pode ser descrita como substâncias ou misturas destas que apresentam propriedades odoríferas/sápidas que conferem ou intensificam o sabor dos alimentos, podendo ser classificados como aroma natural, aroma artificial ou idêntico ao natural (BRASIL, 2007). Os aromas identificados como naturais são aqueles obtidos exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos a partir de matérias-primas naturais, já os aromas ditos sintéticos são compostos químicos obtidos, por processos químicos ainda sendo classificados como aromas artificiais, e que não foram identificados em produtos de origem animal e nem vegetal, e os aromas idênticos ao natural são compostos químicos de síntese química que apresentam estrutura idêntica as moléculas encontradas em matérias-primas naturais.

O homem por apresenta um complexo sensorial composto por sistemas olfativos, gustativo, tátil, auditivo e visual (TEIXEIRA, 2009), e se utiliza desta capacidade para avaliar, comparar, diferenciar e quantificar sensorialmente (BIEDRZYCKI, 2008). Muitos estudos têm sido elaborados para avaliar o

comportamento positivo do homem frente aos aromas (GUÉGUEN e PETR, 2006), pois tais questões são de interesse industrial e comercial. Em 2012, o mercado de aromas e sabores movimentou mundialmente cerca de 11,2 bilhões de dólares com expectativas de atingir 30 bilhões de dólares em 2017, sendo visto como um segmento promissor. Os maiores *market shares* para aromas e sabores são a indústrias de alimentos e bebidas, sempre apresentando balança comercial superavitária desde 2008, início do estudo. O Brasil ainda é visto como importador de aromas, entretanto acompanhando o perfil mundial, as projeções para o setor até 2022 são ótimas (BNDES, 2014).

Além das lactonas, terpenos, ácidos graxos e pirazinas, os ésteres são muito utilizados como aromas pelo odor frutado que apresentam, sendo os primeiros flavorizantes sintetizados artificialmente (MARTINS, 2012) produzidos a partir de um álcool e um ácido graxo de cadeia curta (LORENZONI *et al.*, 2012). Porém, segundo a legislação vigente são considerados artificiais, sendo vistos, atualmente, com maus olhos pelos consumidores. Portanto, a biocatálise de aromas pode ser vista como uma alternativa, sendo que o processo microbiano e enzimático para obtenção de aromas é considerado um processo natural segundo normas internacionais (LORENZONI *et al.*, 2012; SERRA *et al.*, 2005).

Uma variedade grande de bioaromas pode ser sintetizada a partir de lipases imobilizadas em diferentes suportes (LORENZONI *et al.*, 2012; MARTINS, 2012; MATTE, 2015; MEDEIROS, 2013; RAJENDRAN *et al.*, 2009; SALYHU *et al.*, 2014; SILVA, 2014). O Quadro 4 apresenta um resumo dos principais aromas produzidos por lipases.

Quadro 4: Principais ésteres de aromas produzidos por lipases de diferentes fontes fúngicas.

Éster de aroma	Aroma	Origem	Referência
Acetato de butila	Abacaxi	<i>Rhizopus oryzae</i>	Salah et al. (2007)
Acetato de isoamila	Banana	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Todero <i>et al.</i> (2015)
Acetato de hexila	Notas verdes	<i>Mucor miehei</i>	Shieh e Chang (2001)
Butirato de butila	Abacaxi	<i>Candida rugosa</i> <i>Candida antarctica</i> <i>Rhizomucor miehei</i>	Oliveira <i>et al.</i> (2000) Martins (2012) Lorenzoni <i>et al.</i> (2012)
Valerato de isoamila	Maçã verde	<i>Rhizomucor miehei</i>	Ved e Pai (1996)

Valerato de pentila	Abacaxi/maçã	<i>Candida rugosa</i>	Raghavendra <i>et al.</i> (2014)
Caprilato de amila	Frutal	<i>Candida rugosa</i>	Saponjić <i>et al.</i> (2010)

2.4. ENERGIA ULTRASSÔNICA

O ultrassom é definido como uma onda sonora em uma frequência acima daquela perceptível ao ouvido humano. A energia ultrassônica pode ser dividida em duas: menor potência, com frequências variando entre 16 a 100 kHz, e de maior potência, com frequências acima de 100 kHz (HEAR, 2009; FAZLENA, NORSURAYA, NADIAH, 2013). O método ultrassônico é baseado na promoção de ondas de alta energia que provocam o fenômeno de cavitação em meios líquidos, sendo que as bolhas geradas alternam-se num ciclo de baixa e alta pressão. Esse movimento favorece um colapso intenso das bolhas, que implodem ocasionando colapsos subsequentes, fator que acelera a formação de reações químicas (CHEN *et al.*, 2011).

A energia ultrassônica é uma técnica promissora podendo ser utilizada em diversas aplicações com o propósito de homogeneização, desintegração, degaseificação, limpeza, extração, emulsificação e síntese de compostos químicos (FAZLENA, NORSURAYA, NADIAH, 2013). De acordo com Martins (2012), o emprego de energia ultrassônica em aplicações biotecnológicas não é comum, isto porque a intensa energia empregada pode romper células e desnaturar enzimas (SINESTERA, 1992) e que diversos estudos para melhoria de parâmetros em bioprocessos estão sendo desenvolvidos, apontando o uso desta tecnologia como uma alternativa aos métodos de agitação convencionais. A variação de parâmetros ultrassônicos, tais como temperatura e tempo, apresenta diversos efeitos físicos, químicos e biológicos e que devem ser observados a fim de melhorar o processo (ROKHINA, LENS, VIRKUTYTE, 2009). Além disso, o aumento da consciência ambiental mundial tem suscitado a busca por tecnologias sustentáveis, como uma nova fonte energética mais eficiente que pode ser aplicada aos processos industriais, sendo o ultrassom considerado uma tecnologia favorável neste aspecto pela ciência da Química Verde (SILVA e LACERDA, 2005).

As reações enzimáticas, dentre elas a esterificação, podem ser aceleradas com o uso do ultrassom, quando a agitação mecânica comum não for suficiente para

melhorar a transferência de massa no meio reacional, fator que deve ser favorecido especialmente em enzimas imobilizadas (FAZLENA, NORSURAYA, NADIAH, 2013). Porém a estabilidade e atividade da enzima deve ser avaliadas com cuidado, pois um aumento significativo na energia ultrassônica pode resultar em danos na configuração espacial do biocatalisador, devido a uma aceleração no choque entre das bolhas do colapso provocado (ZAKS e KLIBANOV, 1985). Poucos trabalhos envolvendo a síntese de aromas biocatalisada por enzimas utilizando energia ultrassônica têm sido apresentados na literatura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigo científico em língua inglesa que será enviado para publicação em periódico internacional. No trabalho referido foram elaborados testes preliminares para verificação do melhor éster a ser produzido pela ipase B imobilizada em PS-co-DVB/PS-co-DVB, definindo também o melhor solvente e a melhor concentração. Posteriormente, para otimização da reação, a influência e interação dos parâmetros temperatura, razão molar e quantidade de enzimas foi avaliado através de um delineamento composto central, seguido da análise pela metodologia de superfície de resposta. Avaliou-se também o uso de energia ultrassônica como alternativa à agitação mecânica, além do emprego de peneiras moleculares no meio reacional a fim de se obter maiores rendimentos.

Synthesis of butyl laurate by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on core-shell PS-co-DVB/PS-co-DVB particles

Joana Silva Alves, Vitoria Silveira Conter, Rafael C. Rodrigues*

Biotechnology, Bioprocess and Biocatalysis Group, Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Prof. Dr. Rafael C. Rodrigues, rafaelcrodrigues@ufrgs.br - www.ufrgs.br/bbb

Abstract

In the present work, the lipase B from *Candida antarctica* (CALB) immobilized on core-shell PS-co-DVB/PS-co-DVB particles was applied for the synthesis of butyl laurate. Initially, several alcohols and acids were tested varying the chain length. Among all the substrates evaluated, lauric acid and butanol presented the best results. Besides, solvent type and substrate concentration were tested and the reaction yield reached to 84.05 % using iso-octane as solvent in 1 h being possible to use 1.0 M of substrates. A central composite design was performed in order to analyze the influence of temperature, substrate molar ratio and enzyme content. The analysis was carried out by the response surface methodology and the optimal reaction conditions were 40 °C, 1.3:1 lauric acid:butanol ratio and 8 % (wt.) enzyme content. Under the optimal conditions, it was tested the addition of molecular sieves to continuously remove the formed water. Reaction yield was improved (92.3 %) using 60 mg of molecular sieves per mmol of lauric acid. The operational stability of the enzyme was tested in mechanical and ultrasonic agitation in consecutive batches. The enzyme could be reused presenting around 60 % of residual activity after seven cycles in both type of agitation.

Keywords: flavour esters, lipase B, immobilized enzymes, ultrasonic energy

1. Introduction

Lipases (EC 3.1.1.3) are enzymes able of acting primarily on hydrolysis reactions on acylglycerol esters bonds, but under specific conditions they can catalyze other reactions such as esterification, transesterification (acidolysis, interesterification, alcoholysis), aminolysis and tiotransesterification (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO, SOLDI, 2004). Due to their high catalytic activity, high selectivity, versatility and easy obtention from several microorganisms they became a very promising biocatalyst for industrial applications in food, chemical, pharmaceutical and textile (MATTE *et al*, 2016; LOTTI e ALBERGHINA, 2007; HOUDE, KADEMI, LEBLANC, 2004). In food industry, lipases have been used due to their ability to synthesise flavor esters, using fatty acids and alcohols as substrate (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006) since the

extraction of flavors from natural sources is an insufficient and an expensive method for industrial employment (ALVES *et al.*, 2015; LORENZONI. *et al.*, 2012) .Moreover becoming a very interesting commercial business, the chemical esterification produces nature identical or artificial flavours (LORENZONI. *et al.*, 2012) that have negative impacts on consumer choices (CHIAPPINI, 2008) and according to international regulations, those flavors obtained from biological routes can be classified as natural (LORENZONI. *et al.*, 2012)

Although enzymes on their free form display some drawbacks for biotechnological processes. Undoubtedly the most important problem is the enzyme cost itself (MARTINS *et al.*, 2011) An alternative to improve the catalytic activity, operational stability and turn the application into a cost-effective one, enzyme immobilization protocols have been developed (MATTE *et al.*, 2016; KRAJEWSKA, 2004) There is no general method of immobilization, therefore, to select the proper carrier and the appropriate technique some important topics must be considered like chemical characteristics, proteins composition, products and substrates properties, as well as the purpose use (MENDES *et al.*, 2011; MOHAMAD *et al.*, 2015; HOMAEI *et al.*, 2013).The core-shell polymerization technique produces particles with non-porous core and porous shell and it can be a useful carrier for enzyme immobilization (PINTO, FREIRE, PINTO, 2014; BESTETI, M. D. *et al.*, 2013) specially using lipase for esterification reaction and polystyrene as support (MANOEL *et al.*, 2016).The method proposes that in a first step, a non-porous structure (core) is formed by suspension and then by emulsion, a second step, a highly porous structure (shell) is produced, acting like a coat (PINTO, FREIRE, PINTO, 2014; BESTETI *et al.*, 2013; MANOEL *et al.*, 2016).Due to this, the technique promotes high amounts of enzyme binded to the carrier, besides the enhance on biocatalyst properties, stability and specificity (BESTETI *et al.*, 2013).

The use of ultrasound technology can improve the biotechnological reactions due to its ability to promote interactions between phases, specially for esterification reaction catalised by immobilized enzymes, it can decrease mass transfer limitations enhancing the synthesis yields (FAZLENA, NORSURAYA, NADIAH, 2013). These effects are possible because sonication stimulate a phenomenon known as cavitation, when bubbles collapse with a strong energy causing shock waves (CHEN *et al.*, 2011). Moreover, a worldwide conscious about environmental issues has been increased and new efficient technologies that reduces the energy consumption have been developed.

In this way, ultrasound can be a promising technique (SILVA and LACERDA, 2005; SINESTERA, 1992).

Therefore, the aim of this work was to evaluate the flavor synthesis by an immobilized lipase B from *Candida antarctica* (CALB) using core-shell polystyrene particles as support and divinylbenzene as crosslinking agent (PS-co-DVB/PS-co-DVB). Temperature, substrate molar ratio and concentration, enzyme amount, and type of acid and alcohol (ALVES *et al.*, 2015; SYAMSUL, K.M.W. *et al.*, 2010) were analyzed. The appliance of an ultrasonic bath was studied, since the ultrasonic energy has been referred as a green technology and responsible for improving the mass transfer in some systems due to its energy waves that create cavitation (FAZLENA, NORSURAYA, NADIAH, 2013; CHEN *et al.*, 2011). To shift even more the equilibrium reaction towards synthesis, the water content formed must be decreased (DUAN *et al.*, 2006) so the use of molecular sieves to remove water from media was also studied (VERMA, AZMI, KANWAR, 2011; FALLAVENA *et al.*, 2014).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Lipase B from *Candida antarctica* (CALB) immobilized on polystyrene support with core-shell polymerization mixed with divinylbenzene as a crosslinking agent, produced according to the support preparation and protocol immobilization described by Cunha *et al.* (2014) named as PS-co-DVB/PS-co-DVB, and was gently supplied from Chemical Institute, located on the Federal University of Rio de Janeiro.

All solvents, acids and alcohols were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (Sigma, St Louis, MO, USA). An ultrasonic bath (Unique Inc., model USC 2880 A, 40 Hz, 220 W, Brazil) and Dubnoff bath with mechanical agitation (Marconi Ltda, model MA 159, 220 W, Brazil) were used for the experiments.

2.2. Effect of acid and alcohol chain length on esterification

Acetic, butyric, caprylic and lauric acid were tested with ethanol, n-propanol, butanol and pentanol in the esterification reaction. Both alcohol and acid were used at a concentration of 0.1 M in each experiment. The reaction was performed in a 50 mL Erlenmeyer flask, using hexane as solvent. The concentration of CALB-PS-co-

DVB/PS-co-DVB was 10 % based on substrate mass. The reaction was carried out in a mechanical stirring for 1 h at 40 °C.

2.3. Effect of the position of the hydroxyl group of alcohol on esterification

Butyl laurate synthesis was evaluated changing the alcohol isomer: *n*-butanol, *iso*-butanol and *tert*-butanol. The reaction volume was 5 mL in 50 mL Erlenmeyer flask, using 0.1 M of lauric acid, 0.1M of each alcohol and hexane as solvent. The concentration of CALB-PS-co-DVB/PS-co-DVB was 10% based on substrate mass. The flask was placed on a mechanical stirring for 1h at 40 °C.

2.4. Effect of organic solvents on esterification

n-Hexane, cyclohexane, heptane and iso-octane were studied as solvents in the reaction with butanol and lauric acid at a molar ratio of 1:1 (0.1 M) in 50 mL Erlenmeyer flask. The concentration of CALB-PS-co-DVB/PS-co-DVB was 10 % based on substrate mass. The esterification was carried out in a mechanical water-bath at 40 °C for 1 h.

2.5. Effect of substrate concentration on esterification

Lauric acid and butanol concentration were varied from 0.1 to 1.5 M. The molar ration of 1:1, iso-octane as solvent, and 10% of CALB-PS-co-DVB/PS-co-DVB were carried out in 50 mL Erlenmeyer flask in a mechanical water-bath at 40 °C for 1 h.

2.6. Determination of esterification progress

The esterification progress was verified by determining the acid residual content in the reaction media by the titration of 0.5 ml of sample in 5 mL of ethanol as quenching agent using NaOH in different concentrations and phenolphthalein as indicator.

2.7. Experimental design

A central composite design (CCD) with three parameters (temperature, substrate molar ration and enzyme content) at five levels each was carried out to verify

the optimal conditions of butyl laurate synthesis. Coded and uncoded values for the variables are described in Table 1.

Table 1: Coded and uncoded variables used in central composite design

Variables	Name	Coded Levels				
		-1.68	-1	0	1	1.68
X ₁	Temperature (°C)	30	34	40	46	50
X ₂	Substrate Molar Ratio ^a	0.5:1	0.7:1	1	1.3:1	1.5:1
X ₃	Enzyme content (%) ^b	1	2.8	5.5	8.3	10

^a (acid lauric:butanol); ^b (by substrate mass)

The CCD with eight factorial points, six axial points and three replications at the central point, resulting in 17 experimental treatments is shown in Table 2) The mixture of lauric acid, butanol, iso-octane and enzyme was placed in the mechanical stirring for 1 h. In each case the yield of butyl laurate synthesis was determined.

Table 2: Experimental central composite design (CCD) matrix and the results

Experiment	X ₁	X ₂	X ₃	Yield (%)
1	-1	-1	-1	7.33
2	-1	-1	1	38.89
3	-1	1	-1	8.82
4	-1	1	1	89.18
5	1	-1	-1	13.11
6	1	-1	1	65.57
7	1	1	-1	15.34
8	1	1	1	93.77
9	-1.68	0	0	36.68
10	1.68	0	0	77.88
11	0	-1.68	0	22.46
12	0	1.68	0	82.12
13	0	0	-1.68	0.03
14	0	0	1.68	82.42
15	0	0	0	57.09

16	0	0	0	57.79
17	0	0	0	51.04

A second-order polynomial equation (1) for the variables was determined:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

Where Y is the response variable, β_0 is the constant, β_i , β_{ii} , β_{ij} are the coefficient for the linear, quadratic and interaction for the variables, respectively, and X_i and X_j are the coded levels.

2.8. Effets of molecular sieves

The effect of molecular sieves (4 Å) in the reaction was evaluated varying the concentration in 30, 60, 90 and 120 mg per mmol of lauric acid. The reaction of lauric acid and butanol (1.3:1 acid: alcohol, 1 M of acid), with CALB-PS-co-DVB/PS-co-DVB (8 %, by substrates mass) was carried out mechanical stirring at 40 °C for 1 h.

2.9. Operational stability

The immobilized enzyme was tested for repeated batches under the optimal conditions defined in the CCD (40 °C, 1.3:1 acid:alcohol, 8 % of enzyme content, for 1 h), under mechanical stirring and ultrasonication. After the esterification, the biocatalyst was separated from reaction media by filtration using filter paper, washed with iso-octane and dried at room temperature for 24 h until the next use.

2.10. Statistical analysis

The experimental design and the results were analyzed by Statistics 12.0 (Statsoft, USA). The statistical analysis of the model was performed as analysis of variance (ANOVA). The significance of the regression coefficients and the associated probabilities, $p(t)$, were determined by Student's t-test; the second order model equation significance was determined by Fisher's F-test.

3. Results and discussion

3.1. Effect of acid and alcohol chain length on esterification

The performance of CALB-PS-co-DVB/PS-co-DVB in the flavor ester synthesis reaction was tested varying the acid chain length from C₄ to C₁₂ and the alcohol chain from C₂ to C₅ under mechanical stirring. The results are presented in Figure 1. It can be seen, that the yield of esterification increased as higher as the acid chain length. Nevertheless, using the same acid and varying the alcohols, the reaction yield did not change with the increase of the alcohol chain length. Short and medium chain acids are commonly used for flavor ester synthesis attributed to their volatility (BRAULT *et al.*, 2014). Other authors with similar works with lipases also described the enhancement in the reaction yield associated with the increase of the fatty acid chain length (MARTINS *et al.* 2014; ABBAS and COMEAU, 2013; KUMAR, MODAK, MADRAS, 2005). However, for alcohol, controversive results about the effect of the chain length have been reported (VARMA and MADRAS, 2009; DIAZ *et al.*, 2010) These results assume that reaction yield does not exclusively depend on substrates chain length, since the specificity of substrate with the enzyme is an intrinsic characteristic, and it is dependent of the type of reaction (PINTO, FREIRE, PINTO, 2014) The reaction between lauric acid and butanol presented the highest esterification yield (84.05 %) and they were chosen as substrates for next experiments.

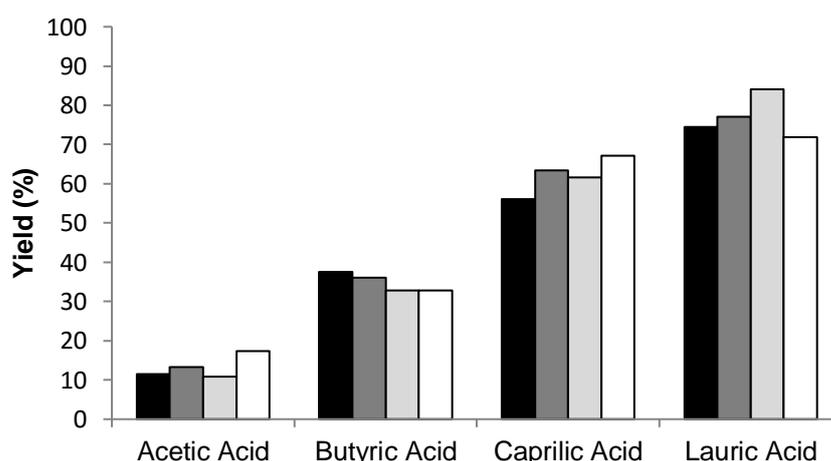


Figure 1: Effects of acid and alcohol chain length on esterification reaction catalyzed by CALB-PS-co-DVB/PS-co-DVB using mechanical stirring using acetic acid, butyric acid, caprylic acid and lauric acid. Each acid was evaluate with the following alcohols: Ethanol (black), n-propanol (dark grey), n-butanol (light grey) and pentanol (white).

3.2. Effect of the position of the alcohol hydroxyl group on esterification

Besides the alcohol chain length, the nature of alcohol ramification was tested. Three isomers of butanol were evaluated: *n*-butanol, *iso*-butanol and *tert*-butanol. As demonstrated in Figure 2, the linear alcohol, *n*-butanol, presented higher yield than branched alcohols *iso*-butanol and *tert*-butanol. Similar results were obtained by other authors (VARMA and MADRAS, 2009) and they explained that variations in the conversion rate can be attributed to alcohol molecular size and ramification, because the presence of a side chain group can promote steric hindrances to the active site. About the non reaction with *tert*-butanol, Kourist and Bornscheuer (2011) expressed that the most commercial enzymes did not accept tertiary alcohols as their substrates.

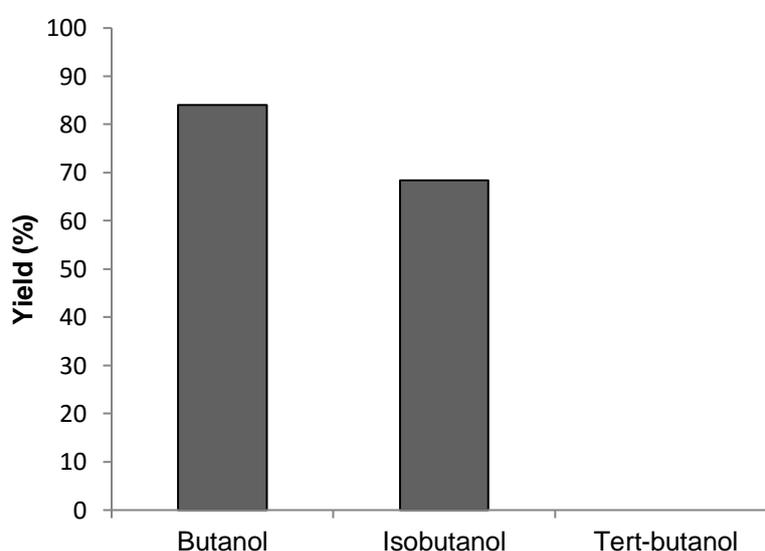


Figure 2: Effects position of the hydroxyl group of alcohol on esterification

3.3. Effect of organic solvents on esterification

Flavors synthesis occur in low water media and lipases are very stable in hydrophobic organic solvents showing different activity with different solvents (KUMAR, MODAK, MADRAS, 2005). In order to evaluate the influence of the solvents as the reaction media, *n*-hexane, cyclohexane, *n*-heptane and *iso*-octane were analyzed using lauric acid and butanol, as substrates. All solvents demonstrated to be a good alternative for this esterification. Even though, *iso*-octane, had higher activity compared to *n*-hexane, cyclohexane and *n*-heptane, with 87.66 % of esterification yield. It is reported in the literature the relation between polarity of organic solvent and

enzyme activity, since the biocatalysts presented higher activity on those solvents that had partition coefficient, log P, higher than 4 (LAANE *et al.*, 1987). The solvent characteristics and their effect on the butyl laurate synthesis for our work is shown in Table 3.

Table 3: Characteristics of solvents and their effect on butyl laurate synthesis

Solvent	Log P	Boiling point (°C)	Yield (%)
<i>n</i> -hexane	3.5	69.0	74.50
Cyclohexane	3.2	81.0	80.27
<i>n</i> -heptane	4.0	98.0	84.17
<i>Iso</i> -octane	4.5	99.0	87.66

3.4. Effect of substrate concentration on esterification

Generally, esterification assays are carried out with a fixed substrate molar ratio and this does not give a spread information about saturation enzyme kinetics (WEHTJE and ADLERCREUTZ, 1997). Moreover, for industrial application, it is interesting to use the highest concentration of substrate aiming to obtain more productivity (MATTE *et al.*, 2016; PINTO, FREIRE, PINTO, 2014; PALUDO *et al.*, 2015). The results for substrate concentration, in our work, were expressed in Figure 3. As can be seen in Figure 3 with 1.5 M of substrate concentration the enzyme activity decreased, there are two possible reasons: the increase of substrates concentration promotes an increase of products and one of them is water, shifting the equilibrium to hydrolysis, and the other one is the inhibition by substrates, specially the acid, that can cause a media acidification damaging the enzyme (ANSCHAU *et al.*, 2011). The highest concentration of substrates without inhibitory effect was 1.0 M.

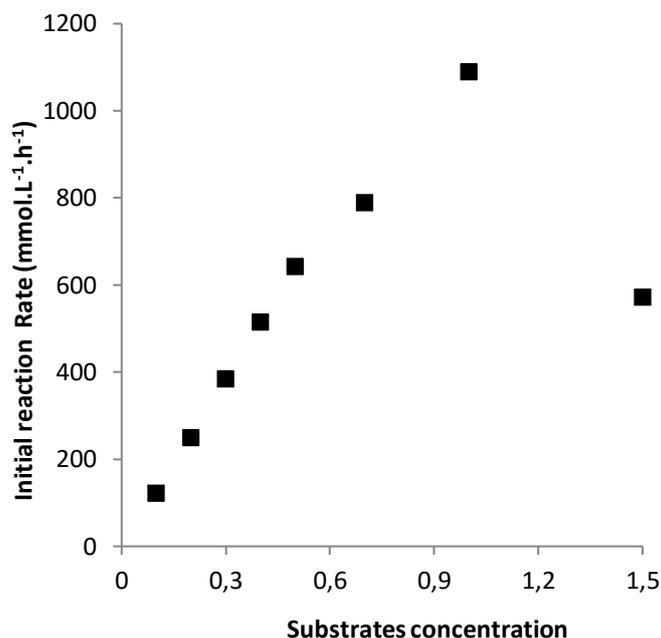


Figure 3: Effect of lauric acid concentration on initial reaction rate for butyl laurate.

3.5. Experimental design and model fitting

According to Table 2, the highest yield conversion obtained in 1 h using mechanical stirring, acid lauric and butanol as substrates, was 93.77 % for experiment 8 at 46 °C, molar ratio 1.3:1 acid: alcohol and 8.18 % enzyme content. In the experiment 13, using the lowest enzyme content (1 %), molar ratio of 1.3:1 acid:alcohol at 40 °C, no esterification catalysis was verified. As demonstrated, the synthesis of butyl laurate in 1 h showed a good esterification reaction presenting yields around 80 % presenting higher values, if compared to those presented in the literature. Fallavena *et al.* (2014) described lower values for synthesis of isobutyl butyrate catalyzed by an immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*, as well as Paludo *et al.* (2015) for synthesis of ethyl butyrate catalyzed by an immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. Matte *et al.* (2016) and Martins *et al.* (2011) applied immobilized lipase for synthesis of flavors esters and obtained similar yields as those presented in our work, although the time reaction was 6 h and 5 h respectively. Using lipases from different sources Silva and Jesus (2013) founded similar yield for butyl laurate synthesis (85 %) for those from *Pseudomonas cepacia* immobilized on chrysofile in 48 h reaction.

The determination coefficient ($R^2= 0.9522$) and the correlation coefficient ($R= 0.9758$) suggests an acceptable expression of the model and a suitable correlation between experimental and theoretical values for butyl laurate synthesis. Moreover, a second-order polynomial model equation was defined.

$$Y = 55.86 + 8.21X_1 + 13.29X_2 + 27.78X_3 - 5.90X_2^2 - 6.20X_3^2 + 7.11X_2X_3$$

(2)

Where Y is the percentage yield, and X_1 , X_2 and X_3 are the coded values of reaction temperature, substrate molar ratio and enzyme content, respectively.

3.6. Effect of the parameters and optimal conditions

The statistical analysis results are shown in Table 4. All the linear effects had a positive effect on butyl laurate synthesis. Enzyme content was the variable that presented the highest effect in the synthesis reaction and it is well known that the biocatalyst content increasing improves the reaction rate. The substrate molar ratio was also a significant parameter and, for this case, reactions conducted with more acid content than alcohol presented higher yields.

Table 4: Statistical results of CCD for butyl laurate synthesis

Variable	Effect	Standard Error	p-value
Mean	55.86	2.139	0.0014
Linear			
X_1	16.52	1.005	0.0144
X_2	26.74	1.005	0.005
X_3	55.88	1.005	0.0012
Quadratic			
X_1^2	-2.36	1.107	0.396
X_2^2	-5.90	1.107	0.0056
X_3^2	-13.74	1.107	0.025
Interactions			
$X_1 X_2$	-5.33	1.313	0.179
$X_1 X_3$	4.74	1.313	0.212
$X_2 X_3$	18.69	1.313	0.019

In order to determinate the optimal conditions for butyl larate synthesis using iso-octane as solvent, a response desirability profile was analysed using Statistica 12. Because the effect of the temperature presented lower values, it was decided to use a mean value 40 °C. Otherwise, according to the contour plot, when it was increased both parameters, substrate molar ration and enzyme content, better yields were obtained, as shown on Figure 4. The optimal conditions determined were: 40 °C, 1.3:1 acid:alcohol and 8 % of lipase content.

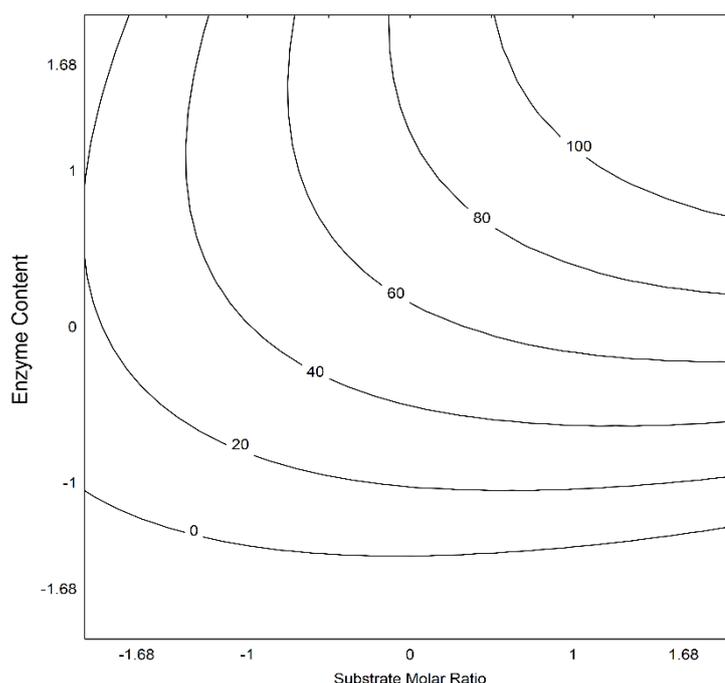


Figure 4: Contour plot for the interaction between substrates molar ratio and enzyme content with coded units

3.7. Model validation and time course reaction

In order to validate the prediction model an assay of butyl laurate was carried out under the optimal conditions. Besides to verify the effects of ultrasound on enzyme performance, the same experiment was performed under mechanical water-bath. Both reactions were carried out at 40 °C, substrate molar ratio of 1.3:1 and 8 % of lipase immobilized content. The results are presented in Figure 5. After 1 h, mechanical stirring and ultrasonic bath showed close yield values, 89.5 % and 88.1 % respectively. Both reactions, mechanical and ultrasonic agitation, demonstrated similar yields with the experimental results, validating the model statistically predicted. Good results with ultrasonic energy indicate that traditional mechanical agitation method can be substituted for ultrasonic.

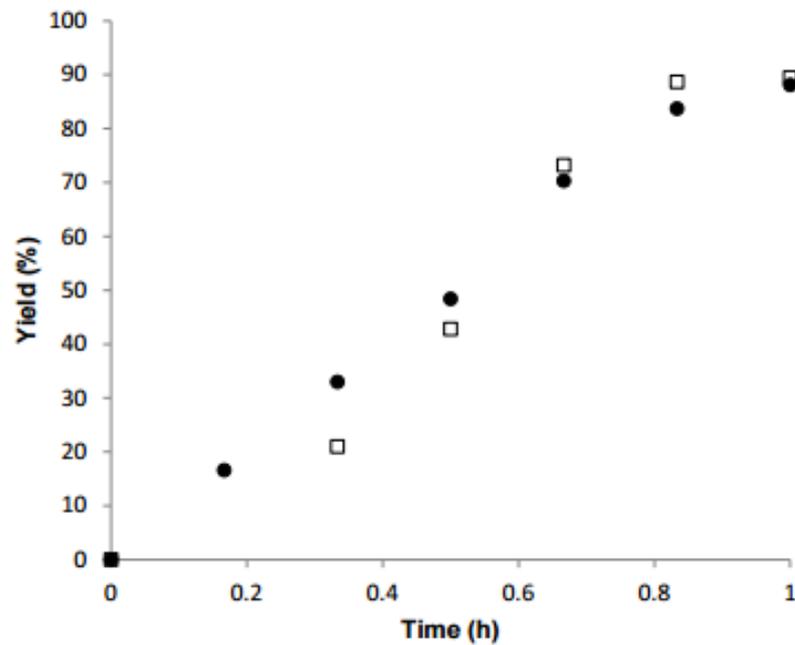


Figure 5: Kinetic assay of butyl laurate synthesis on (□) mechanical and (●) ultrasonic agitations

3.8. Effect of molecular sieves on esterification

To remove the water content in a lipase-catalyzed reaction it is not a easy procedu (YAHYA, ANDERSON, MOO-YOUNG, 1998). Molecular sieves are synthetic zeolites that can adsorb water from reaction media (SIGMA-ALDDRICH, 2016). The results presented in the Figure 6 suggest that all concentrations showed good results, although above 60 mg/mmol of acid of lauric acid there was a slightly decrease in the final yield. Although 90 and 120 mg/ mmol of lauric acid, the reaction yields had decreased, possibly due to the strong afinity of molecular sieves with water, that could result in enzyme dehydration (YAHYA, ANDERSON, MOO-YOUNG, 1998)

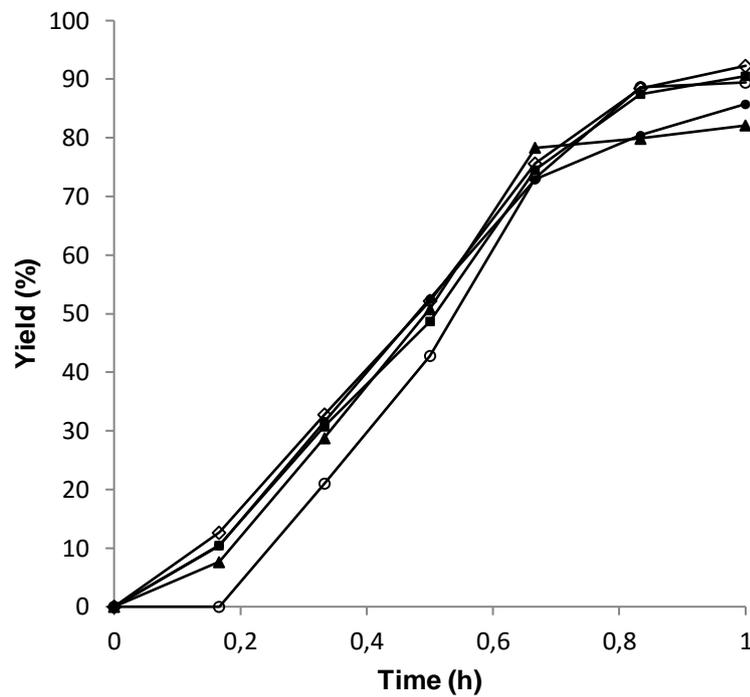


Figure 6: Effect of using molecular sieves in different concentrations: (○) without molecular sieves; (■) 30 mg /mmol of acid; (◊) 60 mg /mmol of acid ; (▲) 90 mg /mmol of acid ; (●) 120 mg /mmol of acid ;

3.9. Operational stability

To submit the enzyme at sequential batches is the main reason the immobilization technique has become a cost-effective method for industrial applications. Under the optimal conditions obtained through CCD, several uses was tested at mechanical stirring and ultrasonic bathes. After each reuse the biocatalyst was filtered and washed with iso-octane and dried for 24h at room temperature. This procedure is a good technique to prevent the enzyme inactivation by its substrates or products, such as water, that can affect the lipases due to an acidified water phase media (MARTINS *et al.*, 2011). The results in Figure 7 showed that the enzyme on both agitation methods presented, after seven cycles, a relative activity around of 60 %. Moreover, at most part of batches, the reaction performed on ultrasonic bath had a moderately higher relative enzyme activity, as observed by Martins *et al.* (2013)

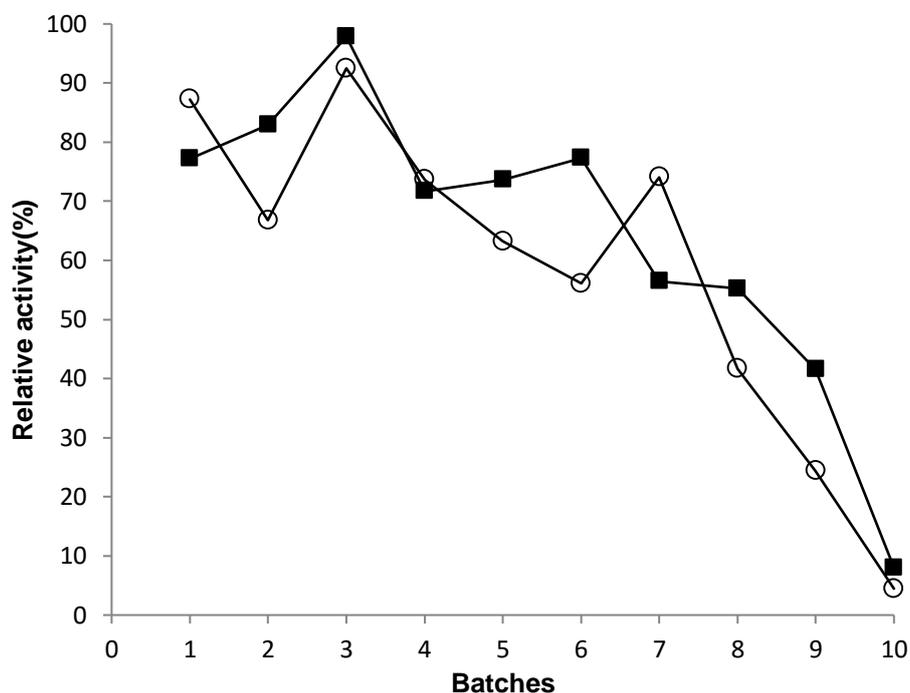


Figure 6: Operational stability on (○) mechanical (■) ultrasonic bathes

4. Conclusion

CALB immobilized on core-shell PS-co-DVB/PS-co-DVB was a good biocatalyst for butyl laurate synthesis. As longer the carbon chain of the carboxylic acid as higher the activity of the biocatalyst. Moreover, the highest activity (84.05 %) was in the synthesis of butyl laurate. The biocatalyst was also active at high substrate concentrations (1.0 M). The use of molecular sieves obtained the expected effect, decrease the water formed content and increase the yield reaction, presenting better results (92.3%) with 60 mg of molecular sieves per mmol of acid lauric. One of the purposes of immobilization was accomplished, the enzyme could be reused for at least seven times with 60% of relative yield and ultrasonic bath exhibited similar yields conversions and can be a good and eco-friendly substitute for mechanical stirring.

References

- ABBAS, H.; COMEAU, L.. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.589-595, abr. 2003
- ALVES, J. S. *et al.* Use of lecithase-ultra immobilized on styrene-divinylbenzene beads as catalyst of esterification reactions: Effects of ultrasounds. **Catalysis Today**, v. 255, p.27-32, out. 2015.
- ANSCHAU, A. *et al.* Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 11, p.2148-2156, nov. 2011.
- BESTETI, M. D. *et al.* Core/shell polymer particles by semibatch combined suspension/emulsion polymerizations for enzyme immobilization. **Macromolecular Materials And Engineering**, v. 299, n. 2, p.135-143, 22 out. 2013
- BRAULT, G. *et al.* Short-chain flavor ester synthesis in organic media by an *eE. Coli* whole-cell biocatalyst expressing a newly characterized heterologous lipase. **Plos One**, v. 9, n. 3, p.1-4, 2014.
- CHEN, H. *et al.* Optimization of ultrasound-accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 1, p.455-459, 2011
- CHIAPPINI, C. C.. Aromas naturais produzidos por microrganismo. **Food Ingredients Brasil**, São Paulo, v. 4, p.22-24, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/55.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2016.
- CUNHA, A. G. *et al.* Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica*. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p.59-67, 2014
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.623-630,
- DIAZ, M. D. R. *et al.* Enzymatic synthesis of short-chain esters in hexane and supercritical carbon dioxide: Effect of the acid chain length. **Engineering In Life Sciences**, 2010.
- DUAN, Y. *et al.* Effect of molecular sieves on lipase-catalyzed esterification of rutin with stearic acid. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 17, p.6219-6225, 2006
- FALLAVENA, L. P. *et al.* Ultrasound technology and molecular sieves improve the thermodynamically controlled esterification of butyric acid mediated by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Rsc Advances**, [s.l.], v. 4, n. 17, p.8675-8681, 2014.
- FAZLENA, H.; NORSURAYA, S.; NADIAH, S.N.. Ultrasonic assisted enzymatic reaction: An overview on ultrasonic mechanism and stability-activity of the

enzyme. **2013 IEEE Business Engineering And Industrial Applications Colloquium (beiac)**, p.85-90, 2013.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, AbdulA.. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p.235-251, 2006.

HEAR, C. J.. **Particle size characterization of ultrasonic treatment of dry milling coproducts for enhanced biofuel production**. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Industrial & Agricultural Technology, Iowa State University, Ames, 2009.

HOMAEI, A. A. *et al.* Enzyme immobilization: an update. **Journal Of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p.185-205,. 2013.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D.. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p.155-170, 2004.

KOURIST, R.; BORNSCHEUER, U. T.. Biocatalytic synthesis of optically active tertiary alcohols. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 91, n. 3, p.505-517, 21 jun. 2011.

KRAJEWSKA, B.. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p.126-139, ago. 2004.

KUMAR, R.; MODAK, J.; MADRAS, G.R. Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 3, p.199-202, maio 2005.

LAANE, C. *et al.* Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 30, n. 1, p.81-87, jul. 1987.

LORENZONI, A. S. G. *et al.* Optimization of pineapple flavour synthesis by esterification catalysed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Flavour And Fragrance Journal**, v. 27, n. 2, p.196-200,. 2012.

LOTTI, M.; ALBERGHINA, L.. Lipases: molecular structure and function. In: POLAINA, J.; MACCABE, A.p.. **Industrial Enzymes**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 263-282.

MANOEL, E. A. *et al.* Design of a core-shell support to improve lipase features by immobilization. **Rsc Adv.**, v. 6, n. 67, p.62814-62824, 2016.

MARTINS, A B. *et al.* Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p.18-25, jul. 2014.

MARTINS, A. B. *et al.* Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p.2311-2316, 2011.

MARTINS, A. B. *et al.* Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym 435: Enhanced activity and operational stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 5, p.1155-1160, 2013.

MARTINS, A. B.. Comparação entre energia mecânica e ultrassônica na síntese de ésteres de aromas catalisada por lipase. 2012. 77 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

MATTE, C. R. *et al.* Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p.67-75, maio 2016.

MATTE, C. R. *et al.* Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. **Journal Of of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p.67-75,, maio 2016.

MENDES, A A. *et al.* . Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011 .

MOHAMAD, N. R. *et al.* An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**v. 29, n. 2, p.205-220, 2015.

PALUDO, N. *et al.* The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p.89-94, jan. 2015.

PINTO, M.; FREIRE, D.; PINTO, J.. influence Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase b B from *candida Candida antarctica*. **Molecules** v. 19, n. 8, p.12509-12530, 2014

OKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J.. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends In Biotechnology**, v. 27, n. 5, p.298-306, 2009.

SHANKAR, S; AGARWAL, M; CHAURASIA, S.. Study of reaction parameters and kinetics of esterification of lauric acid with butanol by immobilized *Candida antarctica* lipase. **Indian J Biochem Biophys.**, Jaipur, p.570-576, 2013.

SIGMA-ALDRICH. **Technical Bulletins**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/learning-center/technical-bulletins/al-1430/molecular-sieves.html>>. Accessed in: 21 nov. 2016.

SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B. ;Desenvolvimento sustentável e química verde. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 28, n. 1, p. 103-110, 2005

SILVA, J. E. S.; JESUS, P. C.. Evaluation of the catalytic activity of lipases immobilized on chrysotile for esterification. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 2, p.157-162, jun. 2003.

SINESTERA, J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. **Ultrasonics**, v. 30 , n. 3, p 180- 185, 1992

SYAMSUL, K.M.W.. *et al.* Green synthesis of lauryl palmitate via lipase-catalyzed reaction. **World Applied Sciences Journal**, Dubai, v. 4, n. 11, p.401-407, nov. ,2010.

VARMA, M. N.; MADRAS, G.. Effect of chain length of alcohol on the lipase-catalyzed esterification of propionic acid in supercritical carbon dioxide. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 160, n. 8, p.2342-2354, 2009

VERMA, M. L.; AZMI, W.; KANWAR, S. S.. Enzymatic synthesis of isopropyl acetate by immobilized enzymatic *Bacillus cereus* cereuslipase in organic medium. **Enzyme Research**, v. 2011, p.1-7, 2011.

WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P.. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 55, n. 5, p.798-806, 1997

YAHYA, A. R.M; ANDERSON, W.; MOO-YOUNG, M.. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p.438-450, 1998

ZAKS A.; KLIBANO, A. M. Enzyme-catalyzed Processes in Organic Solvents, **Biochemistry**, v 82 p. 3192-3296, 1985

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A enzima imobilizada catalisou de modo efetivo a reação de esterificação com finalidade de obtenção de aroma. A síntese de laureato de butila apresentou ótimos

rendimentos em torno de 80%, estando de acordo e em alguns casos acima dos valores descritos na literatura sobre síntese de ésteres de aroma.

A utilização do delineamento composto central foi útil para otimização das condições da reação, no qual foi obtido maior rendimento (89,46 %) do que nos testes preliminares (82,05 %), porém com uma quantidade menor de enzima, principal fator que representa economia de custos nos processos biotecnológicos. Ainda pelo delineamento composto central foi possível avaliar que razão molar dos substratos e quantidade de enzima apresentam maior efeito positivo do que a temperatura, assim podendo ser utilizadas condições mais brandas. O banho ultrassônico pode ser substituído pela agitação mecânica sem prejuízos, pois ambas agitações apresentaram comportamento similar, porém o ultrassom apresenta mais vantagens sob ponto de vista econômico e ambiental. O objetivo de reutilizar a enzima por mais de uma vez foi atingido, sendo utilizada por sete ciclos consecutivos com atividade relativa de 60 %. Além do mais, a reação foi ainda melhorada pelo uso de peneiras moleculares na concentração de 60 mg/mmol ácido láurico, aumentando o rendimento (92,3 %) em relação aos testes preliminares, sendo que para maiores concentrações não houve melhor resultado.

Estudos posteriores podem ser elaborados para avaliar o comportamento da síntese de ésteres de aroma catalisada por esta enzima, como a elaboração de um delineamento composto central específico para o banho ultrassônico, bem como a estabilidade da lipase a temperaturas maiores. Para aplicação em alimentos, estudos de purificação também devem ser elaborados.

5. REFERÊNCIAS

BESTETI, M. D. *et al.* Core/shell polymer particles by semibatch combined suspension/emulsion polymerizations for enzyme immobilization. **Macromolecular materials and engineering**, v. 299, n. 2, p.135-143, 22 out. 2013.

BIEDRZYCKI, A. **Aplicação da avaliação sensorial no controle de qualidade em uma indústria de produtos cárneos**. 2008. 64 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BIER, M. C. J.. **Produção de compostos de aroma através da biotransformação do limoneno por fermentação em estado sólido utilizando resíduo natural de laranja como substrato**. 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BIOCATALYSTS. **Does your Process Require an Immobilised Enzyme?** 2016. Disponível em: <<http://www.biocatalysts.com/2016/02/does-your-process-require-an-immobilised-enzyme/>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

BITENCOURT, C. C.; PEREIRA, E. B. Síntese de ésteres formadores de aromas empregando lipases imobilizadas em quitosana por adsorção física. **Rev. Inic. Cientif.**, v. 4, 2009.

BNDES - BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO SOCIAL (Brasil). **Potencial diversificação da Indústria Química Brasileira: Relatório 4 - Aromas, sabores e fragrâncias**. São Paulo: Bain & Company, 2014.

BRASIL. Regulamento Técnico nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Aprova os **Procedimentos Para A Indicação do Uso de Aroma na Rotulagem de Alimentos**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BRAULT, G. *et al.* Short-chain flavor ester synthesis in organic media by an *e. Coli* whole-cell biocatalyst expressing a newly characterized heterologous lipase. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.1-4, 26 mar. 2014.

BRENA, M. B.; BATISTA-VIEIRA, F.. Immobilization of Enzymes. In: GUI SAN, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa, NJ: Humana, v.22: Methods in biotechnology, 2006. cap. 1, p.1-13.

BRÍGIDA, A. I. S.. **Imobilização de Lipases utilizando fibra de casca de coco verde como suporte para aplicações industriais**. 2010. 193 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

CHAMPE, P. C; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 544 p.p. 544 2006.

COLLA, L.M.; REINEHR, C. O.; COSTA, Jorge J. Alberto A. VieiraV.. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista Ciatec-upf**, v. 4, n. 2, p.1-14, 29 mar. 2013.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p.623-630, ago. 2004.

DAMODARAN, S.; PAKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fenemma's Food Chemistry**. 4. ed. Boca Raton: Crc, 2008. 1158 p.

DEREWENDA, U. *et al.* Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v. 31, n. 5, p.1532-1541, fev. 1992.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Enzimas: Natureza e Ação nos Alimentos**. 2011. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/166.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

GUÉGUEN, N.; PETR, C.. Odors and consumer's behavior in a restaurant. **International Journal Of Hospitality Management**, v. 25, n. 2, p.335-339, jun. 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A.. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p.235-251, jun. 2006.

HOMAEI, A. A. *et al.* Enzyme immobilization: an update. **Journal Of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p.185-205, 29 ago. 2013.

IQBAL, J.; IQBAL, S.; MÜLLER, C. E.. Advances in immobilized enzyme microbioreactors in capillary electrophoresis. **The Analyst**, v. 138, n. 11, p.3104-3116, 2013.

IUBMB. **Biochemical Nomenclature**. Disponível em: <<http://iubmb.org/biochemical-nomenclature/>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

IUPAC. **Classification and Chemical Characteristics of Immobilized Enzymes (Technical Report)** International Union of Pure and Applied Chemistry. Plymouth, UK, p.597-600. 1995.

IVANOV, A. E.; SCHNEIDER, M. P.. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 3, n. 6, p.303-309, out., 1997.

JAEGER, K.; REETZ, M. T.. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends In Biotechnology**, v. 16, n. 9, p.396-403, 1 set. 1998.

KATCHALSKI-KATZIR, E.. Immobilized enzymes — Learning from past successes and failures. **Trends In Biotechnology**, v. 11, n. 11, p.471-478, 1993.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Immobilized Living Cells and Their Applications In CHIBATA, I.; WINGARD JR., L.B.. **Immobilized Microbial Cells: Applied Biochemistry and Bioengineering**. New York: Academic, 1983.

KLEIN, M. P.. **Imobilização de β -galactosidase para obtenção de produtos lácteos com baixo teor de lactose**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de

Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

KRAJEWSKA, B.. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p.126-139, ago. 2004.

LEÃO, L. S.. **Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o ácido níobico**. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Química, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014. 1336 p.

LORENZONI, A. S. G. *et al.* Optimization of pineapple flavour synthesis by esterification catalysed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Flavour And Fragrance Journal**, v. 27, n. 2, p.196-200, 20 fev. 2012.

LOTTI, M.; ALBERGHINA, L.. Lipases: molecular structure and function. In: POLAINA, J.; MACCABE, A.p.. **Industrial Enzymes**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 263-282.

MANOEL, Evelin A. *et al.* Design of a core–shell support to improve lipase features by immobilization. *Rsc Adv.*, v. 6, n. 67, p.62814-62824, 2016.

MARTINS, A. B.. **Comparação entre Agitação Mecânica e Ultrassônica na síntese de Ésteres de Aromas Catalisada por Lipase**. 2012. 77 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p.1451-1463, maio 2007.

MATTE, C. R. **Estudos de imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em ImmoBead 150, caracterização dos derivados e suas aplicações em reatores contínuos e em batelada para a síntese de butirato de butila e biodiesel**. 2015. 163 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

MCMURRY, John. **Química Orgânica**. 6. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2005. 2 v.

MEDEIROS, C. R.. **Otimização da síntese de ésteres usados na indústria de sabores e aromas**. 2008. 46 f. Relatório Técnico (Estágio Supervisionado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MENDES, A. A. *et al.* Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENONCIN, S. *et al.* Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p.440-443, jun. 2009.

MOHAMAD, N. R. *et al.* An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p.205-220, 17 fev. 2015.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N.. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Processos Químicos/ Senai**, Goiânia, v. 5, n. 3, p.9-22, 2009.

MORDOR INTELLIGENCE. **Brazil Food Enzymes Market-Growth, Trends and Forecast (2015-2020)**. Hyderabad, India: 2016. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/brazil-food-enzymes-market-industry>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

NEVES, A. A. . S.. **Avaliação do Aproveitamento de Óleos Alimentares Usados Para a Produção de Biodiesel na Área Metropolitana do Porto**. 2008. 296 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto, 2008.

OLIVEIRA, P. C. de *et al.* Síntese do butirato de *n*-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, [s.l.], v. 23, n. 5, p.632-636, out. 2000.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V.M.; MALCATA, F. X.. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme And Microbial Technology**, [v. 27, n. 3-5, p.187-204, 2000.

PEREIRA, R. M. **Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas**. 2014. 31 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.

PIMENTEL, A.. **Síntese de Ésteres Catalisada por Lipases Imobilizadas em Filmes de PVA**. 2006. 47 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

PINTO, MartinaM.; FREIRE, DeniseD.; PINTO, JoséJ.. Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase b Bfrom *cCandida antarctica*. **Molecules**. v. 19, n. 8, p.12509-12530, 2014

POPPE, J. K.. **Síntese de Ésteres Metílicos catalisada por Lipase de Candida antartica Imobilizada em Suporte Hidrofóbicos**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V.. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 52, n. 1, p.207-219, 2009.

RESEARCH AND MARKETS. **Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food & Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region - Global Forecast to 2022**. Dublin, Ireland, 2016. Disponível em: <<http://www.researchandmarkets.com/research/rhtnkl/industrial>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

RODRIGUES, R. C.. **Síntese de Biodiesel através da Transesterificação Enzimática de Óleos Vegetais Catalisada por Lipase Imobilizada por Ligação Covalente Multipontual**. 2009. 183 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J.. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends In Biotechnology**, v. 27, n. 5, p.298-306, maio 2009.

SALIHU, A. *et al.* Esterification for butyl butyrate formation using *Candida cylindracea* lipase produced from palm oil mill effluent supplemented medium. **Arabian Journal Of Chemistry**, v. 7, n. 6, p.1159-1165, dez. 2014.

SANTOS, R. R. . **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação em estado sólido**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

SERRA, S; FUGANTI, C.; BRENNAN, E.. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends In Biotechnology**, v. 23, n. 4, p.193-198, abr. 2005.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p.627-662, dez. 2001.

SHIEH, C.; CHANG, S.. Optimized synthesis of lipase-catalyzed hexyl acetate in n - hexane by response surface methodology. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 3, p.1203-1207, mar. 2001.

SILVA, F. M.; LACERDA, P. S. B. d.; Desenvolvimento sustentável e química verde. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 28, n. 1, p. 103-110, 2005

SILVA, J. B.. **Produção de acetato de isoamila via esterificação enzimática em sistema livre de solvente**. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

SINESTERA, J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics*, v. 30 , n. 3, p 180- 185, 1992

SUDBRACK, T. S.. **Imobilização de lipase em montmorilonita e aplicação em reações oleoquímicas**.2012. 79 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

TEIXEIRA, L.V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, São Paulo, v.64, p.1-14, 2009.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F.. Immobilized enzymes: methods and applications. **Topics In Current Chemistry**,p.95-126, 1999.

TODERO, L. M. *et al.* Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 38, n. 8, p.1601-1613, 2015.

VED, J. J.; PAI, J. S.. Preparation of short chain esters by the lipase from *mMucor miehei* using heptane and silica gel. **Biotechnology Techniques**, v. 10, n. 11, p.855-856, nov. 1996.

ZAKS A.; KLIBANO, A. M. Enzyme-catalyzed Processes in Organic Solvents, **Biochemistry**, v 82 p. 3192-3296, 1985.