

REUTILIZAÇÃO DAS LIPASES DE *Candida antarctica* DO TIPO B (CALB) IMOBILIZADAS EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (NPM) NA PRODUÇÃO DE AROMAS

Maria Rafaela Costa Feitosa¹, Claudio Henrique Victor Porto², Pedro Henrique de Lima Gomes³, Francisco Thálysson Tavares Cavalcante⁴, Rodolpho Ramilton de Castro Monteiro⁵, Ana Kátia de Sousa Braz⁶, Aluísio Marques da Fonseca⁷, Maria Cristiane Martins de Souza⁸, José Cleiton Sousa dos Santos⁹

Resumo: O referente trabalho relata um estudo de viabilidade reutilizando as lipases de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) imobilizadas em nanopartículas magnéticas de ferro (NPM) e imobilizadas em resina acrílica (Novozym® 435), para a síntese de ésteres de butirato de etila e metila via esterificação para produção de aromas. Com a finalidade de comprovar a atividade dessas enzimas, os experimentos foram realizados analisando parâmetros de: temperatura, concentração de substrato, razão molar, velocidade de agitação e tempo de reação. Ao reutilizar a CALB-NPM, a maior conversão (78,48%) obtida foi utilizando a 35°C, 0,4 mol/L, 1:1, 150rpm e 8h de reação. Ao analisar a síntese do butirato de metila reutilizando CALB-NPM, uma maior conversão (80,67%) foi obtida utilizando 25°C, 0,5 mol/L, 1:1, 150rpm e 8h de reação. Para o reuso da Novozym® 435 na síntese do butirato de etila a melhor conversão (96,42%) foi obtida utilizando 25°C, 0,4 mol/L, 1:2, 150rpm e 8h de reação. Já para a síntese do butirato de metila reutilizando a Novozym® 435, os melhores resultados foram 25°C, 0,1 mol/L, 1:1, 150rpm e 8h de reação obtendo no final uma maior conversão (98,26%). Ao refazer os experimentos utilizando a Novozym® 435 sem reuso nas melhores condições obtidas foi de 98,30%. Ao comparar esses resultados aos de Souza (2013), a atividade catalítica dessas enzimas eventualmente diminuíram, porém, os resultados ainda se mostraram vantajosos, apresentando para ambos uma boa atividade catalítica, tornando seu uso promissor em produtos de interesse.

Palavras-chave: Lipase. Nanopartículas. Biocatalisadores. Reuso. Ésteres.

¹ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: rafaelecf@yahoo.com.br

² Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: claudiohenriquevictorporto@gmail.com

³ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: pedrodubass@gmail.com

⁴ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: thalysson.cavalcante13@gmail.com

⁵ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: rodolpho@aluno.unilab.edu.br

⁶ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: anakatia@unilab.edu.br

⁷ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: aluisiomf@unilab.edu.br

⁸ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: mariacristiane@unilab.edu.br

⁹ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: jcs@unilab.edu.br



INTRODUÇÃO

Os ésteres de ácidos graxos de cadeia curta estão frequentemente presentes na composição de produtos alimentícios, perfumes, bebidas, polímeros, cosméticos e farmacêuticos com a finalidade de realçar e imitar sabores e aromas amplamente empregados na indústria (XU et al., 2002; TAN et al., 2006; JIN et al., 2012). Esses ésteres formadores de aromas são obtidos atualmente por dois principais processos, a síntese química e a síntese enzimática,

Dentre as áreas de pesquisa focadas para estas finalidades, têm-se destacado muito nos últimos anos o uso de catalisadores biológicos, como as enzimas, que permitem o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos executados na natureza, proporcionando uma maior economia de energia e minimização da degradação térmica o que são provavelmente as maiores vantagens na substituição de tecnologias químicas (HASAN et al., 2006).

Diante desse contexto, a contribuição deste trabalho é um estudo de viabilidade de catalisadores para uso nos mais diversos sistemas, reutilizando as lipases do tipo B de *Candida antarctica* (CALB) e utilizando como suporte Nanopartículas Magnéticas de Ferro (NPM) e resina acrílica comercial (Novozym® 435), ambas as enzimas utilizadas anteriormente por Souza (2013), obtendo como principal finalidade comprovar a atividade dessas enzimas e a eficiência do estudo realizado no ano de 2013, para a produção do butirato de etila e metila.

METODOLOGIA

Segundo a metodologia utilizada por Souza (2013), o tratamento do suporte iniciou-se com a adição de solução de APTS ao suporte a uma temperatura de aproximadamente 100°C por 10 horas sob atmosfera de nitrogênio. Após o tratamento, as nanopartículas foram lavadas, separadas por magnetismo, e secadas. Em seguida se deu o processo de reticulação utilizando NPM suspensas em solução 25% de glutaraldeído. A mistura foi mantida sob agitação por 2 horas à 25°C. Por fim, para remover o excesso de glutaraldeído, o suporte foi lavado com tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 10,0.

As nanopartículas magnéticas foram imobilizadas após a realização do tratamento das mesmas por APTS e glutaraldeído 25%. Esse processo foi realizado pelo contato de nanopartículas com solução tampão de fosfato de sódio. O sistema foi mantido sob agitação controlada: 45 rpm tempo de contato como enzima-suporte foi estudado de 1,0 h. A enzima imobilizada foi removida da solução por magnetismo.

A quantidade de CALB imobilizada em NPM foi determinada através da medição da concentração inicial e final da CALB no sobrenadante de imobilização. A atividade hidrolítica da CALB solúvel e imobilizada foi determinada usando *p*-nitrofenol butirato (pNPB) como substrato, a pH 7,0 e 25°C.

Os experimentos foram executados por esterificação utilizando ácido butanóico, os álcoois (etanol ou metanol) e o heptano como solvente, em diferentes concentrações de substratos (0,1 - 1,0 mol/L), temperatura (25 - 55°C), razão molar (1:1 - 1:4), tempo de reação (1-10h) e massa do biocatalisador. A reação ocorreu em tubos plásticos de 2 ml, em um agitador orbital (50 - 250 rpm), (SOUZA, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito da temperatura foi analisado com a variação em 25 a 55°C, reutilizando a CALB – NPM, em 8h, 150 rpm, 0,2 mol/L de ácido butanóico em uma razão molar de 1:1 (ácido butanóico: etanol ou metanol), e heptano como solvente, obtendo no total 1 ml de volume reacional. As mesmas condições foram também analisadas reutilizando a Novozym® 435.

Para a análise do tempo de reação foi reutilizadas as enzimas, CALB-NPM e as lipases do tipo B imobilizada em resina acrílica (Novozym® 435) nas mesmas condições de temperatura (25°C), heptano como solvente, 0,5 mol/L de metanol e 0,4 mol/L de etanol em uma razão molar de 1:1 (ácido butanóico: álcool) totalizando um volume reacional de 1,0 mL em um intervalo de tempo de reação de 1-10h. Sob essas condições a Tabela 1 retrata o perfil obtido experimentalmente em ambas as situações.

Tabela 1 - Dinâmica da síntese de butirato de etila e metila para CALB-NPM e Novozym® 435

Tempo (h)	Conversão de ácido butanoico	
	CALB – NPM	Novozym – 435

	Butirato de etila (%)	Butirato de metila (%)	Butirato de etila (%)	Butirato de metila (%)
1	0 ± 0	14,69 ± 5,7	0 ± 0	47,58 ± 6,8
2	21,83 ± 10,2	13,48 ± 9,3	67,06 ± 4,5	19,36 ± 3,6
3	19,5 ± 1,6	5,46 ± 7,2	16,62 ± 2,7	2,34 ± 6,2
4	13,87 ± 3,4	19,91 ± 1,4	41,18 ± 3,7	9,99 ± 1,8
5	4,75 ± 1,9	12,83 ± 2,4	55,77 ± 2,5	18,79 ± 2,0
6	6,66 ± 1,1	5,23 ± 1,1	46,78 ± 4,1	16,77 ± 1,3
7	0 ± 0	10,11 ± 4,4	36,57 ± 1,8	13,58 ± 2,4
8	25,98 ± 1,2	31,78 ± 4,2	57,62 ± 7,2	60,01 ± 0,3
9	26,65 ± 4,7	24,44 ± 6,7	90,03 ± 3,1	96,93 ± 1,1
10	4,00 ± 4,6	12,23 ± 0,2	0 ± 0	2,25 ± 9,5

Fonte: Elaborada pela autora

Em análise a Tabela 1, as maiores conversões obtidas foram de 90,03% para o butirato de etila e 96,93% para o butirato de metila reutilizando a Novozym® 435 em um tempo de incubação de 9 horas para ambos os ésteres produzidos. Para a CALB-NPM os melhores resultados obtidos foram observados em um tempo de 9 horas de reação com uma conversão de 26,65% para o butirato de etila e 31,78% para o butirato de metila em um tempo de 8 horas. Souza (2013) nas mesmas condições referidas, também obteve um melhor resultado em um tempo de 8 horas de reação e após esse período foi então observado uma queda acentuada na conversão.

CONCLUSÕES

O reuso com as enzimas CALB-NPM e Novozym® 435, mostrou-se eficiente apresentando para ambos os biocatalisadores uma boa manutenção da atividade catalítica, porém como já esperado, suas atividades eventualmente diminuiram ao compará-las com os resultados obtidos por Souza (2013). Outro fato que deve ser ressaltado, foram as grandes variações nos resultados obtidos. Esses comportamentos podem ser explicados pelo número de ciclos e condições em que essas enzimas foram anteriormente submetidas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, professor José Cleiton e professora Maria Cristiane, por todas as oportunidades a mim concedidas e experiências repassadas, pelo exemplo de profissionalismo, paciência e principalmente pela disposição em ajudar sempre.

Aos amigos que formei durante essa árdua caminhada, que me ajudaram de forma direta e indiretamente, em especial ao Thálysson, Rodolfo, Cláudio e Pedro pelas experiências laboratoriais a mim repassadas.

À UNILAB, CNPq, CAPES e de um modo especial à FUNCAP, pelo apoio financeiro e oportunidade de obter as primeiras experiências de forma direta e consecutiva aos laboratórios.

REFERÊNCIAS

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

JIN, Z.; NTWALI, J.; HAN, S.; ZHENG, S.; LIN, Y. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. **Journal of Biotechnology**, Elsevier, 2012.

SANTOS, J.C.S. **Otimização de biocatalisadores: desenvolvimento de Estratégias para modulação de propriedades de enzimas por Técnicas físicas e químicas**. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-2015. 333 f. Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, UFC, 2015a.

SANTOS, J. C. S. et al. Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by altering its nanoenvironment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 77, p. 1–7, set. 2015b.

SOUZA, M. C. M. **Imobilização de Lipase de *Candida Antarctica* do Tipo B em Nanopartículas Magnéticas Visando a Aplicação na Síntese de Ésteres**. 2013. 87 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza/Ceará, 2013.

TAN, T.; CHEN, B-Q.; YE, H. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl palmitate by lipase immobilized on fabric membranes in the batch reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 41-45, 2006.

XU, Y.; WANG, D.; MU, X.; ZHAO, G.; ZHANG, K. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Elsevier, v. 18, n. 1, p. 29–37, 2002.