

PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS VISANDO A SÍNTESE DE AROMAS

Francisco Thálysson Tavares Cavalcante¹, Maísa Pessoa Pinheiro², Maria Cristiane Martins de Souza³, Luciana Rocha Barros Gonçalves⁴, José Cleiton Sousa dos Santos⁵,

Resumo: Nesse estudo, as enzimas *Candida antarctica* do tipo B (CALB) e Lecitase Ultra foram imobilizadas por ligação covalente multipontual, no suporte Immobead-350. Inicialmente foram estudadas as melhores condições de imobilização da lipase (pH de imobilização, presença de detergente, carga máxima), em seguida o biocatalisador foi testado quanto à sua estabilidade em diferentes condições para posterior utilização nas reações de interesse. De acordo com os resultados obtidos, a Lecitase imobilizada em IB-350 apresentou um rendimento de imobilização RI = 88,41 % e atividade do biocatalisador de Atd (U/g) = 15,42 ± 0,21. Para a enzima CALB, apresentou um rendimento de imobilização RI = 98,13 % e atividade do biocatalisador de Atd (U/g) = 6,26 ± 0,18. A capacidade máxima de imobilização do Immobead-350 foi de 100 mg / g de suporte, essa carga elevada é conseguida pelo grande de diâmetro de poro do suporte. Os resultados são bastante promissores e a próxima etapa do estudo será a aplicação na síntese dos aromas.

Palavras-chave: Aromas. Imobilização de enzimas. Biocatálise. Lipase.

INTRODUÇÃO

As lipases são as enzimas mais utilizadas em processos industriais e possuem uma grande variedade de aplicações, dentre elas, nas indústrias de alimentos, (como agentes aromatizantes em laticínios e melhorando o sabor em carnes, bebidas e pescados) surfactantes, papéis, couro, óleos naturais, farmacêutica e combustíveis (biodiesel) (KAPOOR; GUPTA, 2012; MESSIAS et al., 2011).

Immobead-350 é um de suporte constituído por um copolímero reticulado de acrílico que permite a imobilização covalente de vários tipos de enzimas (Dhake et al.2012).

¹ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: thalysson.cavalcante13@gmail.com

² Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química, e-mail: maisap.pinheiro@gmail.com

³ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, e-mail: mariacristiane@unilab.edu.br

⁴ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química, e-mail: lrg@ufc.br

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

Os bioaromas ou biofragâncias produzidos via rota enzimática representam uma promissora alternativa para a substituição dos aromas produzidos via rota química sintética ou extração de produtos naturais, devido principalmente à baixa temperatura de produção, menor quantidade de energia, maior eficiência na produção, melhor qualidade dos produtos produzidos considerados como naturais, menores impactos ambientais e resíduos gerados ao meio ambiente (BEN AKACHA; GARGOURI, 2015).

METODOLOGIA

-Imobilização enzimática

A enzima foi imobilizada no suporte por ligação covalente. As imobilizações foram realizadas usando 10 ou 50 mg de proteína por g de IB-350 seco. A quantidade remanescente de enzima foi adicionada em 1 mL de 25 mM de bicarbonato de sódio em pH 10, contendo 0,01% (v/v) triton x-100. A mistura foi posta sob agitação suave a 25 °C.

-Determinação da atividade enzimática e dos parâmetros de imobilização

A atividade da enzima solúvel e imobilizada foi determinada pela metodologia descrita por (Santos et al. 2017), com modificações. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de *p*NPB por minuto em pH 7,0 a 25 °C. O rendimento da imobilização (IY), atividade teórica (Att) e atividade recuperada (Atr) foram os parâmetros de imobilização utilizados para quantificar a imobilização do processo. Esses parâmetros foram calculados de acordo com (dos Santos et al. 2017).

-Síntese de aromas

Os ésteres foram obtidos a partir da reação de esterificação (livre de solvente) do ácido butanoico com os álcoois metanol, etanol e butanol em diferentes razões molares e com as demais condições (temperatura, agitação, tempo de reação e % em massa de catalizador) foram extraídas de Souza (2013) e Salihu (2014). A reação foi conduzida a 35 °C, à agitação orbital de 150 rpm, durante 8 horas com 30% de massa de catalizador

em relação à massa de substrato. Foram adicionados 5 ml de etanol para parar a reação. A conversão dos ésteres foi medida ao fim da reação por titulação com 20mM de NaOH usando fenolftaleína como indicador. Para cálculo dessa conversão, foi avaliado o índice de ácidos livres:

$$IA = M * MM_{NaOH} * f * \frac{V_{titulado}}{m_{sobrenadante}} \quad (1)$$

Onde IA é o índice de acidez (ácido livre remanescente), M é a molaridade do NaOH, MM é a massa molar de NaOH, f é o fator de correção do NaOH, $V_{titulado}$ é o volume de NaOH gasto na titulação do éster, $m_{sobrenadante}$ é a massa de sobrenadante extraída ao final da reação. Em seguida, para a conversão:

$$C(\%) = \frac{IA_i - IA}{IA_i} * 100 \quad (2)$$

Onde C é a conversão e IA_i é o índice de acidez do branco (substrato sem enzima).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Preparação dos biocatalisadores:

Na TABELA 1, são apresentados os resultados dos parâmetros de imobilização dos biocatalisadores preparados.

TABELA 1 - Parâmetros de imobilização de Lecitase em IB-350, os ensaios foram realizados em pH= 7,0, 25 mM, carga oferecida de 50 mg/g de suporte e 25°C. Parâmetros de imobilização de CALB em IB-350, os ensaios foram realizados em pH= 10,0, 25 mM, carga oferecida de 10 mg/g de suporte e 25°C.

Enzima	At_i (U/g)	At_r (U/g)	At_d (U/g)	RI (%)
CALB	16,23 ± 0,24	1,88 ± 0,36	15,42 ± 0,21	88,41
Lecitase	203,22 ± 0,40	3,79 ± 5,36	6,26 ± 0,18	98,13

Como pode ser observado na TABELA 1, foi conseguido elevados valores de imobilização enzimática, para CALB de 88,41% e para Lecitase de 98,13%. Além disso, os derivados apresentaram atividade de $15,42 \pm 0,21$ U/g para CALB e de $6,26 \pm 0,18$ U/g para Lecitase. Isso pode estar relacionado ao valor do pH de imobilização. O aumento do valor de pH (por exemplo, pH10) pode permitir o aumento da reatividade da enzima-suporte, obtendo-se uma relativamente intensa ligação covalente multipontual, o que permite obter uma elevada estabilização das enzimas através dessa técnica de imobilização. Além disso, essa maior atividade em um elevado valor de pH pode ser explicada pelo fato de os grupos amino da proteína normalmente estarem desprotonados e poderem reagir com os grupos ativados do suporte. Também, os resíduos lisina, que são normalmente abundantes na superfície da enzima, são responsáveis pela formação de enlaces com o suporte, no entanto, eles estarão disponíveis para a reação em pH igual ou superior a 10, pois possuem pKa em torno de 10,5

CONCLUSÕES

Diante dos resultados conseguidos, constata-se que o Immobead-350 é um eficiente suporte para imobilização da lipase de *Candida antártica* do tipo B e Lecitase, devido às suas características intrínsecas, como grande diâmetro de poro e presença de grupos epóxi ativados, disponíveis para imobilizar e estabilizar a enzima por meio de ligações covalentes multipontuais. As melhores condições de imobilização da CALB e Lecitase foram testadas e a atividade do derivado mostrou-se mais alta quando a imobilização ocorreu a pH 10, indicando uma maior reatividade entre enzima e suporte em valores de pH alcalino, o que facilita a ligação covalente multipontual.

A próxima etapa do trabalho será realizar a síntese de aromas com os biocatalisadores produzidos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao CNPq, Capes e Funcap pelo fomento ao projeto.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, O. et al. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220–1227, ago. 2012.

BEN AKACHA, N.; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 675–706, abr. 2015.

CORRADINI, Maria Carolina C. et al. Optimization of Enzymatic Synthesis of n-Propyl Acetate (Fruit Flavor Ester)–Effect of the Support on the Properties of Biocatalysts. *Chemical Engineering Communications*, v. 203, n. 11, p. 1432-1442, 2016.

DHAKE, K.P., Bhatte, K.D., Wagh, Y.S., Singhal, R.S., Bhanage, B.M., 2012. Immobilization of steapsin lipase on macroporous immobead-350 for biodiesel production in solvent free system. **Biotechnol. Bioprocess Eng** 17(5), 959–965.

DOS SANTOS, J.C.S. et al. Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. **Biotechnol Rep**, 14, 16-26, 2017.

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. **RSC Adv.**, v. 5, n. 27, p. 20639–20649, 2015a.

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. *Process Biochemistry*, v. 50, n. 6, p. 918–927, jun. 2015b.

DUBAL, S. A et al. Biotechnological routes in flavour industries. **Review Literature And Arts Of The Americas**, v. 14, n. March, p. 15, 2008.

ESCANDELL, J. et al. Enzymatic synthesis of butyl acetate in a packed bed reactor under liquid and supercritical conditions. **Catalysis Today**, v. 255, p. 3–9, 2015.

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.

SOUZA, Maria Cristiane Martins de. Imobilização de lipase de *Candida Antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres. 2013. **Tese de Doutorado**.