

Avaliação das condições reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila empregando lipase de *Candida rugosa*

Fabício Maciel Gomes, Messias Borges da Silva, Heizir Ferreira de Castro*

Departamento de Engenharia Química – DEQUI, Faculdade de Engenharia Química de Lorena - FAENQUIL

Lipase de Candida rugosa na forma livre foi usada na síntese de butirato de butila pela esterificação direta de n-butanol com ácido butírico. Um planejamento fatorial completo 2⁴ foi empregado para determinar a influência da razão molar do álcool para ácido (1:0,5-2,5), concentração de agente dessecante (0-20%), concentração de enzima (40-80 mg) e temperatura de incubação (30-60 °C) no rendimento de esterificação. A concentração de agente dessecante foi o fator mais significativo na esterificação, sendo sua influência negativa. O progresso da esterificação foi favorecido para substratos contendo ácido em excesso, mesmo em baixa concentrações de enzima (40 mg), sendo a conversão de 50%. Na região avaliada, a formação do butirato de butila (26,67 g/L) foi maximizada para razão molar (1:2,5), ausência de agente dessecante, concentração de enzima (80 mg) e temperatura de incubação de 30 °C.

Unitermos

- Lípase
- *Candida rugosa*
- Esterificação
- Planejamento de experimentos

*Correspondência:

H. F. Castro
Faculdade de Engenharia Química de
Lorena – FAENQUIL
Departamento de Engenharia Química
– DEQUI
Caixa Postal 116
12.600-970 – Lorena – SP
E-mail: heizir@dequi.fauenquil.br

INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas em meio aquoso foi extensamente usada em processos catalíticos, por vários anos. Porém, seu uso tornou-se limitado, pelo fato de muitos substratos serem pouco solúveis em água, o que demandava grande volume reacional e procedimentos de separação complexos. O uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas superou esse problema e o desenvolvimento de novos métodos de imobilização permitiu que várias reações pudessem se tornar viáveis. A adição de quantidade moderada de solvente orgânico é forma direta de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e de tornar a reação possível (Aires-Barros, 2002).

Uma das principais vantagens da catálise em meio orgânico é a possibilidade de deslocar o equilíbrio

termodinâmico de reações que seriam impossíveis em meio aquoso, pela extração dos substratos e/ou produtos para a fase aquosa e/ou orgânica ou pela diminuição da quantidade de água do meio reacional. Desta forma, reações como a esterificação e as interesterificações tornam-se viáveis industrialmente (Sharma *et al.*, 2001).

Entre os processos enzimáticos de maior interesse industrial estão as reações catalisadas pelas lipases, as quais representam aproximadamente 20% das biotransformações realizadas atualmente (Faber, 1997). Lipases (triacilglicerol hidrolases E.C. 3.1.1.3) são obtidas de fontes microbianas, animais e vegetais e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. A hidrólise de triacilgliceróis utilizando lipases é reação reversível, portanto o equilíbrio pode ser alterado pela variação de concentração de

reagentes ou produtos. Essas duas reações básicas podem ser combinadas de modo seqüencial, fornecendo um grupo de reações denominado interesterificação (Castro, Anderson, 1995). Essas reações usualmente são processadas com alta regio-e/ou enantiosseletividade, tornando as lipases um importante grupo de biocatalisadores. As razões desse enorme potencial biotecnológico das lipases incluem fatos relacionados com: i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; ii) não requerem a presença de cofatores e, iv) exibem alta enantiosseletividade (Jaeger, Reetz, 1998).

Embora sua função natural seja a quebra das ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos. Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para efetuar reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes empregados (Balcão *et al.*, 1996).

Dos possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres se apresenta como vertente bastante promissora, em função da importância de inúmeros ésteres na vida cotidiana (Bosley, 1997). Produtos naturais, tais como: triglicerídeos, fosfolipídeos, esteróides, aromatizantes e fragrâncias apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas que possuem (Lortie, 1997).

Industrialmente, a esterificação empregando a enzima lipase foi comercializada pela Unichema International para a produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de pureza e qualidade, como o isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilexilpalmitato, que são ingredientes empregados na formulação de cremes cosméticos e outros produtos de higiene. O processo permite a recuperação da preparação enzimática e sua reutilização em bateladas subseqüentes (Bosley, 1997).

Os ésteres de glicerol apresentam, também, relevantes propriedades como agentes emulsificantes e, dependendo de sua composição, podem fazer parte de sistemas emulsificantes para uso em cremes, molhos e loções (Harwood, 1989). Uma outra aplicação importante desta tecnologia é a produção de ésteres aromatizantes, principalmente para o uso em diversos produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. O mercado mundial para esses compostos foi avaliado em US\$ 3 bilhões, um montante que representa aproximadamente um quarto do valor do mercado de aditivos alimentares (Vulfson, 1993). Além disso, quando preparados por processos enzimáticos po-

dem ser caracterizados como naturais ou idênticos ao natural, sendo, portanto, preferidos pelo mercado consumidor.

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas por esta técnica, a síntese enzimática de ésteres apresenta dificuldades técnicas em função do complexo mecanismo da ação enzimática em meios orgânicos. Diversos parâmetros, como por exemplo, hidratação da enzima, temperatura, concentração do substrato, tamanho da cadeia e estrutura química, podem afetar o desempenho da síntese (Yahya *et al.*, 1998; Loter, 1997).

Neste trabalho, será tratada apenas a esterificação de álcool com ácidos, embora os ésteres possam ser obtidos por transesterificação. Como modelo de estudo foi adotado a obtenção do butirato de butila, um importante éster aromatizante de grande aplicação nas indústrias alimentícias, empregando uma preparação comercial de enzima solúvel (*Candida rugosa*). Os experimentos foram realizados adotando a metodologia de planejamento estatístico, que possibilita verificar a influência das variáveis e suas interações no rendimento de um determinado processo com grande economia de tempo, material e recursos (Barros Neto *et al.*, 1995; Box *et al.*, 1978).

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foi utilizada lipase de origem microbiana (*Candida rugosa*) adquirida comercialmente da Sigma Co, EUA, contendo lactose (*Candida rugosa* lipase, Tipo VII), com atividade específica média de 1440 U/mg proteína. Como materiais de partida foram utilizados *n*-butanol (Merck) e ácido butírico (Vetec). Todos os outros reagentes foram de grau analítico e desidratados previamente com peneira molecular na forma de bastões com diâmetro de partícula entre 4 a 8 mesh (Aldrich 4 Å), quando necessário.

Planejamento Experimental

A influência de diversos fatores no rendimento da esterificação enzimática do butanol com ácido butírico foi verificada por meio de planejamento fatorial constituído de 2⁴ experimentos sem replicata. A escolha dos fatores e dos níveis foi baseada em estudos preliminares (Castro *et al.*, 1996), sendo considerada para este sistema, a influência de quatro variáveis de controle: razão molar (x_1), porcentagem de agente dessecante (x_2), concentração de lipase (x_3) e temperatura (x_4) em uma variável resposta específica do processo (rendimento em éster). Todos os experimentos foram efetuados de maneira randômica.

Quatro experimentos foram realizados no ponto central, para estimativa do erro experimental. As reações foram conduzidas em reatores fechados de 100 mL contendo 20 mL de substrato numa concentração fixa de butanol (0,20 M) e concentrações apropriadas de ácido butírico (0,10 a 0,5 M). Heptano foi usado como solvente. As misturas foram incubadas com concentrações adequadas de lipase (40 a 80 mg) em presença ou ausência de agente dessecante (0-20% p/v) na temperatura requerida (30 – 60 °C). Todos os experimentos foram realizados em condições de agitação constante de 150 rpm, durante 18 horas. A análise dos dados foi efetuada por meio do programa Statistica (versão 5.0). Os resultados foram expressos em tabelas de estimativas de efeitos e ainda em tabela de análise de variância com colunas de causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQF), soma média quadrática médio (SMQF) e teste F.

Métodos Analíticos

As concentrações do *n*-butanol e butirato de butila foram medidas por cromatografia fase gasosa (Cromatógrafo GC 37), empregando uma coluna empacotada (6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh), numa temperatura de

60 °C e hexanol como padrão interno. O teor de ácido butírico foi determinado por titulação de alíquotas diluídas em etanol, empregando solução alcoólica de KOH 0,02 N e fenolftaleína como indicador. O grau de esterificação foi expresso em percentual molar do butanol consumido, empregando a equação 1:

$$\% \text{ molar} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

onde: C_0 = concentração inicial do álcool e C = concentração do álcool em um determinado tempo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos das diferentes variáveis experimentais foram simultaneamente investigados empregando planejamento experimental completo 2^4 , conforme matriz experimental mostrada na Tabela I, a qual também apresenta os rendimentos de esterificação alcançados. Verifica-se que a preparação de lipase foi capaz de formar butirato de butila no meio reacional em todas as condições estudadas. As concentrações de butirato de butila variaram entre 7,67 a 26,68 g/L após 18 horas de reação, correspondendo a

TABELA I – Matriz padrão para o planejamento experimental 2^4 e resultados obtidos

Ensaio	x_1	x_2	x_3	x_4	Razão molar ButOH: ABut	Agente dessecante (%)	Massa lipase (mg)	Temperatura (°C)	Butirato de butila (g/L)	Rendimento de esterificação (%)
1	-	-	-	-	1: 0,5	0	40	30	3,870	13,46
2	+	-	-	-	1: 2,5	0	40	30	20,76	72,10
3	-	+	-	-	1: 0,5	10	40	30	10,14	4,750
4	+	+	-	-	1: 2,5	10	40	30	0,920	3,200
5	-	-	+	-	1: 0,5	0	80	30	7,470	25,95
6	+	-	+	-	1: 2,5	0	80	30	26,67	92,62
7	-	+	+	-	1: 0,5	10	80	30	0,880	2,660
8	+	+	+	-	1: 2,5	10	80	30	2,110	7,330
9	-	-	-	+	1: 0,5	0	40	60	16,06	55,77
10	+	-	-	+	1: 2,5	0	40	60	14,15	49,14
11	-	+	-	+	1: 0,5	10	40	60	7,120	24,72
12	+	+	-	+	1: 2,5	10	40	60	1,520	5,280
13	-	-	+	+	1: 0,5	0	80	60	16,32	56,67
14	+	-	+	+	1: 2,5	0	80	60	20,66	71,77
15	-	+	+	+	1: 0,5	10	80	60	6,450	22,41
16	+	+	+	+	1: 2,5	10	80	60	0,980	3,410
17	0	0	0	0	1: 1	5	60	45	3,020	10,50
18	0	0	0	0	1: 1	5	60	45	3,370	11,72
19	0	0	0	0	1: 1	5	60	45	2,800	9,750
20	0	0	0	0	1: 1	5	60	45	2,580	8,980

rendimentos de esterificação de 2,66 e 92,62%, respectivamente. Os rendimentos mais elevados foram verificados para as reações realizadas em meios contendo excesso do doador do grupo acila (razão molar ButOH: AcBut 1;2,5), ausência de agente dessecante e na temperatura de 30 °C (Ensaio 2, 6, 8). Verifica-se, ainda, que independente das outras variáveis, a presença de agente dessecante no meio reacional provocou decréscimo acentuado no rendimento de esterificação.

O efeito individual dos fatores experimentais e de suas interações sobre o rendimento de esterificação foi avaliado estatisticamente pelo Programa Statistica 5.0 (Tabelas II e III).

A Tabela II reúne os dados da análise dos efeitos, estimativa do erro padrão e o teste t de Student para o rendimento do éster (y). Dentro da região analisada, verifica-se que apenas a concentração de enzima (x_3) não foi estatisticamente significativa, $p > 0,1$. O efeito mais importante foi verificado para a variável agente dessecante (-45,3) seguida da razão molar (12,31) e temperatura (8,39). Os efeitos das interações x_1x_2 (razão molar e agente dessecante) e x_1x_4 (razão molar e temperatura) foram mais significativos que os efeitos principais, com exceção do efeito do agente dessecante ($p < 0,01$). Os efeitos constatados para as variáveis x_1 (razão molar) e x_4 (temperatura) estão em consonância com os resultados descritos na literatura para sistemas similares (Yahya *et al.*, 1998; Castro, Anderson, 1995), entretanto, o efeito negativo e altamente significativo ($p < 0,01$) constatado para a variável x_2 (agente dessecante) no rendimento de síntese do butirato de butila foi um fato imprevisto. Nas reações de esterificação, a água formada como sub-produto representa um fator

limitante, favorecendo a reação reversa (hidrólise de éster) (Castro, Anderson, 1995). Nesse caso específico, são comuns procedimentos de remoção desse subproduto por técnicas adequadas (Yahya *et al.*, 1998), incluindo a utilização de agentes dessecantes, conforme adotado no presente trabalho.

Duas hipóteses podem ser consideradas para explicar esse fato. A primeira é baseada no conceito teórico que há nas enzimas uma pequena camada de hidratação, que atua como componente primário do microambiente enzimático, servindo de tampão entre a superfície da enzima e o ambiente (Costa, Amorim, 1999). Em reações conduzidas em ambientes não-aquosos, a interação entre os solventes orgânicos e as moléculas de água ligadas à enzima controla a atividade enzimática (Aires-Barros, 2002). Sabe-se que solventes que sejam capazes de subtrair esta água estrutural provocam a inativação da enzima (Gorman, Dordisck, 1992). No caso do estudo em análise, a adição do agente dessecante no meio reacional previamente desidratado pode ter reduzido significativamente não só o teor de água formado como também retirado uma parte da água da camada que envolve a enzima, afetando, desta forma, sua conformação tridimensional (Costa, Amorim, 1999).

A segunda hipótese de ordem prática pode ser associada a grande afinidade das lipases por superfícies sólidas provocando (induzindo) a sua adsorção na superfície da peneira molecular, um material em forma de *pellets* com 4 Å de diâmetro, que, nesse caso, estaria sendo usado pela enzima como suporte de imobilização. Esse efeito de insolubilização espontânea e não controlada da lipase na peneira molecular pode ter ocasionado proble-

TABELA II - Estimativa dos efeitos, erros padrão, teste t de Student para o rendimento de esterificação de acordo com o planejamento fatorial 2⁴

Variáveis	Efeitos	Erros-padrão	Valores-t	p
Média	31,95	± 1,81		
Razão molar (x_1)	12,31	± 3,62	3,400	0,00940 ^a
Agente dessecante (x_2)	-45,47	± 3,62	12,55	0,00001 ^a
Enzima (x_3)	6,80	± 3,62	1,880	0,09733
Temperatura (x_4)	8,39	± 3,62	2,320	0,04928 ^b
x_1x_2	-21,14	± 3,62	5,840	0,00039 ^a
x_1x_3	4,55	± 3,62	1,260	0,07597
x_1x_4	-19,80	± 3,62	5,470	0,00060 ^a
x_2x_3	-7,34	± 3,62	2,020	0,05109
x_2x_4	1,08	± 3,62	0,300	0,45766
x_3x_4	1,96	± 3,62	0,540	0,21078

^a $p < 0,01$ ^b $p < 0,05$

mas de transferência de massa dos reagentes para o sítio catalítico da enzima reduzindo assim o rendimento da síntese.

Embora o mecanismo não esteja claro, os resultados obtidos sugerem que a influência exercida pelo agente dessecante no desempenho da síntese decorreu de interações fracas entre a lipase e a superfície do agente dessecante, principalmente se for considerado que em catálise enzimática em solventes orgânicos, a enzima permanece insolúvel.

Com base nos resultados, observa-se tendência experimental e um comportamento definido, demonstrando em termos gerais que um aumento da resposta avaliada (rendimento) pode ser verificado em meios reacionais contendo excesso de doador do grupo acila (nível alto de razão molar) e em ausência de agente dessecante.

A validade do modelo foi constatada por meio da análise de variância (Tabela III), obtendo-se regressão estatisticamente significativa ($p < 0,05$) com coeficiente de correlação (R^2) de 0,92. O modelo matemático que representa o rendimento de esterificação, considerando os termos que realmente influenciam, pode ser expresso pela equação 2

$$\hat{y} = 31,95 + 6,15 \cdot x_1 - 22,73 \cdot x_2 + 4,2 \cdot x_4 - 10,57 \cdot x_1 x_2 - 9,9 \cdot x_1 x_4 \quad (2)$$

onde \hat{y} = rendimento em éster (%), x_1 , x_2 e x_4 representam: razão molar, agente dessecante, e temperatura, respectivamente.

A superfície de resposta (Figura 1) e os valores preditos pelo modelo (Figura 2) indicam que o rendimento máximo de esterificação pode ser obtido em sistemas reacionais valor alto para concentração de lipase (80 mg),

razão molar [butanol]/[ácido butírico] 1: 2,5 e ausência de agente dessecante. trabalhando em temperatura baixa (30 °C).

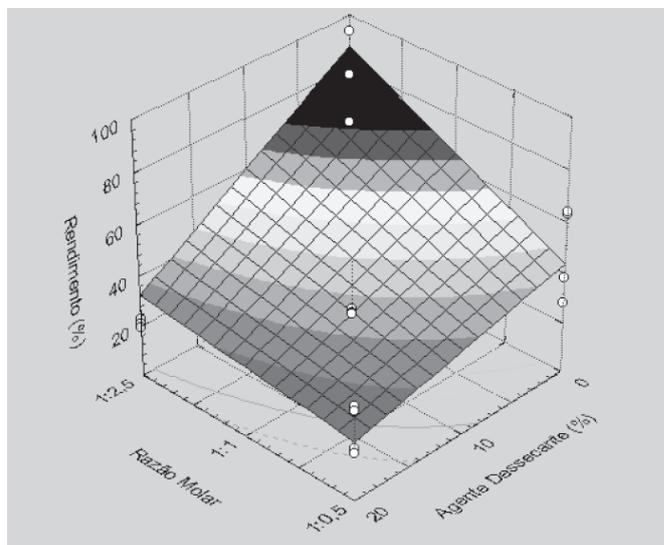


FIGURA 1 - Superfície de resposta para o rendimento da reação de esterificação catalisada por lipase de *Candida rugosa*, descrita pela Equação 2.

CONCLUSÕES

O uso de ferramentas estatísticas como o planejamento fatorial mostrou-se útil para verificar a influência dos fatores testados (razão molar, temperatura, concentração de agente dessecante e enzima) na obtenção do butirato de butila empregando lipase livre. Com base na análise dos dados foi proposta nova condição de trabalho:

TABELA III - Análise de variância para o rendimento da síntese do butirato de butila por meio da lipase

Efeitos	Graus de Liberdade	Soma Quadrática dos Fatores	Soma Média Quadrática	F	P
Modelo	1	1508,93	1508,93	217,92	0,00012
RM (x_1)	1	605,90	605,90	11,54	0,00940
AD (x_2)	1	8268,26	8268,26	157,52	0,00001
Enzima (x_3)	1	184,96	184,96	3,53	0,09733
Temperatura (x_4)	1	281,40	281,40	5,36	0,04928
$x_1 x_2$	1	1787,18	1787,18	34,05	0,00039
$x_1 x_4$	1	1568,16	1568,16	29,87	0,00060
Erro total	8	419,93	52,49		
Total	19	14942,92			

$$R^2=0,92029$$

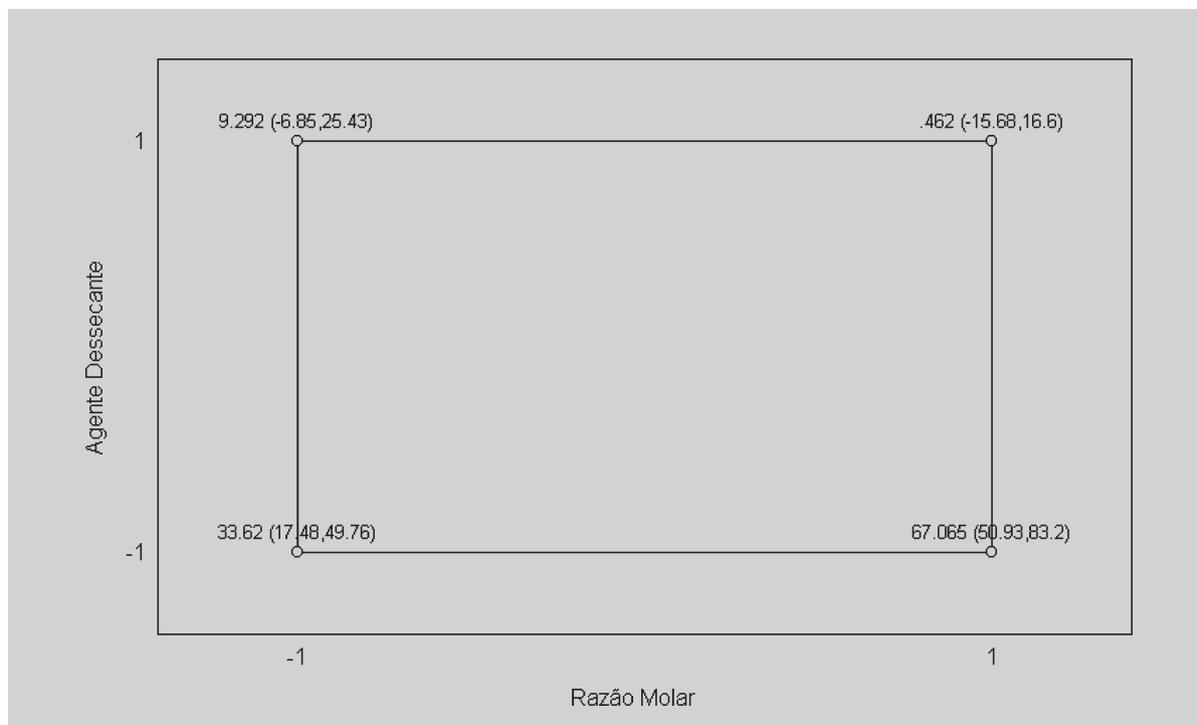


FIGURA 2 - Diagrama para interpretação do planejamento fatorial, valores preditos pela Equação 2.

razão molar ButOH:Abut 1:2,5, ausência de agente dessecante, massa de lipase igual a 80 mg e temperatura de 30 °C. O coeficiente de correlação R^2 indica que 92% dos valores experimentais obtidos são preditos pelo modelo, o que demonstra sua adequação aos dados experimentais.

ABSTRACT

Evaluation of the reaction conditions for the enzymatic synthesis of the butyl butyrate using lipase from *Candida rugosa*

Free lipase from *Candida rugosa* was used for the synthesis of butyl butyrate by direct esterification of butyric acid and butyl alcohol. A full factorial experimental design (2^4) was employed to determine the effect of alcohol to acid ratio (1: 0.5-2.5), water adsorbent concentration (0-20%), enzyme concentration (40-80 mg) and incubation temperature (30-60 °C) on the esterification yield. Water adsorbent concentration has been found to be the most significant factor on the esterification reaction and its influence was negative. The extent of esterification was higher for substrates containing acid in excess even with a low enzyme concentration of 40 mg and 50% conversion was observed. The maximum predicted values for butyl

butyrate yield (92.67%) can be attained with substrate containing acid in excess (molar ratio alcohol to acid 1:2.5), 80 mg enzyme concentration in the absence of water adsorbent at temperature incubation of 30 °C.

UNITERMS: Lipase. *Candida rugosa*. Esterification. Experimental design.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e a CAPES pelo auxílio financeiro e pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

- AYRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. *B. Biotecnol.*, Lisboa, n.72, p. 2-13, 2002.
- BALCÃO V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with lipases: State of the art. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 18, p. 392-416, 1996.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E. R. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. 289p.

- BOSLEY, J. Turning lipases into industrial biocatalysts. *Biochem. Soc. Trans.*, London, v. 25, p. 174-178, 1997.
- BOX, G.; HUNTER, W.; HUNTER, J. *Statistics for experiments: An introduction to design, data analysis and model building*. New York: John Wiley & Sons Inc., 1978. 653p.
- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. Fine chemicals by biotransformation using lipases. *Quím. Nova*, São Paulo, v.18, p. 544-554, 1995.
- CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; ANDERSON, W. A. Production of terpene ester by lipase in non-conventional media. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 7, p. 219-224, 1996.
- CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; OLIVEIRA, P. C. Parâmetros reacionais para a síntese enzimática de butirato de butila em solventes orgânicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 17, p. 237-241, 1997.
- COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 22, p.863, 1999.
- FABER, K. 1997. *Biotransformations in organic chemistry: A textbook*. 3 ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft. p. 1-24, 1997.
- GORMAN, L. A. S.; DORDISCK, J. S. Organic-solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 39, p. 392-397, 1992.
- HARWOOD, J. The versatility of lipases for industrial uses. *Trends Biochem.*, Oxford, v. 14, p. 125 – 126, 1989.
- JAEGER, K-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, Oxford, v. 16, p. 396-403, 1998.
- LORTIE, R. Enzyme catalysed esterification. *Biotechnol. Adv.*, Oxford, v. 15, p. 1-15, 1997.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*, Oxford, v. 19, p. 627-662, 2001.
- VULFSON, E. N. Enzymatic synthesis of food ingredients in low water media. *Trends Food Sci. Technol.*, Oxford, v. 4, p. 209-215, 1993.
- YAHYA, A. R.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG. Esther synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v. 23, p. 438-450, 1998.

Recebido para publicação em 07 de agosto de 2003.