

## EFFECT OF THE SOURCE OF LIPASE ON THE PRODUCTION OF A GALLIC ACID ESTER BY ESTERIFICATION IN SOLVENT MEDIUM

G. J. PASSARI<sup>1</sup>, F. A. PASSARI, A. A. MENDES & E. B. PEREIRA

Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL/MG

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0001-5928-5640><sup>1</sup>

[gustavopassari@hotmail.com](mailto:gustavopassari@hotmail.com)<sup>1</sup>

Submitted February 7, 2022 - Accepted July 29, 2022

DOI: 10.15628/holos.2022.13663

### ABSTRACT

The present work aimed at the enzymatic production of an ester with antioxidant activity (isoamyl gallate) by esterification of gallic acid and isoamyl alcohol in solvent (tert-butanol). Eight commercial lipases from different sources (microbial and animal) were used in the free form (crude extracts) as biocatalysts. The reactions were carried out using 0.25 mol/L of each reagent (gallic acid and isoamyl alcohol), mechanical agitation at 240 rpm, 40°C, 4 h of reaction and 1000 units of enzymatic activity based on the hydrolysis of the olive oil emulsion. olive.

The maximum conversion percentage values were obtained for the lipase preparations of *Pseudomonas fluorescens* – LPF (41.5 ± 5.1%) and porcine pancreas – LPP (38.4 ± 2.3%), the lipase preparation tested at lower cost. The productivity for these reaction systems was in the order of 25 μmoles of gallic acid consumed/h.U. These reveal that the application of a low-cost lipase (LPP) can be promising in the production of esters with antioxidant properties, an important class of compounds used in the food and cosmetics area.

**KEYWORDS:** Lipophilic esters, Gallic acid, Esterification, Lipases.

## EFEITO DA FONTE DE LIPASE NA PRODUÇÃO DE UM ÉSTER DE ÁCIDO GÁLICO POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO DE SOLVENTE

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a produção enzimática de um éster com atividade antioxidante (galato de isoamila) por esterificação de ácido gálico e álcool isoamílico em meio de solvente (terc-butanol). Oito lipases comerciais de diferentes fontes (microbianas e animal) foram empregadas na forma livre (extratos brutos) como biocatalisadores. As reações foram conduzidas empregando 0,25 mol/L de cada reagente (ácido gálico e álcool isoamílico), agitação mecânica de 240 rpm, 40°C, 4 h de reação e 1000 unidades de atividade enzimática baseada na hidrólise da emulsão de

azeite de oliva. Os máximos valores de porcentagem de conversão foram obtidos para as preparações de lipase de *Pseudomonas fluorescens* – LPF (41,5 ± 5,1%) e de pâncreas suíno – LPP (38,4 ± 2,3%), a preparação de lipase testada com menor custo. A produtividade para estes sistemas de reação foi da ordem de 25 μmoles de ácido gálico consumido/h.U. Estes revelam que a aplicação de uma lipase de baixo custo (LPP) pode ser promissora na produção de ésteres com propriedades antioxidantes, uma importante classe de compostos empregados na área de alimentos e cosméticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ésteres lipofílicos, Ácido gálico, Esterificação, Lipases.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a adoção de processos biotecnológicos vem se apresentando como uma das vertentes que possibilitam a aplicação sustentável da biodiversidade para a produção de diversos compostos de interesse industrial (Basso & Serban, 2019; Almeida, Castro, Travalia & Forte, 2021); Bolina, Gomes & Mendes, 2021). Diferentes compostos obtidos de fontes renováveis são explorados por estas rotas como biocombustíveis, polímeros, ácidos orgânicos, antibióticos, enzimas industriais, alimentos funcionais, proteínas entre muitos outros. Estes processos têm sido conduzidos empregando preferencialmente células íntegras de diferentes fontes (microrganismos, células animais e vegetais) ou enzimas. A aplicação de biocatalisadores é atrativa do ponto de vista industrial porque estes apresentam alta atividade catalítica em condições brandas de reação (temperaturas moderadas e pressão atmosférica) e especificidade que reduz a formação de subprodutos que facilita as etapas de separação e purificação (Almeida et al., 2021). Desta forma, surge como alternativa o emprego de lipases como biocatalisador.

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3), são enzimas que têm sido uma das mais empregadas no setor industrial, tais como, no setor alimentício (desenvolvimento de aromas, maturação de queijos, lipídeos estruturados, e emulsificantes), cosmético (emolientes e ésteres com propriedades antioxidantes), farmacológico (síntese de naxopreno, ibuprofeno), agroquímico (inseticidas, e pesticidas), oleoquímico (hidrólise de óleos e gorduras, biosurfactantes e biolubrificantes), formulação de detergentes, e na geração de energia (biodiesel). Esta importante classe de enzimas pode catalisar reações tanto em meios aquosos e não-convencionais – meios orgânicos com baixa concentração de água (Almeida et al., 2021; Bolina et al., 2021).

Dentre os diferentes produtos de interesse industrial produzidos por lipases, ésteres de ácido gálico são compostos que exibem várias atividades biológicas, incluindo proteção cardiovascular, atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anticâncer e anti-inflamatórias (Al Zahrani, El-Shishtawy & Asiri, 2020); Gutierrez, Guo, Feng, Tan & Kong, 2020). Além disso, estes compostos também apresentam atividade anti-hiperglicêmica devido ao seu efeito inibitório sobre enzimas digestivas como amilase (Dragano, Ferno, Dieguez, Lopez & Milbank, 2020); Gutierrez et al., 2020).

Os comprimidos das cadeias carbônicas introduzidas pela esterificação empregando diferentes álcoois como aceptores acila afetam diferentemente suas atividades farmacológicas (Al Zahrani et al., 2020; Gutierrez et al., 2020).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade catalítica de oito preparações comerciais de lipases de *Mucor javanicus* (LMJ), *Rhizopus niveus* (LRN), *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Rhizomucor miehei* (LRM), *Candida* sp. (LCsp), *Candida rugosa* (LCR) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e lipase de origem animal obtida de pâncreas de porco (LPP) na produção de éster de ácido gálico (galato de isoamila). A escolha de álcool isoamílico, um álcool proveniente do óleo fúsel ( $\approx 70\%$  mol/mol) gerado na destilação do etanol, se deve ao seu baixo custo e de fácil obtenção no país (Cerón, Vilas Boas, Biaggio & Castro, 2018). O éster foi obtido por esterificação direta de ácido gálico e álcool isoamílico em meio de terc-butanol, avaliando a conversão da reação e a sua produtividade. A aplicação de terc-butanol como solvente orgânico foi baseada na elevada

solubilidade do ácido gálico (sólido nas condições de ensaio) com o intuito de preparar um sistema reacional com boa dispersão dos materiais de partida empregados neste estudo.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Materiais

Foram utilizadas oito lipases comerciais de origem microbiana e animal:

Lipases microbianas de *Mucor javanicus* (LMJ), *Rhizopus niveus* (LRN), *Thermomyces lanuginosus* (LTL), *Rhizomucor miehei* (LRM), *Candida* sp. (LCsp), *Candida rugosa* (LCR) e *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e animal obtida de pâncreas de porco (LPP) foram adquiridas da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Ambas foram usadas na forma de extratos brutos. As informações técnicas destas lipases e propriedades estão sumarizadas na Tabela 1. Ácido gálico foi também obtido da Sigma-Aldrich Co., o álcool isoamílico e o terc-butanol foram adquiridos da Synth (São Paulo, SP, Brasil). Todos os outros reagentes e solventes foram de grau analítico adquiridos da Synth.

**Tabela 1: Informações técnicas e propriedades das preparações de lipases comerciais testadas neste estudo.**

Lipase (Fonte)	Abreviação	Forma (Código) <sup>a</sup>	AH (U/g) <sup>b</sup>	Custo (R\$) <sup>c</sup>	Custo (R\$/g)
<i>Mucor javanicus</i>	LMJ	Pó (534803)	6200	767,00 (50 g)	15,3
<i>Rhizopus niveus</i>	LRN	Pó (62310)	2800	532,00 (50 g)	10,6
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	LTL	Solúvel (L0777)	27000	1825,00 (250 mL)	7,3
<i>Rhizomucor miehei</i>	LRM	Solúvel (L4277)	880	2024,00 (250 mL)	8,1
<i>Candida</i> sp.	LCsp	Solúvel (L3170)	800	571,00 (50 mL)	11,4
<i>Candida rugosa</i>	LCR	Pó (L1754)	16200	995,00 (25 g)	39,8
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LPF	Pó (534730)	8600	1349,00 (50 g)	27,0
Pâncreas suíno	LPP	Pó (L3126)	5400	473,00 (100 g)	4,7

a: Código das lipases fornecidas pela empresa Sigma-Aldrich Co. (ST LOUIS, MO, EUA).

b: Atividade das lipases na hidrólise da emulsão do azeite de oliva (BASSI *et al.*, 2016).

c: Custo das lipases fornecidas pela empresa Sigma-Aldrich Co. (ST LOUIS, MO, EUA).

### 2.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão sumarizados na Tabela 2.

**Tabela 2: Principais equipamentos utilizados neste trabalho.**

Tipo de experimento	Equipamento	Modelo/Fabricante
Reação de Esterificação	Shaker (Incubadora refrigerada)	SL222/CFR (Solab)
Agitação	Agitador mecânico	MA 095 (Marconi <sup>MR</sup> )
Atividade Hidrolítica	Bureta Digital	Digitrate Pro (Jencons)
Medida de pH	pHmetro	DLA-PH (Del Lab)

### 2.3 Efeito de variáveis na produção enzimática de galato de isoamila por esterificação em meio de terc-butanol.

#### 2.3.1 Efeito da fonte de lipase na produção do éster

A atividade catalítica das oito preparações comerciais de lipases em meio orgânico foi determinada na esterificação direta de ácido gálico e álcool isoamílico, como representado na figura 1, dissolvidos em terc-butanol, mantendo os parâmetros reacionais constantes, como a razão estequiométrica fixada em 1:1 e a quantidade de enzima adicionada no meio.



Figura 1: Reação de esterificação entre ácido gálico e álcool isoamílico.

As reações de esterificação foram conduzidas em frascos de vidro fechados (frascos de Duran) com capacidade para 100 mL, contendo 5 mL de meio reacional (0,25 mol/L de cada reagente – ácido gálico e álcool isoamílico), mantidos sob agitação constante de 240 rpm em um banho termostatizado, numa temperatura de 40°C. A reação foi iniciada pela adição direta de 1000 unidades internacionais de atividade hidrolítica (U), que corresponde a 0,16 g de LMJ, 0,36 g de LRN, 40 µL de LTL, 1,14 mL de LRM, 1,25 mL de LCsp, 0,062 g de LCR, 0,12 g de LPF, e 0,19 g de LPP. Estas quantidades foram determinadas com base nos valores de atividade hidrolítica reportados na Tabela 1. Uma unidade internacional de atividade (U) é definida como a massa de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácidos graxos livres (AGL) por minuto de reação de hidrólise da emulsão de azeite de oliva em pH 8,0 (tampão fosfato de sódio, 0,1 mol/L) a 37°C (Alves, Aracri, Cren & Mendes, 2017). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Alíquotas foram retiradas da mistura reacional (100 µL) após 4 h de reação (2 e 4h), diluídas em 10 mL de solução de álcool (70% m/M) e tituladas com solução de NaOH 40 mmol/L, utilizando fenolftaleína como indicador para determinar a concentração de ácido gálico consumida na reação para a determinação da porcentagem de conversão (Y), conforme Equação (1): (Alves et al., 2017; Lage et al., 2016).

$$Y(\%) = \left( \frac{AG_0 - AG_t}{AG_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que:  $AG_0$  e  $AG_t$  são as concentrações de ácido gálico inicial (0,25 mol/L) e residual após um certo tempo  $t$  de reação (mM).

A produtividade para os diferentes sistemas de reação foi determinada conforme mostrado na Equação (2):

$$\text{Produtividade} \left( \frac{\mu\text{moles}}{\text{h.U}} \right) = \left( \frac{Y \times AG_0}{t_{\text{reação}} \times AE_0} \right) \times 10^6 \quad (2)$$

Em que:  $Y$  é a porcentagem de conversão;  $AG_0$  é a concentração inicial de ácido gálico (0,25 mol/L),  $t_{\text{reação}}$  é o tempo de reação (4 h) e  $AE_0$  é a atividade enzimática empregada nas reações de esterificação (1000 U).

### 2.3.2 Influência da temperatura de reação na produção do éster

A influência da temperatura de temperatura na reação foi avaliada no intervalo entre 35 e 60°C, com incremento de 5°C. As reações foram realizadas empregando razão estequiométrica de ácido e álcool (1:1 – 250 mM de cada reagente em meio de terc-butanol), 1000 U de atividade para as lipases selecionadas (que corresponde a 0,12 g de lipase de LPF e 0,19 g de LPP no meio de reação) e agitação mecânica de 240 rpm. O tempo de reação foi fixado em 4 h. Ao final, alíquotas foram retiradas e determinadas as porcentagens de conversão conforme mostrado na Equação (1).

### 2.3.3 Influência da concentração de lipases na produção do éster

A influência da concentração das lipases na faixa de 250 U a 2000 U foi determinada empregando as lipases de LPP e LPF. Estes ensaios foram conduzidos com razão estequiométrica de ácido gálico e álcool isoamílico (1:1 – 250 mM de cada reagente em meio de terc-butanol) temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF, agitação mecânica de 240 rpm e tempo de reação de 2 h. A porcentagem de conversão do ácido foi determinada de acordo com a Equação (1).

### 2.3.4 Influência da razão molar ácido:álcool na produção do éster

A influência da razão molar ácido:álcool no intervalo de 1:1; 1:1.25; 1:1.5 e 1:2 foi determinada empregando concentração fixa de ácido gálico no meio de reação (250 mM). Estes testes foram realizados a 40°C para LPP e 55°C para LPF, 1000 U de atividade hidrolítica para cada enzima (0,12 g de lipase de LPF e 0,19 g de LPP) agitação mecânica de 240 rpm e tempo de reação de 2 h. A porcentagem de conversão do ácido foi determinada de acordo com a Equação (1).

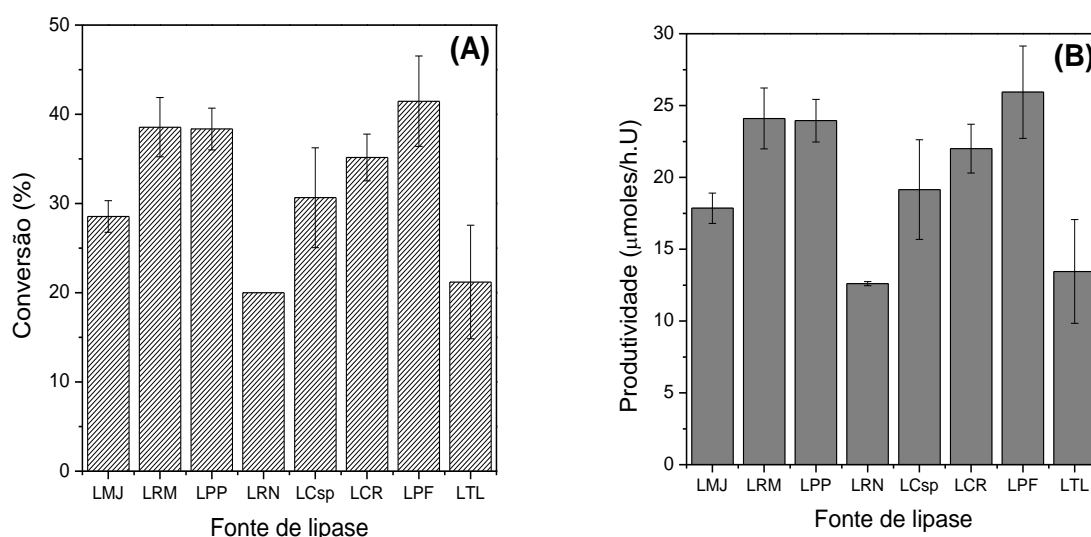
### 2.3.5 Influência do tempo de reação na produção do éster

A influência do tempo de reação foi finalmente determinada nas condições que maximizam a produção do éster catalisada por LPP e LPF: razão estequiométrica de ácido gálico e álcool isoamílico (1:1 – 250 mM de cada reagente em meio de terc-butanol) temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF, 1000 U de atividade hidrolítica para cada enzima (0,12 g de lipase de LPF e 0,19 g de LPP) e agitação mecânica de 240 rpm. A porcentagem de conversão do ácido foi determinada de acordo com a Equação (1):

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1.1 Seleção da fonte de lipase para produção enzimática de galato de isoamila

Neste estudo, oito diferentes preparações de lipases comerciais foram empregadas na forma de extratos brutos para catalisar a produção de um éster com propriedades antioxidantes (galato de isoamila) para posterior aplicação em emulsões cosméticas. Estes testes foram conduzidos com o propósito de selecionar as lipases com maior atividade catalítica na qual foi expressa em termos de porcentagem de conversão (Figura 2A) e produtividade (Figura 2B).



**Figura 2:** Efeito da fonte de lipase na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol. As reações foram conduzidas a 40°C, razão estequiométrica de ácido e álcool (250 mM de cada reagente), agitação mecânica de 240 rpm, 1000 unidades de atividade hidrolítica de cada lipase (0,16 g de LMJ, 0,36 g de LRN, 40 μL de LTL, 1,14 mL de LRM, 1,25 mL de LCsp, 0,062 g de LCR, 0,12 g de LPF, e 0,19 g de LPP) e 4 h de reação.

De acordo com a Figura 2A, as preparações LRN e LTL foram as menos ativas nesta reação e máxima conversão do ácido gálico da ordem de 20% foi alcançada. A lipase LCR com maior custo avaliada neste estudo, apresentou uma conversão da ordem de 35% após 4 h de reação. Seu desempenho catalítico foi ligeiramente inferior à LPP e LRM que obtiveram similares valores de conversão da ordem 38%. Dentre elas, máxima conversão de  $41,5 \pm 5,1\%$  foi obtido para LPF, a segunda lipase com maior custo empregada neste estudo (R\$ 27,0/g de extrato em pó).

O desempenho catalítico destas lipases foi também avaliada pela produtividade que expressa o número de unidades de atividade necessário para catalisar a conversão de 1 μmol de ácido gálico por hora de reação. De acordo com a Figura 2B, as lipases LPF e LPP apresentaram valores similares de produtividade da ordem de 25 μmoles/h.U.

As preparações de lipases testadas neste estudo são disponíveis comercialmente como formulações líquidas (soluções) ou em pó (Tabela 1). As fontes de obtenção destas lipases são bastante diversas (fontes fúngicas, bacterianas e animal) e suas atividades catalíticas são bastante

distintas devido às suas diferentes estruturas terciárias e especificidades que influenciam em suas propriedades catalíticas em uma determinada reação (Basso & Serban, 2019; Almeida et al., 2021). Além disso, estas formulações contêm em suas composições diferentes compostos como carboidratos, proteínas e álcoois que atuam como preservantes de suas estruturas nativas que também interferem fortemente em suas propriedades catalíticas (Bassi et al., 2016).

Embora a mesma atividade catalítica, em termos de atividade hidrolítica, tenha sido oferecida nos diferentes sistemas reacionais (1000 U), é possível notar a forte influência do tipo de lipase testada na produção de galato de isoamila. Estes diferentes resultados obtidos confirmam a influência do tipo de lipase em reações de síntese devido às suas diferentes propriedades catalíticas, origem e composição como a presença de agentes preservantes (sais, carboidratos e polióis) em suas formulações que influenciam suas atividades catalíticas (Persson, Mladenoska, wehtje & Adlercreutz, 2002).

Estes resultados mostram claramente que a aplicação da lipase LPP é mais vantajosa por se tratar da lipase com menor custo testada no presente trabalho e satisfatória atividade catalítica. De fato, a lipase LPP tem sido amplamente empregada na produção industrial de enantiômeros para as indústrias de química fina e farmacêutica (Mendes, Oliveira & Castro, 2012). Neste sentido, estes resultados podem contribuir para a ampliação de sua aplicação em outros processos industriais visto que a produção de ésteres de ácido gálico ainda é preferencialmente realizada pela rota química empregando catalisadores homogêneos como ácidos inorgânicos ( $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e temperaturas de reação entre  $50^\circ\text{C}$  e  $100^\circ\text{C}$  (Nguyen et al., 2021). Este estudo mostra que é possível a adoção de um processo menos agressivo e ambientalmente correto usando uma lipase de baixo custo na produção de ésteres lipofílicos como galato de isoamila, pois foram requeridas condições brandas de temperatura ( $40^\circ\text{C}$ ).

De acordo com os resultados obtidos, a lipase LPP foi a selecionada como a lipase mais interessante na produção do éster devido à satisfatória atividade catalítica e menor custo quando comparados com a lipase *Pseudomonas fluorescens* – LPPF, que também obteve valores significativos e satisfatórios com máximos de porcentagem de conversão ( $41,5 \pm 5,1\%$ ), porém com um custo quase 6 vezes maior – R\$ 27,0/g e R\$ 4,7/g de preparação enzimática.

### 3.1.2 Influência da temperatura

A temperatura é outro fator que pode influenciar a esterificação enzimática, negativa ou positivamente. De um lado, as altas temperaturas podem prejudicar a estabilidade ou inativar as enzimas, por isso deve-se levar em consideração a temperatura ótima do biocatalisador. Por outro lado, o aumento da temperatura pode reduzir a viscosidade da mistura, aumentar a solubilidade de reagentes e melhorar o processo de difusão dos substratos, favorecendo, assim, a transferência de massa e a interação entre a enzima e moléculas dos materiais de partida (Lerin et al., 2012; Lage et al., 2016; Lima, Peres & Mendes, 2018).

Portanto, a dependência da temperatura na reação de esterificação foi determinada na faixa entre  $35^\circ\text{C}$  e  $60^\circ\text{C}$ , e os resultados são apresentados na Figura 3. As demais condições foram fixadas em razão estequiométrica de ácido e álcool (1:1 – 250 mM de cada reagente em meio de terc-butanol), e 1000 U de atividade para as lipases selecionadas (que corresponde a 0,12 g de lipase

de LPF e 0,19 g de LPP no meio de reação) e agitação mecânica de 240 rpm. O tempo de reação foi fixado em 4h nas condições descritas acima.

De acordo com o ensaio preliminar (Figuras 2A e 2B), as lipases selecionadas com melhor desempenho catalítico foram *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e lipase de pâncreas de porco (LPP), onde ambas apresentaram valores similares de produtividade da ordem de 25  $\mu$ moles/h.U.

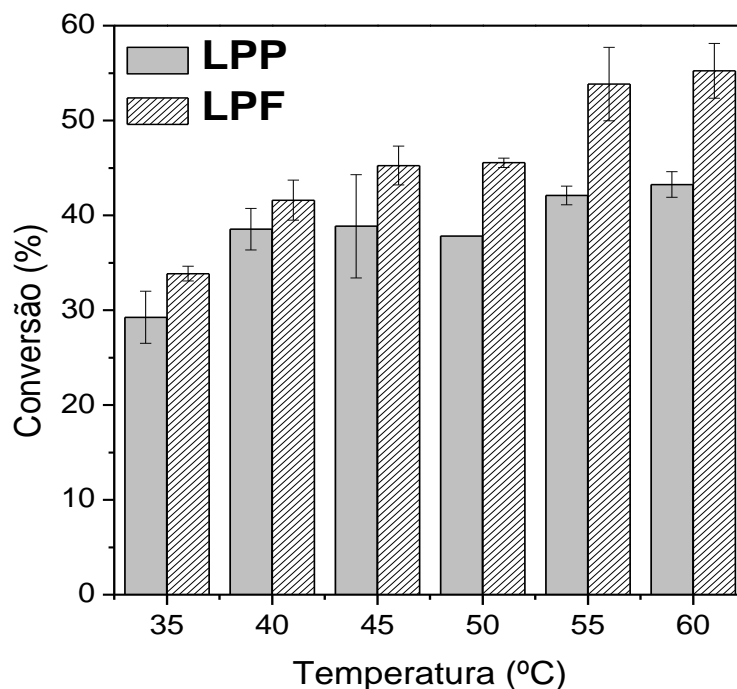


Figura 3: Efeito da temperatura de reação na produção de galato de isoamila catalisada por LPP (A) e LPF (B) em meio de terc-butanol. As reações foram conduzidas empregando razão estequiométrica de ácido e álcool (250 mM de cada reagente), agitação mecânica de 240 rpm, 1000 unidades de atividade hidrolítica de cada lipase (0,12 g de LPF e 0,19 g de LPP) e 4 h de reação.

Na Figura 3, observa-se que num período de 4h de reação, o aumento de temperatura de 35°C a 40°C aumentou a conversão do ácido de 28% para quase 40% empregando LPP como biocatalisador. Após, foi observada similar conversão. Por outro lado, o aumento de temperatura de 35°C para 55°C elevou a porcentagem de conversão do ácido, como esperado, para a reação catalisada por LPF. Na faixa de temperatura entre 55 e 60°C, a conversão do ácido foi da ordem de 50% para LPF. Neste contexto, testes subsequentes com estas duas preparações de lipases foram conduzidos a 40°C para LPP e 55°C para LPF.

### 3.1.3 Influência da concentração de lipase

Em seguida, foram realizados ensaios da influência da concentração das lipases na faixa de 250 U a 2000 U com o propósito de estabelecer a quantidade mínima necessária de biocatalisador necessária para obter máxima produção do éster. Estes ensaios foram conduzidos empregando razão estequiométrica de ácido gálico e álcool isoamílico (razão molar 1:1 – 250 mM de cada



reagente em meio de terc-butanol) temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF, agitação mecânica de 240 rpm e tempo de reação de 2 h.

De acordo com os dados obtidos sumarizados na Figura 4, o aumento da concentração de enzima de 250 U para 1000 U elevou a porcentagem de conversão para ambos os sistemas de reação. Como esperado, o aumento da concentração de lipase aumenta o número de sítios ativos disponíveis no meio de reação para a formação do produto (galato de isoamila). Nestas condições, máxima porcentagem de conversão do ácido da ordem de 43% e 50% foi obtida para LPP e LPF, respectivamente. Entretanto, concentrações de lipase acima de 1000 U diminuíram a atividade catalítica, visto que o catalisador pode ter sido dissolvido no meio em que ocorreu a reação ou por intermédio de uma interface como a adsorção dos seus reagentes, promovendo a redução da ação dos catalisadores que pode ser observado nos dois sistemas de reação (LPP e LPF). Este decréscimo de atividade catalítica foi mais expressivo para a LPP. Estes resultados podem ser devido à forte agregação das lipases por adsorção de água produzida na reação que pode reduzir drasticamente a transferência de massa para os sítios ativos da enzima e/ou inativação da estrutura dimensional das lipases pelo acúmulo dos materiais de partida em seu microambiente – inativação dos biocatalisadores por adsorção de moléculas de reagentes que promovem a formação de gradientes de pH entre seus microambientes e o sistema reacional (Lage et al., 2016; Lima et al., 2018). Dessa forma, ensaios subsequentes para a avaliação do efeito da razão molar ácido:álcool foram realizados empregando 1000 U de atividade hidrolítica para ambas as lipases (LPP e LPF).

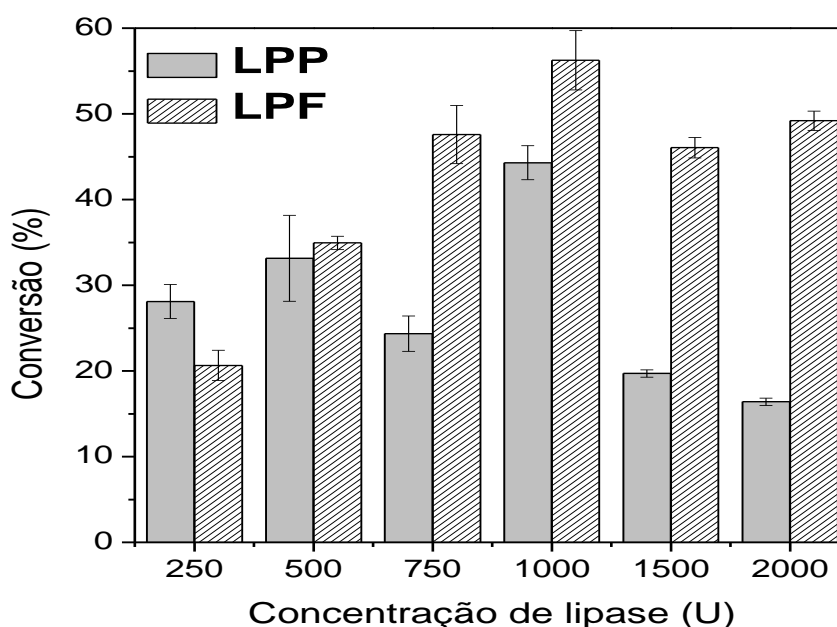


Figura 4: Efeito da concentração de lipase na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol. As reações foram conduzidas empregando razão estequiométrica de ácido e álcool (250 mM de cada reagente), agitação mecânica de 240 rpm, temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF e 2 h de reação.

### 3.1.4 Estudo da influência da razão molar

Foi também avaliada a influência da razão molar ácido:álcool na produção do éster mantendo-se fixa a concentração de ácido gálico no meio de reação (250 mM). As diferentes razões molares ácido:álcool avaliadas foram 1:1; 1:1.25; 1:1.5 e 1:2 (ácido:álcool). Este parâmetro foi estudado porque o excesso de um dos materiais de partida no meio de reação pode deslocar o equilíbrio químico para a direção da formação do produto (Lage et al., 2016; Carvalho, Luiz, Fernandez-Lafuente, Hirata & Mendes, 2021). Com o intuito de obter sistemas de reação com completa solubilização do ácido gálico nas condições de ensaio (temperatura entre 40°C e 55°C em meio de terc-butanol), optou-se trabalhar com excesso de álcool isoamílico (líquido nas temperaturas de processo). Estas reações foram conduzidas com agitação mecânica de 240 rpm, temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF e 2 h de reação e 1000 U de atividade para cada enzima (0,12 g de LPF e 0,19 g de LPP). Os resultados obtidos estão sumarizados na Figura 5.

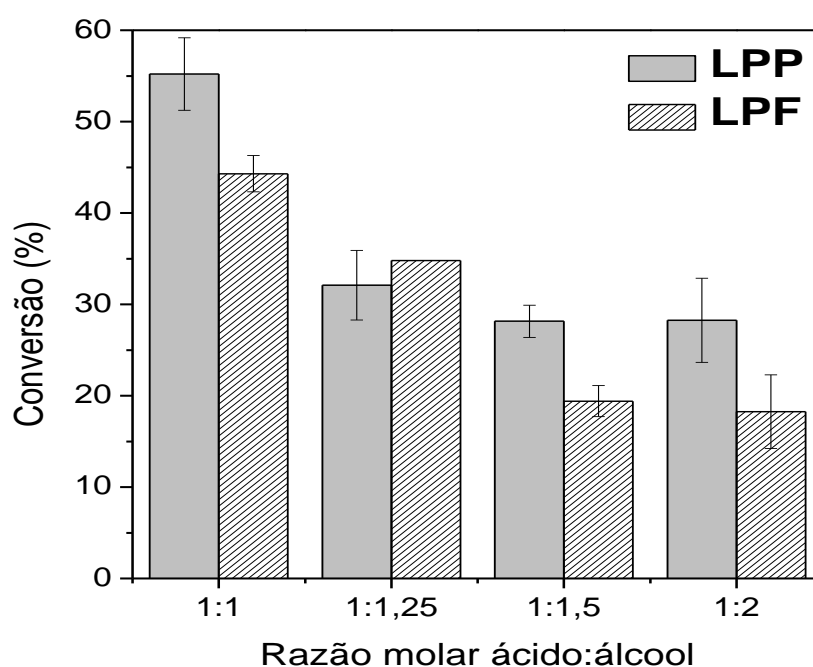


Figura 5: Efeito da razão molar ácido:álcool na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol. As reações foram conduzidas empregando concentração fixa de ácido (250 mM), agitação mecânica de 240 rpm, temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF e 2 h de reação.

De acordo com os resultados obtidos, máxima conversão do ácido da ordem de 43% e 55% após 2h de reação catalisada por LPP e LPF foram obtidos, respectivamente. Por outro lado, as reações conduzidas com excesso de álcool resultaram em decréscimo na conversão. O aumento na quantidade de álcool pode causar um efeito contrário, diminuindo a conversão devido à sua interação com a camada de hidratação presente na superfície das enzimas, provocando alterações na estrutura proteica da enzima e resultando em inibição e redução da atividade enzimática (Sá et al., 2017). O decréscimo de produção de ésteres com o aumento de uma dos materiais de partida no meio de reação tem sido observado em outros estudos realizados em nosso grupo de pesquisa (Bassi et al., 2016; Lage et al., 2016; Lima et al., 2018; Carvalho et al., 2021). Dessa forma, testes posteriores para a avaliação do efeito do tempo de reação na produção do éster foram conduzidos em razões equimolares dos materiais de partida (1:1 – 250 mM de cada reagente).

### 3.1.5 Estudo da influência do tempo na síntese enzimática de galato de isoamila

Por fim, foi avaliado o efeito do tempo de reação na produção de galato de isoamila nas condições que maximizam a reação determinadas acima: agitação mecânica 240 rpm, 1000 U unidades de atividade enzimática, temperaturas de 55°C para (LPF) e 40° C para (LPP), razão molar 1:1 (250 mM de cada reagente em meio de terc-butanol).

Na Figura 6, pode observar que as lipases de *Pseudomonas fluorescens* (LPF) apresentou um melhor empenho catalítico num período de tempo de 105 min (conversão da ordem de 55 %) e a de pâncreas de porco (LPP) em 90 min (conversão da ordem de 42%). Com base nestes resultados, pode-se observar que estas lipases são promissoras para a produção de um éster de interesse industrial.

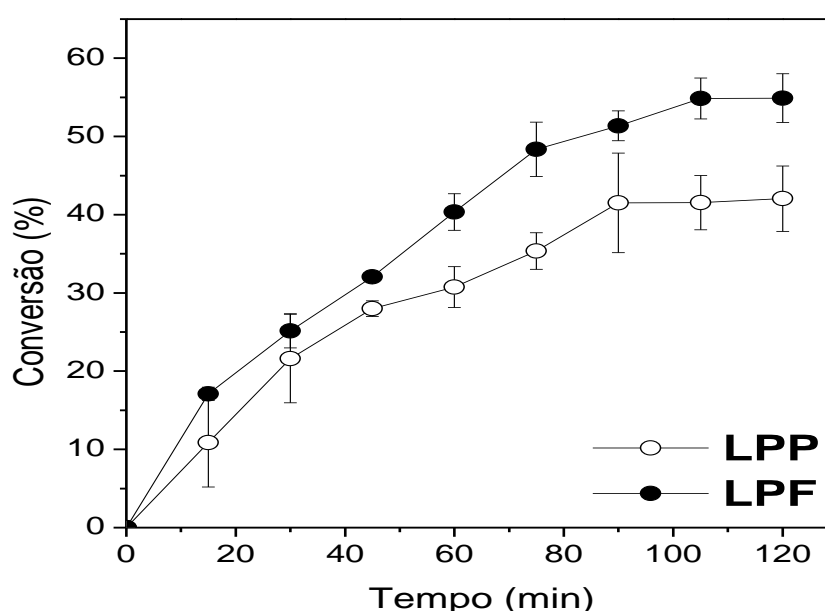


Figura 6: Efeito do tempo de reação na produção de galato de isoamila em meio de terc-butanol catalisada por LPF e LPP. As reações foram conduzidas empregando razão estequiométrica de ácido e álcool (250 mM de cada reagente), agitação mecânica de 240 rpm, e temperatura de 40°C para LPP e 55°C para LPF.

## 4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, LPP foi selecionada como a lipase mais interessante na produção do éster devido à sua satisfatória atividade catalítica e menor custo quando comparados com LPF que possui um custo quase 6 vezes maior – R\$ 27,0/g e R\$ 4,7/g de preparação enzimática. A melhor temperatura selecionada foi de 55°C para *Pseudomonas fluorescens* (LPF) e 40° C para a lipase de pâncreas de porco (LPP).

Ficou evidenciado que a razão molar ácido:álcool 1:1 foi a melhor razão molar já que apresentou uma conversão de 50,7% de conversão, quando comparada com as demais razões molares testadas.

A melhor influência de tempo para a lipase *Pseudomonas fluorescens* (LPF) foi de 90 min e para a lipase de pâncreas de porco (LPP) 105 min.

## 5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001. Os autores também agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo APQ-02196-15) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processos 404929/2016-8 e 310633/2020-6) pelo suporte financeiro. Gustavo J. Passari agradece à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Alfenas pela concessão da bolsa de mestrado (PIB-Pós/UNIFAL-MG).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F.L.C; CASTRO, M. P.J; TRAVAILIA, B. M ; FORTE, M. B. S. Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis. **Process Biochem.**, v. 110, p. 37-51, 2021.
- ALVES, M. D; ARACRI, F. M; CREN, E. C; MENDES, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chem. Eng. J.**, v. 311, p. 1-12, 2017.
- AL ZHRANI, N. A; EL-SHISHTAWY, R. M; ASIRI, A. M. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 204, p. 112-609, 2020.
- BASSI, J. J; TODERO, L. M; LAGE, F. A. P; KHEDY, G. I; DUCAS, J. D; PINTO, M. A; MENDES, A. A. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 92, p. 900-909, 2016.
- BASSO, A; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes – A review. **Molec. Catal.**, v. 479, p. 110-607, 2019.
- BOLINA I. C. A; GOMES, R. A. B; MENDES, A. A. Biolubricant production from several oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: Current scenario and future perspectives. **BioEnergy Res.**, p. 1-19, 2021.
- CARVALHO, W. C. A; LUIZ, J. H. H; FERNANDEZ-LAFUENTE, R; HIRATA, D. B; MENDES, A. A. Eco-friendly production of trimethylolpropane triesters from refined and used soybean cooking oils using an immobilized low-cost lipase (Eversa Transform 2.0) as heterogeneous catalyst. **Biomass and Bioenergy**, v. 155, p. 106302, 2021.
- CERÓN, A. A; VILAS BOAS, R. N; BIAGGIO, F. C; CASTRO, H. F. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass Bioenergy**, v. 119, p. 166-172, 2018.

- DRAGANO, R. V; FERNO, J; DIEGUEZ, C; LOPEZ, M; MILBANK, E. Recent updates on obesity treatments: Available drugs and future directions. **Neuroscience**, v. 437, p. 215-239, 2020.
- GUITIERREZ, A. S. A; GUO, J; FENG, J; TAN, L; KONG, L. Inhibition of starch digestion by gallic acid and alkyl gallates. **Food Hydrocolloids**, v. 102, p. 105-603, 2020.
- LAGE, F. A. P; BASSI, J. J; CORRADINI, M. C; TODERO, L. M; LUIZ, J. H; MENDES, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56-67, 2016.
- LERIN, L. A; RICETTI, A; DALLAGO, R; TREICHEL, H; MAZUTTI, M; OLIVEIRA, J.V; ANTUNES, O. A. C; OESTREICHER, E. G; DE OLIVEIRA, D. Enzymatic Synthesis of Ascorbyl Palmitate in Organic Solvents: Process Optimization and Kinetic Evaluation. **Food and Bioprocess Technolog**, v.5, p. 1068 -1076, 2012.
- LIMA, L. C. D; PERES, D. G. C; MENDES, A. A. Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk particles. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 41, n. 7, p. 991-1002, 2018.
- MENDES, A. A; OLIVEIRA, P. C; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 78, p. 119-134, 2012.
- NGUYEN, V. H; LE, M. N; NGUYEN, H. B; HA, K.O; PHAM, T. H. V; NGUYEN, T. H; DAO, N. S. H; NGUYEN, V. G; NGUYEN, D. L; TRINH, N.T. Propyl gallate. **Molbank**, v. 2021, p.1201, 2021.
- PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002.
- SÁ, A.G.A. et al. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 95-105, 2017.

#### COMO CITAR ESTE ARTIGO:

Passari, G. J., Passari, F. A., Mendes, A. A., & Pereira, E. B. (2022). EFEITO DA FONTE DE LIPASE NA PRODUÇÃO DE UM ÉSTER DE ÁCIDO GÁLICO POR ESTERIFICAÇÃO EM MEIO DE SOLVENTE. *HOLOS*, 5(38). Recuperado em <https://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/13663>

#### SOBRE OS AUTORES

##### G. J. PASSARI

Possui graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas (2015), graduação universitária em Direito Administrativo (2019) pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais

(IFSULDEMINAS), Mestre em Biotecnologia (2022) pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) e doutorando em Infectologia pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). E-mail: [gustavopassari@hotmail.com](mailto:gustavopassari@hotmail.com). ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0001-5928-5640>

#### F. A. PASSARI

Possui mestrado (2022) pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) cursou com processos bioquímicos com ênfase em imobilização de enzimas (catálise heterogênea), preparação e caracterização de suportes orgânicos e inorgânicos, bioprocessos e cinética enzimática. Possui tecnológica em gestão ambiental e graduanda em engenharia química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas. E-mail: [fernandapassari@hotmail.com](mailto:fernandapassari@hotmail.com). ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0001-6764-3778>

#### A. A. MENDES

Possui graduação (2002) e mestrado (2004) em Engenharia Química pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena (Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo) e doutorado em Engenharia Química pela Universidade Federal de São Carlos (2009). E-mail: [adriano.mendes@unifal-mg.edu.br](mailto:adriano.mendes@unifal-mg.edu.br). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7698-8439>

#### E. B. PEREIRA

Universidade Federal de Alfenas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Departamento de Alimentos e Medicamentos. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) vinculado ao Instituto de Química da UNIFAL-MG. E-mail: [ernandes.pereira@unifal-mg.edu.br](mailto:ernandes.pereira@unifal-mg.edu.br). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5329-0756>

**Editor(a) Responsável:** Francinaide de Lima Silva Nascimento e Leandro Silva Costa

**Pareceristas Ad Hoc:** Alberto Correia Gomes Filho e Saulo Gregory Carneiro Fonseca



Recibido 07 de fevereiro de 2022

Aceito: 29 de julho de 2022

Publicado: 28 de dezembro de 2022