BIOSSÍNTESE DE ACETATO DE ISOAMILA, VALERATO DE ETILA E ACETATO DE BUTILA USANDO LIPASES MICROBIANAS IMOBILIZADAS EM DIFERENTES SUPORTES

MICHELE PUTTI PALUDO[1], KELLY SILVA DEGANI DE OLIVEIRA[2], THALLES CANTON TREVISOL[3], BENEVIDES COSTA PESSELA JOAO[4], JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT[5]

RESUMO

A síntese enzimática dos ésteres de aroma frutal de cadeia curta, acetato de isoamila (banana), valerato de etila (maçã verde) e acetato de butila (abacaxi) utilizando as lipases microbianas *Candida antactica* tipo B (CALB), Lecitase Ultra e Palatase 20000 L (Pal) imobilizadas a partir de diferentes estratégias foram investigadas. A produção dos ésteres também foi avaliada utilizando a lipase comercialmente imobilizada Novozym 435. As enzimas foram imobilizadas em suportes hidrofóbicos (Octil-Sefarose - Oct e Fenil-Sefarose - Fen), resinas de troca iônica (Carboximetil-Sefarose - CM e Dietilaminoetil-Sefarose - DEAE), ligação covalente multipontual (Glioxil-agarose - Gli) e unipontual (Bromocianógeno - CNBr). As reações ocorreram em meio orgânico (hexano) com álcool e ácido (25 mM) a 40°C para acetato de isoamila, 45°C para acetato de butila e 50°C para valerato de etila, sendo os ésteres quantificados por Cromatrografia Líquida de Alta Eficiência. Os derivados CALB-CM e Pal-DEAE foram mais promissores para produção do acetato de isoamila e valerato de etila, respectivamente. Acetato de butila apresentou os melhores resultados de rendimento de conversão usando a lipase Novozym 435 e os derivados CALB-Oct, CALB-Gli e CALB-CM. Em função da elevada estabilidade as enzimas imobilizadas foram mais eficientes na síntese de ésteres de aroma frutal, em comparação com as enzimas livres.

PALAVRAS CHAVE: AROMAS. HEXANO. SÍNTESE ENZIMÁTICA.

BIOSYNTHESIS OF ISOAMYL ACETATE, ETHYL VALERATE AND BUTYL ACETATE USING MICROBIAL LIPASES IMMOBILIZED IN DIFFERENT SUPPORTS

ABSTRACT

The enzymatic synthesis of short-chain fruity aroma esters, isoamyl acetate (banana), ethyl valerate (green apple) and butyl acetate (pineapple) using the microbial lipases *Candida antactica* type B (CALB), Lecitase Ultra and Palatase 20000L (Pal) immobilized by different strategies were investigated. The ester production was evaluated using commercially immobilized lipase Novozym 435. The enzymes were immobilized on hydrophobic supports (Octyl-Sepharose-Oct, Phenyl-Sepharose-Fen), ion exchange resins (Carboxymethyl Sepharose-CM, Diethylaminoethyl-Sepharose-DEAE), multipoint covalent attachment (Glyoxyl-agarose-Gly) and unipontual covalent attachment (Bromocyanogen - CNBr). The reactions occurred in organic medium (hexane) with alcohol and acid (25 mM) at 40ºC for isoamyl acetate, 45ºC for butyl acetate and 50ºC for ethyl

[1]Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: michepaludo@gmail.com
[2]Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/Curso Engª Alimentos – e-mail: kellydegani@hotmail.com
[3]Discente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/Curso Engª Bioquímica– e-mail: thallesct@gmail.com
[4]Titular no Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), Madrid, Espanha – e-mail: b.pessela@csic.es
[5]Docente – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)/EQA/PPG-ECA – e-mail: jfmb@vetorial.net

valerate, the esters were quantified by High Efficiency Liquid Chromatography. The CALB-CM and Pal-DEAE derivatives were more promising for the production of isoamyl acetate and ethyl valerate, respectively. Butyl acetate showed more promising conversion results using the Novozym 435 lipase and the derivatives CALB-Oct, CALB-Gly and CALB-CM. Due to the high stability, the immobilized enzymes were more efficient in the synthesis of fruity aroma esters compared to the free enzymes.

KEYWORDS: AROMAS. ENZYMATIC SYNTHESIS. HEXANE.

1. INTRODUÇÃO

Os ésteres de cadeia curta fazem parte de um importante grupo de compostos de aroma [3], que podem ser obtidos por síntese química, extração de fontes naturais ou, ainda, por reações de esterificação catalisadas por enzimas [27,39]. Em 2016, houve um aumento da demanda de *flavours* e fragrâncias de 4,4%, alcançando a marca de US$ 26,5 bilhões, e até 2020, espera-se um crescimento de mercado de 5,4% [47].

As reações catalisadas por enzimas são uma alternativa à via química na produção de ésteres, uma vez que ocorrem em condições mais brandas, apresentam elevada regiosseletividade e enantiosseletividade, não geram resíduos tóxicos e os produtos obtidos podem ser intitulados como “aroma natural” [8]. Para os consumidores, o produto rotulado como “natural” é mais aceito do que o “aroma idêntico ao natural”, uma vez que o último remete a ideia de obtenção por processos químicos [39].

As lipases são frequentemente usadas nas reações de esterificação [7,15,24,37], obtendo ésteres de cadeia curta de interesse industrial, voláteis e aplicáveis em alimentos, bebidas, cosméticos e indústria farmacêutica [9,44]. As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas versáteis capazes de catalisar a hidrólise de triglicerídeos a glicerol e ácidos graxos livres [40]. Em meio orgânico, essas enzimas podem catalisar reações reversas de síntese e transesterificação [36]. Deste modo, devido à vasta aplicação industrial das lipases, estas têm sido imobilizadas usando diferentes protocolos, como ligação covalente em suportes ativados, adsorção física e iônica, suportes hidrofóbicos e encapsulação em materiais orgânicos e inorgânicos, a fim de aumentar a atividade catalítica e a estabilidade dos biocatalisadores [1,26].

Os ésteres produzidos por síntese enzimática são predominantemente obtidos em meios orgânicos com baixo conteúdo de água, mantendo a conformação ativa da

enzima e sua termoestabilidade. O uso de solventes orgânicos aumenta a solubilidade dos substratos hidrofóbicos e desloca o equilíbrio termodinâmico a favor das reações de síntese, aumentando o rendimento de conversão dos ésteres [31]. Dentre os diversos solventes orgânicos utilizados para as sínteses enzimáticas, o hexano é comumente aplicado devido ao menor custo e poder ser usado na elaboração de aromatizantes em quantidades prescritas pela RDC n° 2 de 15 de janeiro de 2007 [5,42].

Neste contexto, o emprego de lipases como biocatalisadores nas reações de esterificação permite a obtenção de produtos de melhor qualidade, em temperaturas relativamente baixas e rotuladas como naturais pela indústria. O objetivo do estudo foi investigar a síntese enzimática dos ésteres de aroma frutal de cadeia curta acetato de isoamila (banana), valerato de etila (maçã verde) e acetato de butila (abacaxi) utilizando as lipases microbianas *Candida antactica* tipo B (CALB), Lecitase Ultra e Palatase 20000 L imobilizadas a partir de diferentes estratégias. A produção dos ésteres também foi avaliada utilizando a lipase comercialmente imobilizada Novozym 435.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Enzimas e Reagentes

As lipases microbianas comerciais solúveis utilizadas neste trabalho foram CALB (*Candida antarctica* tipo B), Palatase 20000 L (*Rhizomucor miehei*) e Lecitase Ultra (obtida da fusão dos genes da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e da fosofolipase de *Fusarium oxysporum*), além da lipase imobilizada comercialmente em Lewatit, Novozym 435. Todas as enzimas foram obtidas na Novozymes (Espanha).

Os suportes Octil-Sefarose (Oct), Fenil-Sefarose (Fen), Carboximetil-Sefarose (CM), Dietilaminoetil-Sefarose (DEAE) e Bromocianógeno (CNBr) foram adquiridos na GE Healthcare Life Sciences (Suécia). A agarose 10 BCL usada na elaboração do suporte glioxil-agarose foi obtida na ABT Agarose Bead Technologies (Espanha). O substrato *p*-nitrofenol butirato (*p*NPB) na Sigma-Aldrich (EUA).

Os padrões cromatográficos acetato de butila (AB) e acetato de isoamila (AI) foram obtidos na Sigma-Aldrich (EUA) e valerato de etila (VE) na Alfa Aeser (Alemanha). Todos os outros reagentes usados apresentavam grau analítico.

2.2. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteína foi quantificada pelo método de Bradford [4] empregando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

2.3. Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica das lipases foi mensurada monitorando-se o aumento da absorbância de 348 nm produzida pela liberação de *p*-nitrofenol na hidrólise de 0,4 mM de *p*NPB (*p*-nitrofenil butirato) em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0 e 25°C. Para iniciar a reação foram adicionadas 20 µL da solução enzimática ou da suspensão, 20 µL do substrato e 2,5 mL de tampão. Uma unidade da atividade de *p*NPB foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de *p*NPB/min (U) sob as condições descritas [32].

2.4. Estratégias de imobilização

A imobilização das lipases solúveis CALB, Lecitase e Palatase nos suportes hidrofóbicos Oct e Fen foi realizada adicionando-se 1 g do suporte previamente lavado e seco a 10 mL da solução enzimática em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 e mantidos sob agitação constante a 25°C. A concentração de proteína disponibilizada para a imobilização foi de 5 mg/g de suporte. O mesmo procedimento foi realizado para imobilizar as lipases nas resinas de troca iônica CM (resina catiônica) e DEAE (resina aniônica). Após a imobilização, as suspensões foram filtradas a vácuo, usando funil de vidro sinterizado, e os derivados obtidos armazenados sob refrigeração.

Na imobilização covalente multipontual, os géis de glioxil foram preparados ativando-se a matriz de agarose com grupos glicidol e, subsequente, oxidação com periodato de sódio [17]. As soluções enzimáticas (10 mL) foram preparadas em tampão bicarbonato de sódio 100 mM e pH 10,0 e acrescidas de 1 g do suporte glioxil-agarose. A mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente.

A imobilização covalente unipontual das lipases foi realizada no suporte CNBr ativado a 4°C por 5 min e pH 7,0 [35,46]. A imobilização em CNBr foi realizada a fim de reduzir as ligações covalentes multipontuais entre a enzima e o suporte, obtendo-se estabilidade semelhante à enzima livre [25].

Os parâmetros de imobilização avaliados foram rendimento de imobilização (RI, %) (Equação 1) e atividade recuperada (AR, %) (Equação 2) [45].

$$RI = \left(\frac{A-B}{A}\right) 100 \quad (1)$$

$$AR = (\frac{C}{A\ RI})\ \ 100 \quad (2)$$

onde, A é a atividade da solução disponibilizada para imobilização; B é a atividade final da imobilização; e C é a atividade do derivado.

2.5. Síntese enzimática dos ésteres de aroma frutal

2.5.1. Reações de esterificação

As reações de esterificação foram realizadas em frascos com tampa de rosca, em meio contendo hexano (10 mL), álcool (álcool isoamílico, etanol e butanol) e ácido (ácido acético e ácido valérico) na concentração de 25 mM e razão molar 1:1. As reações ocorreram em *shaker*, com a agitação de 200 rpm e temperatura de 40°C para acetato de isoamila (AI), 45°C para acetato de butila (AB) e 50°C para valerato de etila (VE) [27].

Os derivados utilizados nas reações possuíam as mesmas atividades hidrolíticas, tendo como referencial 0,1 g, o peso máximo empregado nas sínteses. As atividades corresponderam a: 8.216,78 U/g para os derivados de CALB, 3.176, 23 U/g para os derivados de Palatase, 3.537,92 U/g para os derivados de Lecitase e 470 U/g para Novozym 435.

2.5.2. Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Os ésteres de aroma frutal obtidos nas biossínteses foram quantificados usando HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado com detector UV SpectraSystem UV 1000, Santa Clara, CA, EUA) com coluna de fase reversível (Ultrabase C18, 150x4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta por 40% de acetonitrila, 5% de metanol, 25% de água e 0,2% de ácido fórmico (v/v), taxa de fluxo de 1 mL/min, temperatura controlada à 40°C por 10 min. Os ésteres foram detectados a 210 nm e identificados por comparação dos tempos de retenção dos padrões analíticos puros, sendo as concentrações calculadas com base nas áreas dos picos [6]. Os tempos de retenção para o AI, VE e AB foram de 4,11 min, 3,90 min e 3,44 min, respectivamente.

2.5.3. Rendimento de conversão dos ésteres

O rendimento de conversão dos ésteres foi expresso em porcentagem (%) e calculada conforme a Equação 3:

$$C = \left(\frac{Co-C}{Co}\right)\ \ 100 \quad (3)$$

onde, Co é a concentração do éster no tempo zero; C é a concentração do éster em determinado tempo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Imobilização das lipases nos diferentes suportes

As lipases CALB, Lecitase e Palatase foram imobilizadas em diferentes suportes comerciais e estratégias de imobilização (Figura 1a).

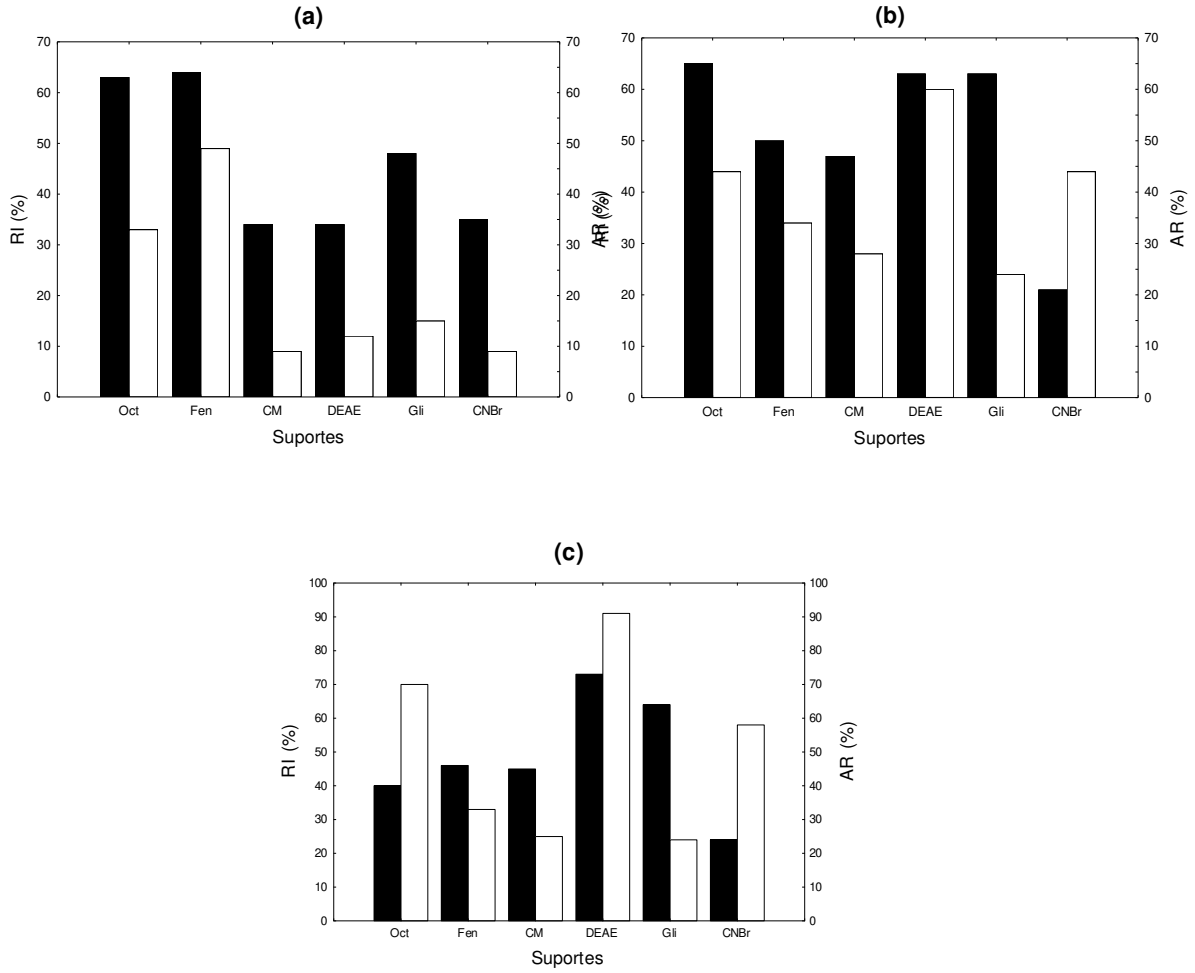


FIGURA 1. Rendimento de Imobilização - RI (■) e Atividade Recuperada - RA (□) das lipases CALB (a), Palatase (b) e Lecitase (c) imobilizadas nos diferentes suportes. Oct - Octil-Sefarose; Fen - Fenil-Sefarose; CM - Carboximetil-Sefarose, DEAE - Dietilaminoetil-Sefarose; Gli - Glioxil-agarose; e CNBr - Bromocianógeno.

O maior rendimento de imobilização (RI) da lipase CALB foi obtido nos suportes hidrofóbicos Fen e Oct alcançando 64% e 63%, e atividade recuperada de 49% e 33%, respectivamente. Turati et al. [45] estudaram a imobilização da lipase de *Penicillium* sp. em diferentes suportes hidrofóbicos, e os melhores RI foram alcançados usando os Butil-Sefarose e Toyopearl com 90,1% e 90,3%, respectivamente, enquanto em Oct foi de 71,4% e Fen 77,3%.

A imobilização da lipase de *Hypocrea pseudokoningii* em Octil-Sefarose, Hexil Toyopearl, Lewatit, Butil-Sefarose, Fenil-Sefarose e Purolite obtiveram excelentes resultados, atingindo 100% de RI [30]. A imobilização enzimática nos suportes hidrofóbicos ocorre através do mecanismo conhecido como ativação interfacial, o qual estabiliza a conformação aberta da enzima e expõe o sítio ativo ao meio reacional, em presença da superfície hidrofóbica [29,43]. A ativação interfacial em suportes hidrofóbicos é uma estratégia útil, que permite a imobilização, purificação, hiperativação e estabilização de muitas lipases [10]. Além disso, é uma técnica fácil, de baixo custo e que permite o reuso do suporte [28]. Nos demais suportes avaliados no presente estudo, o RI dos derivados de CALB variaram de 34% a 48% e AR de 9% a15%.

Os melhores rendimentos de imobilização de Palatase foram alcançados nos suportes Oct, com 65% e atividade recuperada de 44%, seguido de DEAE, com RI de 63% e AR de 60% e Gli com RI de 63% e AR de 23% (Figura 1b).

O derivado Lec-DEAE apresentou o maior RI do estudo com 73% e atividade recuperada de 91% (Figura 1c). Outro derivado que também se destacou foi Lec-Gli com RI de 64% e RA de 24%. Na imobilização em suportes de troca iônica, como DEAE-Sefarose, pode ocorrer a dessorção da enzima do suporte durante o processo, causando a inativação do biocatalisador e contaminação do produto. Assim, para um biocatalisador ideal, a adsorção iônica deve ser tão forte que a enzima só seja dessorvida após a redução da atividade catalítica [11].

3.2 Biossíntese dos ésteres de aroma frutal

3.2.1. Acetato de isoamila (AI)

Os ésteres isoamílicos são reconhecidos pelo aroma característico de banana e por serem amplamente utilizados na indústria de alimentos, bebidas, farmacêutica e cosméticos [21]. A máxima conversão do éster AI (Tabela 1) foi obtida usando o derivado de CALB imobilizada em resina catiônica CM-sepharose, alcançando 60,51% e concentração de 22,7 mM, em 360 min de incubação. A conversão pode ser

explicada pelo equilíbrio entre a reação de síntese e hidrólise, resultando na síntese do éster e na liberação de água [12]. Os derivados Lecitase e Palatase apresentaram valores inferiores, quando comparados com CALB-CM, destacando-se os derivados Lec-DEAE, com máximo rendimento de conversão de 15,95% em 120 min e Pal-Oct, com 13,76% em 30 min. Nota-se, que apesar dos maiores valores de conversão e concentração, o tempo de reação para produção de AI usando CALB-CM foi superior em relação aos derivados Lec-DEAE e Pal-Oct. Além de CALB-CM, o derivado CALB-Fen também se destacou pela produção de AI apresentando concentração de 16,21 mM e conversão de 44%, em 30 min.

As mais baixas concentrações e conversões de AI foram alcançadas pelas lipases livres (imobilizadas em CNBr) com valores variando de 0,61 mM a 1,14 mM e 6,02% a 1,12%, respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os esperados, pois uma das vantagens da imobilização enzimática é o aumento da estabilidade, o que contribui na síntese dos aromas em meio orgânico. De modo geral, as enzimas livres e imobilizadas diferem-se quanto às suas características bioquímicas e cinéticas. As alterações encontradas são atribuídas a dois fatores principais: (1) a mudanças conformacionais em sua estrutura tridimensional, por exemplo, maior ou menor flexibilidade da proteína adquirida pelo contato com o suporte de imobilização; e (2) a natureza heterogênea do microambiente em que a enzima se encontra [41].

TABELA 1. Concentração, tempo de reação e rendimento de conversão de acetato de isoamila em meio orgânico aplicando os derivados de CALB, Lecitase e Palatase na biossíntese.

Suportes	Lipases								
	CALB			Lecitase			Palatase		
	Con. (mM)	t (min)	Conv. (%)	Con. (mM)	t (min)	Conv. (%)	Con. (mM)	t (min)	Conv (%)
Oct	14,15	120	11,00	0,53	60	8,83	1,76	30	13,76
Fen	16,21	30	44,00	0,26	30	5,13	0,41	30	4,30
CM	22,70	360	60,51	0,23	30	6,45	0,27	30	4,11
DEAE	10,87	30	36,22	1,92	120	15,95	ND	ND	ND
Gli	4,45	180	10,30	0,74	30	7,18	1,60	60	11,04
CNBr	1,14	30	4,08	0,34	30	1,12	0,61	60	6,02

Con. - concentração de éster (mM); t - tempo (min); Conv. - Rendimento de conversão dos ésteres (%); ND - não determinado. Suportes: Oct - Octil-Sefarose; Fen - Fenil-Sefarose; CM - Carboximetil-Sefarose, DEAE - Dietilaminoetil-Sefarose; Gli - Glioxil-agarose; e CNBr - Bromocianógeno.

A enzima Lecitase não foi promissora na síntese de AI (Tabela 1), com concentração do éster variando de 0,23 mM a 1,92 mM, e, possivelmente, este resultado está relacionado ao excesso de ácido acético usado na reação de esterificação com o álcool isoamílico, que promoveu a inibição da lipase devido a diminuição do pH. Outra hipótese é a reação do ácido acético com o resíduo serina no sítio ativo da enzima, interferindo na produção do éster [19]. A baixa conversão também pode estar associada a características intrínsecas da enzima, uma vez que esta é uma preparação comercial obtida da fusão dos genes da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e da fosfolipase de *Fusarium oxysporum* e produzida por cultivo submerso do fungo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado, sendo amplamente utilizada em processos de degomagem de óleo [48]. Desta forma, os derivados de Lecitase não atuaram de modo favorável nas reações de esterificação para a produção dos ésteres de aroma frutal.

Na reação de esterificação aplicando o derivado Pal-DEAE não foi possível quantificar o éster formado, provavelmente, devido a rápida hidrólise ocorrida nos tempos iniciais, causada pela liberação de água, subproduto do processo, deslocando o equilíbrio da reação a favor dos reagentes [42]. A absorção de água pelo biocatalisador é um fator importante responsável pela inativação enzimática, através da formação de multifases ao redor da enzima [22].

A síntese de AI utilizando a lipase do fungo *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina aniônica e em meio reacional contendo heptano foi investigada e obteve rendimento de conversão e concentração de 80% e 150 $g.L^{-1}$, respectivamente, usando excesso de ácido e 72 h de reação [21]. A síntese enzimática de AI aplicando a lipase modificada geneticamente e expressa em CALB obteve concentração de 76,3 g/L em 3 h de reação, a 50°C, 300 rpm e meio reacional contendo heptano [20].

3.2.2. Valerato de etila (VE)

Os derivados Pal-DEAE e CALB-CM obtiveram as maiores concentrações do éster valerato de etila (Tabela 2), alcançando 53,91 mM em 180 min de incubação e 22,75 mM em 30 min, respectivamente. CALB-CM apresentou menor concentração de VE do que o derivado Pal-DEAE, contudo, esta foi atingida em um tempo seis vezes menor, resultando em 75,84% de conversão.

Os derivados de Lecitase empregados na biossíntese de VE apresentaram baixos valores de concentração (de 0,17 mM a 1,36 mM) e rendimento de conversão do éster (de 5,69% a 22,58%), como também evidenciado na síntese de acetato de

isoamila. Vários parâmetros podem influenciar na conversão do produto durante a esterificação enzimática. A síntese pode ser induzida através da remoção da água pelo uso de dessecantes ou outras tecnologias adequadas, e ainda, por meio de reações com razões molares apropriadas entre o ácido carboxílico e o álcool [18].

CALB, Lecitase e Palatase livres apresentaram baixas concentrações e conversões de VE, com valores que variaram de 0,17 mM a 1,22 mM e 4,05% a 5,69%, respectivamente.

O valerato de etila é um importante éster de aroma característico a maçã verde amplamente usado em indústrias de cosméticos e alimentos [33]. A síntese de VE aplicando a lipase CALB imobilizada covalentemente em membranas de polipropileno funcionalizada com amino, utilizando a razão molar 1:1 (ácido valérico: etanol) em hexano obteve rendimento de conversão de 67,2%, e em meio livre de solvente orgânico, a conversão do éster caiu aproximadamente pela metade, atingindo 34,8% [7].

TABELA 2. Concentração, tempo de reação e rendimento de conversão de valerato de etila em meio orgânico aplicando os derivados de CALB, Lecitase e Palatase na biossíntese.

Suportes	Lipases								
	CALB			Lecitase			Palatase		
	Con. (mM)	t (min)	Conv. (%)	Con. (mM)	t (min)	Conv. (%)	Con. (mM)	t (min)	Conv. (%)
Oct	8,17	30	26,56	0,43	30	14,48	11,52	120	29,13
Fen	9,73	30	28,88	0,20	30	6,75	40,64	180	57,40
CM	22,75	30	75,84	1,36	60	22,58	7,40	240	30,80
DEAE	12,47	180	52,85	0,45	60	18,75	53,91	180	64,74
Gli	10,44	120	47,68	1,25	120	20,01	6,61	300	22,04
CNBr	1,22	180	4,05	0,17	30	5,69	0,56	30	4,09

Con. - concentração de éster (mM); t - tempo (min); Conv. - Rendimento de Conversão dos ésteres (%). Suportes: Oct - Octil-Sefarose; Fen - Fenil-Sefarose; CM - Carboximetil-Sefarose, DEAE - Dietilaminoetil-Sefarose; Gli - Glioxil-agarose; e CNBr - Bromocianógeno.

A produção de valerato de etila a partir da condensação de etanol e ácido valérico usando a lipase CALB imobilizada em organogéis foi estudada, alcançando as máximas esterificações nas condições de 0,06 M de ácido valérico (98,89%) e 0,1 M (98,68%) de etanol a 37°C e 150 rpm [33].

3.2.3. Acetato de butila (AB)

Os derivados CALB-Oct, CALB-Gli e CALB-CM na biossíntese do éster de aroma acetato de butila (aroma de abacaxi, Tabela 3) apresentaram as máximas conversões do éster, alcançando 92,59% em 60 min de incubação, 88,08% em 30 min e 85% em 180 min, respetivamente. O derivado Pal-Oct também se destacou pela produção de AB, alcançando concentração de 78 mM e conversão de 53%, contudo, o tempo de reação foi superior aos demais. Diferente dos ésteres acetato de isoamila e valerato de etila, a conversão de AB utilizando os derivados de Lecitase não apresentou valores tão inferiores como os reportados anteriormente, variando de 5,46% a 30,59%.

O meio reacional composto por hexano pode ter contribuído nos elevados valores de conversão obtidos no presente estudo, uma vez que os solventes orgânicos promovem a mudança no sentido do equilíbrio da reação a favor da síntese dos ésteres [16,27]. A polaridade do solvente influencia na reação de esterificação, pois solventes não polares, como o hexano, resultam em maiores rendimentos do que os polares, que podem distorcer a camada de água ao redor da lipase [38]. O uso de etanol pode diminuir a conversão do éster e ainda produzir um efeito inibitório, devido à inativação da lipase [2,14]. Deste modo, a esterificação é favorecida usando solventes com um log *P*> 2, considerando o log *P* como o logaritmo do coeficiente de partição de um composto entre n-octanol e água. O log *P* de hexano é 3,5 [16]. Outra vantagem dos solventes orgânicos é o aumento da solubilidade dos substratos não polares e dos produtos [3].

TABELA 3. Concentração, tempo de reação e rendimento de conversão de acetato de butila em meio orgânico aplicando os derivados de CALB, Lecitase e Palatase na biossíntese.

Suportes	Lipases								
	CALB			Lecitase			Palatase		
	Con. (mM)	t (min)	Conv. (%)	Con. (mM)	T (min)	Conv. (%)	Con. (mM)	t (min)	Conv. (%)
Oct	79,52	60	92,59	0,29	30	9,73	78,0	360	53,00
Fen	17,15	30	20,73	2,28	30	7,61	1,61	120	7,60
CM	70,95	180	85,00	18,35	60	30,59	0,79	180	4,38
DEAE	41,29	60	36,42	1,75	30	5,83	3,86	120	32,15
Gli	75,22	30	88,08	14,09	60	23,49	1,42	180	24,27
CNBr	0,52	120	7,85	1,42	60	5,46	ND	ND	ND

Con. - concentração de éster (mM); t - tempo (min); Conv. - Rendimento de conversão dos ésteres (%); ND - não determinado. Suportes: Oct - Octil-Sefarose; Fen - Fenil-Sefarose; CM - Carboximetil-Sefarose, DEAE - Dietilaminoetil-Sefarose; Gli - Glioxil-agarose; e CNBr - Bromocianógeno.

Os derivados de CALB-CNBr e Lec-CNBr mostraram baixo potencial para serem aplicados na reação de esterificação de acetato de butila, devido as menores concentrações e conversões do éster, enquanto que na reação catalisada por Pal-CNBr não foi possível quantificar o AB, indicando o possível aumento da quantidade de água no meio reacional causando a hidrólise do éster [27]. A água é essencial para a manutenção da integridade da estrutura tridimensional da lipase e de sua atividade catalítica [13,49].

Os mesmos ésteres de aroma frutal do presente estudo foram sintetizados em meio orgânico com as lipases de *Candida rugosa* e lipase pancreática imobilizadas em alginato de cálcio (CaAg). Os rendimentos de esterificação máximos empregando a lipase de *C. rugosa* para AI foi de 308 µmol éster/h, 200 µmol éster/h para VE e de 475 µmol éster/h para AB, enquanto para a lipase pancreática foram de 360 µmol éster/h, 210 µmol éster/h e 400 µmol éster/h, respectivamente [27].

A síntese enzimática de acetato de butila usando hexano, razão molar dos substratos variando de 1:1 e 7:1 (butanol: ácido acético) e como biocatalisador a lipase CALB imobilizada em grânulos de estireno-divinilbenzeno foi avaliada e alcançou aproximadamente 90% de conversão em 2 h [15]. Uma nova lipase de *Rhizopus oryzae* foi estudada na reação de esterificação de AB, onde os sistemas livres de solventes apresentaram um rendimento de conversão (cerca de 60%) menor do que os meios reacionais contendo heptano e hexano, com 80% e 76% de conversão, respectivamente [38].

3.3. Biossíntese dos ésteres de aroma frutal em meio orgânico usando Novozym 435

A Novozym 435 é a preparação comercial da lipase *Candida antarctica* tipo B (CALB) imobilizada via ativação interfacial em resina moderadamente hidrofóbica Lewatit VP OC 1600 [23]. Na biossíntese dos ésteres de aroma a maior conversão foi alcançada para o acetato de butila correspondendo a 83,17% e concentração de 24,95 mM, em 30 min de incubação, seguido do éster com aroma característico a banana, acetato de isoamila (48,27% e 13,56 mM) (Tabela 4).

TABELA 4. Concentração, tempo de reação e rendimento de conversão dos ésteres acetato de isoamila, valerato de etila e acetato de butila, em meio orgânico aplicando a enzima Novozym 435 na biossíntese.

Éster	Concentração (mM)	Tempo de reação (min)	Conversão (%)
Acetato de isoamila	13,56	30	48,27
Valerato de etila	4,36	60	7,26
Acetato de butila	24,95	30	83,17

O valerato de etila foi o éster que apresentou os resultados menos promissores em relação a concentração (4,36 mM) e rendimento de conversão (7,26%), alcançados no dobro do tempo de reação, em comparação aos demais ésteres.

A influência da energia ultrassônica nas reações de esterificação para a produção de acetato de butila em meio contendo hexano e catalisada por Novozym foi verificada, obtendo conversão do éster de 94% em 2,5 h de reação [23]. A síntese enzimática de acetato de isoamila aplicando Novozym 435 em meio orgânico foi investigada [37]. No estudo foi obtido um rendimento de conversão de 192% em 2 h de reação, sob as condições de 0,8 M de ácido acético, excesso de álcool, concentração enzimática de 13,8 g/mol e temperatura de 40°C. A síntese enzimática de valerato de etila utilizando Novozym e aplicando a metodologia de superfície de resposta, revelou que 0,04 M de concentração dos substratos, 7% para concentração da lipase a 34°C e 96 h de reação foram as condições ótimas e que resultaram na porcentagem de esterificação de 72,9% [34].

4. CONCLUSÃO

As lipases microbianas comerciais CALB, Lecitase e Palatase apresentaram diferentes comportamentos em relação as estratégias de imobilização adotadas, com rendimentos (RI) que variaram de 21% a 73%, destacando-se o derivado Lec-DEAE, que além do maior RI, também manteve 91% de atividade recuperada. Ainda, na biossíntese dos ésteres de aroma frutal, o derivado CALB-CM obteve maior potencial para a produção de acetato de isoamila, com concentração e rendimento de conversão de 22,70% e 60,51%, respectivamente, enquanto a maior produção de valerato de etila foi obtida aplicando-se o derivado Pal-DEAE, atingindo 64,74%. Dentre os ésteres avaliados, o acetato de butila foi o que apresentou os melhores resultados quanto à síntese enzimática aplicando os diferentes biocatalisadores

imobilizados. As máximas conversões foram obtidas para os derivados CALB-Oct, CALB-Gli e CALB-CM, alcançando 92,59% em 60 min de reação, 88,08% em 30 min e 85% em 180 min, respetivamente. A lipase comercialmente imobilizada, Novozym 435, mostrou um maior rendimento de conversão para o éster acetato de butila, seguido de acetato de isoamila e valerato de etila. Neste sentido, o estudo permitiu concluir que as lipases imobilizadas são mais estáveis e, consequentemente, mais eficientes na biossíntese dos ésteres de aroma frutal em meio orgânico, em comparação às enzimas livres, que apresentaram baixos rendimentos de conversão e hidrólise do éster.

Nomenclatura

CNBr – Bromocianógeno

CALB - *Candida antarctica* tipo B

CM - Carboximetil-Sefarose

DEAE - Dietilaminoetil-Sefarose

Lec - Lecitase Ultra

Pal - Palatase 20000 L

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, Inglaterra, v. 42, n. 15, p. 6406-6436, 2013.

[2] AHMED, E.H.; RAGHAVENDRA, T.; MADAMWAR, D. An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: application for ethyl caprylate synthesis. **Bioresource Technology**, Inglaterra, v. 101, n. 10, p.3628-3634, 2010.

[3] BARROS, D.P.C.; FONSECA, L.P.; FERNANDES, P.; CABRAL, J.M.S.; MOJOVIC, L. Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Holanda, v. 60, n. 3, p. 178-185, 2009.

[4] BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemisty**, EUA, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

[5] BRASIL. Resolução - RDC n° 2 de 15 de janeiro de 2007. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/resolu%C3%A7%C3%A3o2_2007.pdf>. Acesso em: 05 de jul. 2017.

[6] BRAULT, G.; SHARECK, F.; HURTUBISE, Y.; LÉPINE, F.; DOUCET, N. Short chain flavor ester synthesis in organic media by an *E. coli* whole-cell biocatalyst expressing a newly characterized heterologous lipase. **PLOS ONE,** EUA, v. 9, n. 3, p. 1-9, 2014.

[7] BAYRAMOĞLU, G.; HAZER, B.; ALTINTAŞ, B.; ARICA, M.Y. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. **Process Biochemistry**, Inglaterra, v. 46, n. 1, p. 372-378, 2011.

[8] BICAS, J.L.; SILVA, J.C.; DIONÍSIO, A.P.; PASTORE, G.M. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Brasil, v. 30, n. 1, p. 7-18, 2010.

[9] DHAKE, K.P.; THAKARE, D.D.; BHANAGE, B.M. Lipase: a potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. **Flavour and Fragrance Journal**, Inglaterra, v. 28, n. 2, p. 71-83, 2013.

[10] FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, M.J. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, Irlanda, v. 93, n. 1, p.185-197, 1998.

[11] FUENTES, M.; MAQUIESE, J.V.; PESSELA, B.C.C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MATEO, C.; GUISÁN, J.M. New cationic exchanger support for reversible immobilization of proteins. **Biotechnology Progress**, EUA, v. 20, n. 1, p. 284-288, 2004.

[12] GHAMGUI, H.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; BEZZINE, S.; MILED, N.; GARGOURI, Y. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, EUA, v. 38, n. 6, p. 788-794, 2006.

[13] GOLDBERG, M.; THOMAS, D.; LEGOY, M.D. Water activity as a key parameter of synthesis reactions: the example of lipase in biphasic (liquid/solid) media. **Enzyme and Microbial Technology**, EUA, v. 12, n. 12, p. 976-981, 1990.

[14] GOGOI, S.; PAHTAK, M.G.; DUTTA, A.; DUTTA, N.N. Porcine pancreas lipase catalyzed synthesis of lauryl laurate, in organic solvent media: a kinetic study. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, Índia, v. 45, n. 3, p. 192-197, 2008.

[15] GRAEBIN, N.G.; MARTINS, A.B.; LORENZONI, A.S.G.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB M.A.Z.; RODRIGUES, R.C. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene–divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis. **Biotechnology Progress**, EUA,v. 28, n. 2, p. 406-412 2012.

[16] GUILLÉN, M.; BENAIGES, M.D.; VALERO, F. Biosynthesis of ethyl butyrate by immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase expressed in *Pichia pastoris*. **Biochemical Engeneering Journal**, Holanda, v. 65, n. 15, p. 1-9, 2012.

[17] GUISÁN, J.M. Aldehyde gels as activated support for immobilization–stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, EUA, v. 10, n. 6, p. 375-382, 1988.

[18] HILLS, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. **European Journal of Lipid Science Technology**, Alemanha, v. 105, n. 10, p. 601-607, 2003.

[19] HUANG, S.Y.; CHANG, H.L.; GOTO, M. Preparation of surfactant-coated lipase for the esterification of geraniol and acetic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, EUA, v. 22, n. 7, p. 552-557, 1998.

[20] JIN, Z.; NTWALI, J.; HAN, S.Y.; ZHENG, S.P.; LIN, Y. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. **Journal of Biotechnology**, v.159, n. 1, p. 108-114, 2012.

[21] KRISHNA, S.H.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 193-201, 2001.

[22] MARTINS, A.B.; GRAEBIN, N.G.; LORENZONI, A.S.G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, Inglaterra, v. 46, n. 12, p. 2311-2316, 2011.

[23] MARTINS, A.B.; SCHEIN, M.F.; FRIEDRICH, J.L.R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C. Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym 435: enhanced activity and operational stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, Holanda, v. 20, n. 5, p. 1155-1160, 2013.

[24] MARTINS, A.B.; SILVA, A.M.; SCHEIN, M.F.; GARCIA-GALAN, C.; AYUB, M.A.Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Holanda, v. 105, p.18-25, 2014.

[25] MATEO, C.; ABIAN, O.; ERNEDO, M.B.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; GRAZU, V.; PESSELA, B.C.C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISDA-VIEIRA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme Microbiology and Technology**, EUA, v. 37, n. 4, p.456-62, 2005.

[26] MATEO, C.; GRAZÚ, V.; PALOMO, J.M.; LÓPIZ-GALLEGO, F.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1022-1033, 2007.

[27] OZYLMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic into calcium alginate gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Holanda, v. 64, n. 3, p. 140-145, 2010.

[28] PALOMO, J.M.; MUOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Holanda, v. 19, n. 2, p. 279-286, 2002.

[29] PALOMO, J.M.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase–lipase interactions as a new tool

to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, EUA, v. 36, n.4, p. 447-454, 2005.

[30] PEREIRA, M.G.; FACCHINI, F.D.A.; FILÓ, L.E.C.; POLIZELI, A.M.; VIVI, A.C.; JORGE, J.A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PESSELA, B.C.; GUISAN, J.M. POLIZELI, M.L.T.M. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, Inglaterra, v. 50, n. 4, p. 561-570, 2015.

[31] PIO, T.F.; MACEDO, G.A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, EUA, v. 41, n. 5, p. 613-619, 2007.

[32] QUINN, D.M.; SHIRAI, K.J.; JACKSON, R.L.; HARMONY, J.A.K. Lipoprotein lipase catalyzed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl esters. Inhibition by apoprotein C-II. **Biochemistry**, v. 21, n. 26, p. 6872-6879, 1982.

[33] RAGHAVENDRA, T., SAYANIA, D., MADAMWAR, D. Synthesis of the 'green apple ester' ethyl valerate in organic solvents by *Candida rugosa* lipase immobilized in MBGs in organic solvents: effects of immobilization and reaction parameters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Holanda, v.63, n. 1, p. 31-38, 2010.

[34] RODRIGUES-NOGALES, J.M.; ROURA, E.; CONTRERAS, E. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. **Process Biochemistry**, Inglaterra, v. 40, n. 1, p. 63-68, 2005.

[35] RODRIGUES, R.C.; GODOY, C.A.; VOLPATO, G.; AYUB, A.Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Immobilization-stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, Inglaterra, v. 44, v. 9, p. 963-968, 2009.

[36] ROMDHANE, I.B.B.; ROMDHANE, Z.B.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Holanda, v. 68, n. 3, p. 230-239, 2011.

[37] ROMERO, M.D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A.; GHAZIASKAR, H.S. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in *n*-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, EUA, v. 37, n. 1, p. 42-48, 2005.

[38] SALAH, R.B.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Japão, v. 103, n. 4, p. 368-372, 2007.

[39] SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends in Biotechnology**, Inglaterra, v. 23, n. 4, p. 193-198, 2005.

[40] SINGH, A.K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, EUA, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

[41] SOUZA, L.T.A.; VERÍSSIMO, L.A.A.; JOAO, B.C.P; SANTORO, M.M.; RESENDE, R.R.; MENDES, A.A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de

suportes. In: SOCCOL, C.R., FRANÇA, L.R., RESENDE, R.R. Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria. São Paulo: Blucher, 2017. Capítulo 15, p. 529-568.

[42] SPINELLI, D.; COPPI, S.; BASOSI, R.; POGNI, R. Biosynthesis of ethyl butyrate with immobilized *Candida rugosa* lipase onto modified Eupergit C. **Biocatalysis**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2014.

[43] TORRES, R.; ORTIZ, C.; PESSELA, B.C.C.; PALOMO, J.M.; MATEO, C.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorpiton on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, EUA, v. 39, n. 2, p. 167-171, 2006.

[44] TORRES, S.; BAIGORI, M.D.; SWATHY S.L.; PANDEY, A.; CASTRO, G.R. Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. **Food Research International**, Canadá, v. 42, n. 4, p. 454-460, 2009.

[45] TURATI, D.F.M.; MORAIS JÚNIOR, W.G.; TERRASAN, C.R.F.; MORENO-PEREZ, S.; PESSELA, B.C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; CARMONA, E.C. Immobilization of lipase from *Penicillium* sp. section *Gracilenta* (CBMAI 1583) on different hydrophobic supports: modulation of functional properties. **Molecules**, Suiça, v. 22, n. 2, p. 1-14, 2017.

[46] VIEIRA, M.F.; VIEIRA, A.M.S.; ZANIN, G.M.; TARDIOLI, P.W.; MATEO, C.; GUISAN, J.M. β-glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distint reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Holanda, v. 69, n.1, p. 47-53, 2011.

[47] World Flavors & Fragrances: Industry Study with Forecasts for 2016 & 2021. Disponível em: <http://www.freedoniagroup.com/DocumentDetails.aspx?Referrerid=FM-Bro&StudyID=2952>. Acesso em: 06 jul.2017.

[48] YANG, J.G.; WANG, Y H.; YANG, B.; MAINDA, G.; GUO, Y. Degumming of vegetable oils by a new microbial lipase. **Food Technology and Biotechnology**, Croácia, v. 44, n. 1, p. 101-104, 2006.

[49] ZAKS, A.; KLIBANOV, A.M. The effect of water on enzyme action in organic media. **Journal of Biological Chemistry**, Croácia, v. 263, n. 17, p. 8017-8021, 1988.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPERGS pela concessão das bolsas de estudo, e ao Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (Madrid, Espanha) pela infraestrutura utilizada no desenvolvimento da pesquisa.