



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**INFLUÊNCIA DO SUPORTE NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE
BURKHOLDERIA CEPACIA NA PREPARAÇÃO DE ÉSTERES
DE AROMA**

IASMINY DA SILVA BRASIL

Florianópolis
Julho/2016

Iasminy da Silva Brasil

**INFLUÊNCIA DO SUPORTE NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE
BURKHOLDERIA CEPACIA NA PREPARAÇÃO DE ÉSTERES DE
AROMA**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientadora: Maria da Graça Nascimento

Florianópolis
Julho/2016

Iasminy da Silva Brasil

**INFLUÊNCIA DO SUPORTE NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE
BURKHOLDERIA CEPACIA NA PREPARAÇÃO DE ÉSTERES DE
AROMA**

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Maria da Graça Nascimento
Orientadora

Prof. Fábio Zazyki Galetto

Prof. Ricardo José Nunes

Florianópolis
Julho/2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Janete e Antonio. Vocês sempre estiveram ao meu lado, sempre me ensinaram o que acreditavam ser o certo, e sempre me deram a liberdade de escolher qual caminho eu queria seguir, e me deixaram trilhá-lo com meus próprios pés. Obrigada por sempre me apoiarem, mesmo quando vocês não concordavam com as minhas escolhas. Eu amo vocês e tenho muito orgulho de tê-los como meus pais, mesmo que eu não diga isso com muita frequência.

Ao meu irmão Dyego e sua esposa Pamela, obrigada por sempre me apoiarem também, as vezes discordando e brigando comigo, mas sempre desejando minha felicidade e meu sucesso. Posso não ser a melhor irmã/cunhada do mundo, mas tenho certeza que sou a preferida de vocês. Amo vocês, mesmo quando brigamos.

Aos amigos, que de uma forma ou de outra me ajudaram nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Obrigada pai. Obrigada mãe. Se hoje cheguei aqui foi por tudo o que vocês me ensinaram. Tenho muito orgulho de vocês; Mano e Pam, obrigada pelos puxões de orelha e os bons conselhos. Contem comigo sempre; Loisi, Juana e Nauro, vocês são meus melhores amigos, e não fazem ideia do quão importante são na minha vida; obrigada Prof. Graça pela paciência comigo e por ser uma das melhores professoras com quem já tive o prazer de estudar e trabalhar; obrigada aos colegas do laboratório, Douglas, Fernanda, Igor, Jaque, Ju, Leandro, Manu, Pamela e Paulo, pelas risadas, a companhia nas horas extras, e todo o auxílio que vocês me deram, principalmente o Paulo, pelas análises de RMN e os mil arquivos compartilhados. Sem vocês este TCC não sairia; obrigada prof. Faruk, Alex, Elder, Elvis, Fran, Leandro e Will pelos 2,5 anos de LACFI, onde nunca faltou companheirismo nem passe do RU. Aprendi muito com vocês; obrigada pessoal da C.U., especialmente meus veteranos Fifis, Luix, Paty, Sam e Victor, por terem me adotado lá no início da faculdade e me tornarem parte do grupo; obrigada Indy e Lia por serem grandes amigas. Já sinto falta das invasões de quarto, das longas conversas e das nossas maratonas com gordices; obrigada Ordinários em Davis e #230, vocês foram minha família nos EUA e vivemos juntos o *sonho californiano*. Que nossa amizade continue atravessando fronteiras. Gabu, Rafa, Rapha e Tulho, vocês merecem um obrigado a mais; obrigada Fabi e Tuca por serem grandes amigas e ótimas parceiras de laboratório e de classe, não tenho palavras para agradecer o quanto vocês me ajudaram ao longo da graduação; obrigada pessoal da GNTM, que me acolheu desde o primeiro boardgame e me ajudou, mesmo sem saber, a passar pelo meu momento mais difícil, em especial Ju e Tatá, sempre cuidando de mim e garantindo ótimos momentos, Fap, meu mais novo parceiro de festas e gordices, e Sarah e Eve, que nunca negam uma boa conversa; obrigada Jani, Jaime e Rodolfo, por serem a melhor parte do meu ensino médio; obrigada Edu e Magrão pelas aulas de lab mais divertidas; obrigada prof. Alexandre pela sua calma e bom humor mesmo na correria dos TCCs; obrigada aos demais amigos, sejam da química, do intercâmbio, da vida, gostaria de agradecer todos que me ajudaram no meu caminho; obrigada aos meus professores, que foram guias, conselheiros e exemplos; obrigada a UFSC, ao Departamento de Química, Central de Análises, a CAPES, ao CNPq e ao INCT-Catálise e a Amano Co por possibilitarem a realização deste e outros trabalhos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1. Catálise	11
2.2. Enzimas	11
2.3. Imobilização de enzimas	14
2.4. Suportes para imobilização de enzimas	15
2.5. Ésteres de aroma	18
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Reagentes, solventes e biocatalisadores	21
4.2. Equipamentos	22
4.3. Procedimentos experimentais	22
4.3.1. Preparação dos suportes	22
4.3.1.1. Imobilização da lipase em filmes de amido	22
4.3.1.2. Imobilização da lipase em filmes de gelatina	23
4.3.1.3. Imobilização da lipase em filmes de polímeros	24
4.3.1.4. Imobilização da lipase gel de ágar	24
4.3.3. Reações de esterificação	25
4.3.3.1. Preparação do octanoato de etila	26
4.3.3.2. Preparação do acetato de isoamila	27
4.3.4. Isolamento e purificação do acetato de isoamila	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Preparação do octanoato de etila	29
5.1.1. Influência do suporte	29

5.2. Preparação do acetato de isoamila	31
5.2.1. Influência do suporte	32
5.2.2. Reuso dos suportes	35
5.2.3. Influência da temperatura	37
5.2.4. Influência do tempo	39
5.2.5. Isolamento e caracterização do produto	40
6. REFERÊNCIAS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos modelos enzimáticos da chave-fechadura (a) e encaixe-induzido (b). ^[3]	12
Figura 2. Diferentes métodos de imobilização de enzimas: adsorção (à esquerda), aprisionamento (ao centro) e ligações cruzadas (à direita). As enzimas estão representadas pelas esferas. ^[9]	14
Figura 3. Estruturas químicas dos monômeros de PEO e PVA.....	15
Figura 4. Estrutura da celulose, com ligações de hidrogênio intermoleculares e ligações β -1,4'-glicosídicas.....	16
Figura 5. Exemplos de fontes vegetais de amido.	16
Figura 6. Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b).	17
Figura 7. Ligações α -1,4'-glicosídicas da amilose levam a formação de uma estrutura helicoidal. ^[3]	17
Figura 8. Estrutura de um monômero de agarose.	17
Figura 9. Estrutura química dos ésteres de aroma acetato de benzila (3), acetato de isoamila (4), butirato de metila (5) e octanoato de metila (6).....	18
Figura 10. Preparação de filmes de amido.	23
Figura 11. Preparação dos filmes de gelatina.	23
Figura 12. Preparação dos filmes de polímeros.	24
Figura 13. Preparação do gel de ágar.	25
Figura 14. Reação de esterificação de ácido octanóico e etanol.....	26
Figura 15. Reação de esterificação de álcool isoamílico e acetato de vinila.	27

Figura 16. Espectro de ^1H -RMN do produto da reação de preparação do octanoato de etila feita com LPS-SD imobilizada em filme de amido de pinhão (400 MHz, CDCl_3). Conversão de 58%.....	30
Figura 17. Espectro de ^1H -RMN do produto da reação de preparação do acetato de isoamila feita com LPS-SD imobilizada em filme de amido de cará (400 MHz, CDCl_3). Conversão de 50%.....	32
Figura 18. Valores de conversão em acetato de isoamila obtidos nas reações de esterificação catalisada pela LPS-SD imobilizada em filmes de diversos amidos. (a) Condições reacionais: acetato de vinila (0,01 mol), álcool isoamílico (0,01 mol), 24 h, 35 °C; (b) Conversão determinada por ^1H -RMN.....	33
Figura 19. Espectro de ^1H -RMN do produto da reação de preparação do acetato de isoamila feita com LPS-SD imobilizada em filme de PEO (400 MHz, CDCl_3). Conversão de 84%.....	36
Figura 20. Valores de conversão em acetato de isoamila nas reações de esterificação catalisadas pela LPS-SD imobilizada em filmes de amido de pinhão nas temperaturas de 25, 25 e 45 °C. (a) Condições reacionais: acetato de vinila (0,01 mol), álcool isoamílico (0,01 mol), 24 h; (b) Conversão determinada por ^1H -RMN. ..	38
Figura 21. Valores de conversão em acetato de isoamila nas reações de esterificação catalisadas pela LPS-SD imobilizada em filmes de amido de pinhão por 6, 12, 24 e 36 h. (a) Condições reacionais: acetato de vinila (0,01 mol), álcool isoamílico (0,01 mol), 35 °C; (b) Conversão determinada por ^1H -RMN.....	39
Figura 22. Espectro de infravermelho do acetato de isoamila (KBr).....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação internacional de enzimas segunda a UIBBM.	12
Tabela 2. Valores de conversão em octanoato de etila nas reações de esterificação catalisadas pela LPS-SD imobilizada em diferentes suportes.....	30
Tabela 3. Valores de conversão em acetato de isoamila nas reações de esterificação catalisada pela LPS-SD imobilizada em diferentes suportes.	33
Tabela 4. Valores de conversão em acetato de isoamila nas reações de esterificação catalisadas pela LPS-SD em diferentes reusos dos suportes.	35

RESUMO

Ésteres de aroma são largamente empregados na indústria alimentícia como aromatizantes e flavorizantes, e uma das formas de prepará-los é através do uso de lipases. Neste trabalho foi analisada a influência do suporte para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD) nas reações de preparação do octanoato de etila e acetato de isoamila em meio orgânico, utilizando *n*-hexano como solvente. Na preparação do octanoato de etila, foi observada a volatilização do reagente de partida etanol, o que tornou os dados obtidos na catálise não confiável. Nas reações com o álcool isoamílico, o mesmo problema não foi observado. Filmes de poli-óxido de etileno (PEO), poli-álcool vinílico (PVA), amilopectina de pinhão e amido de cará, gengibre, inhame, mandioca, milho e pinhão foram utilizados para a imobilização da LPS-SD. Esta lipase foi também imobilizada em gel de ágar e bucha vegetal. Estes sistemas foram usados como biocatalisadores na preparação do acetato de isoamila. Todas as reações foram realizadas a 35 °C por 24h, e as que apresentaram os maiores valores de conversão no primeiro uso foram aquelas com a LPS-SD imobilizada em filme de PEO (89%), bucha vegetal (81%) e em filme de amido de batata (70%) e de pinhão (64%). Nas reações utilizando LPS-SD imobilizada em filme de gelatina e em gel de ágar, as conversões foram muito baixas (31 e 8%, respectivamente). Ao usar os outros filmes de amido, amilopectina e PVA os valores de conversão em éster foram moderados (~50%). No segundo reuso as reações com a LPS-SD imobilizada em filme de PEO e em filme de amido de pinhão foram as que continuaram a apresentar os melhores resultados, sendo as conversões de 84 e 64%, respectivamente. Ao avaliar a influência de temperatura e tempo de reação usando o filme de amido de pinhão como suporte, obteve-se o acetato de isoamila com conversão de 64% a 35 °C em 24 h. O filme de amido de pinhão foi escolhido para os próximos estudos (tempo e temperatura) devido ao seu baixo custo de obtenção e ser um biopolímero de fonte renovável, aprimorando o sistema de acordo com os princípios da química verde. A maior conversão em acetato de isoamila foi obtida a 35 °C em 24 h, sendo de 64%.

Palavras-chave: imobilização de lipase; suportes para enzima; ésteres de aroma

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, os ésteres são largamente utilizados na indústria, desde o uso como solventes até a aplicação como aromatizantes e flavorizantes artificiais em alimentos consumidos todos os dias pela população, passando pela produção de polímeros e perfumes.

Desta maneira, faz-se necessária a busca por rotas sintéticas para a formação destes compostos com alta conversão, baixo custo e que não sejam prejudiciais ao meio ambiente. O método mais simples de síntese é a esterificação de Fisher, porém, apesar de apresentar baixo custo e rendimentos relativamente altos, exige altas temperaturas e o uso de catalisador ácido, além de excesso de um dos reagentes, o que vai contra os princípios de química verde.

Assim, a busca por alternativas à esterificação de Fisher levou à utilização de lipases como biocatalisadores na síntese de ésteres utilizando temperaturas brandas e quantidades equimolares dos reagentes. Visando evitar o desperdício de enzimas, que são catalisadores bastante eficientes e não tão baratos, utiliza-se o método de imobilização para que elas possam ser facilmente recuperadas do sistema reacional e utilizadas novamente nas reações, com o aumento da vida útil do catalisador e diminuição do custo total da produção.

Contudo, cada sistema enzima/suporte responde de maneira diferente para um determinado meio reacional, tornando então necessário o estudo do melhor sistema para o meio em que se deseja trabalhar, escolhendo meticulosamente qual enzima, suporte, solvente, temperatura e tempo reacional são mais adequadas para se obter o melhor resultado em uma reação.

Para preparar os ésteres octanoato de etila e acetato de isoamila, que apresentam aroma de coco e banana, respectivamente, deve-se então avaliar qual suporte para a lipase LPS-SD apresentará o melhor desempenho. Também é importante estudar o efeito do tempo e temperatura de reação para obter um conjunto de parâmetros ideais para cada reação estudada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Catálise

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) define catálise como sendo o processo químico na qual há um aumento da velocidade de uma reação através do uso de um catalisador, sendo este uma substância que participa da reação química sem ser consumida durante o processo e capaz de fornecer um caminho de reação alternativo com energia de ativação menor do que a da reação não-catalisada, porém mantendo a mesma energia de Gibbs global. [1-3]

Classifica-se a catálise de acordo com a fase onde se encontra o catalisador: se ele está na mesma fase do reagente e do produto, a reação é classificada como catálise homogênea; se o catalisador está em uma fase diferente, então é uma catálise heterogênea. [2] Há ainda a biocatálise, que realiza uma reação catalisada por meios biológicos, como, por exemplo, enzimas e seus extratos, células íntegras e micro-organismos. [4]

Atualmente, cerca de 90% dos processos químicos utilizam catálise em pelo menos uma de suas etapas, e com o aumento da consciência ambiental e o incentivo do uso da catálise como um dos princípios da química verde, este número deve aumentar ainda mais. [1,5] Dentre os processos de catálise, a biocatálise se destaca por apresentar muitas características importantes na prática da química verde, como a prevenção de produção de resíduos, formação de substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade ao homem e ao meio ambiente e utilização de matérias-primas renováveis. Outro aspecto positivo da biocatálise é a possibilidade de utilizar meios reacionais suaves, como água em temperatura e pH fisiológicos, bem como o uso de catalisadores biodegradáveis como as células e enzimas. [4,5]

2.2. Enzimas

Enzimas são, em geral, proteínas globulares que atuam como catalisadores extremamente eficientes em reações bioquímicas, exercendo papel importante na quebra e formação de diversas moléculas no organismo, aumentando as velocidades das reações na ordem de 10^{10} a 10^{23} . Por possuírem uma estrutura que apresenta quiralidade, são altamente estereosseletivas e regioseletivas, além de apresentarem quimiosseletividade. [3,4,6]

Durante muitos anos acreditou-se na ideia de “uma enzima, um substrato” devido ao modelo chave-fechadura proposto por Emil Fischer em 1894 que

introduziu a noção de que as interações enzima-substrato são complementares, sugerindo que a alta especificidade das enzimas se deve ao fato do substrato se encaixar perfeitamente no seu sítio ativo, considerando que tanto o biocatalisador (fechadura) quanto o ligante (chave) possuem conformações rígidas. [3,6,7]

Entretanto, em 1958 Daniel Koshland sugeriu um novo modelo de encaixe-induzido, onde a ligação enzima-substrato libera energia suficiente para que a enzima sofra uma mudança conformacional, seja apenas no sítio ativo ou em toda a sua estrutura, para acomodar melhor o substrato e aproximar grupos funcionais necessários para a estabilização do estado de transição através de interações com esses grupos. Esta é a teoria mais aceita atualmente. [3,8] A **Figura 1** mostra um desenho exemplificando os modelos da chave-fechadura e do encaixe-induzido.

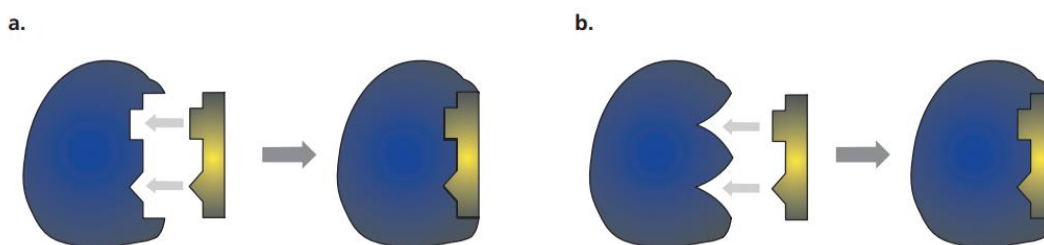


Figura 1. Representação dos modelos enzimáticos da chave-fechadura (a) e encaixe-induzido (b). [3]

Devido ao grande número de enzimas existentes, a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) adotou um sistema de classificação dividindo-as em seis classes, de acordo com o tipo de reação catalisada, como pode-se observar na **Tabela 1**. [4,8]

Tabela 1. Classificação internacional de enzimas segunda a UIBBM.

Classe	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxirredutase	Transferência de elétrons
2	Transferase	Transferência de grupos funcionais
3	Hidrolase	Reações de hidrólise
4	Liasse	Clivagem por eliminação ou adição de grupos a duplas ligações
5	Isomerase	Reações de isomerização
6	Ligase	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por condensação

Nos últimos anos a demanda de enzimas para utilização na indústria têxtil, de alimentos, fármacos, cosméticos, papel, couro e na agricultura, entre outros mercados, tem aumentado consideravelmente, e o avanço em engenharia de proteínas e biotecnologia tornaram possível a manipulação de enzimas para que tenham características desejadas em relação a especificidade, seletividade e atividade com um custo comercial relativamente bom. [9,10]

Dentre as enzimas mais flexíveis quanto à especificidade e de baixo custo comercial estão as lipases, uma subclasse das hidrolases, encontradas em organismos animais, vegetais e microbianos. Por esses motivos as lipases estão entre as três enzimas mais utilizadas no setor industrial, juntamente com proteases e carboidrases. [10-12]

A principal função das lipases no organismo é promover a hidrólise de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e glicerol, porém são largamente utilizadas na indústria de alimentos, de detergentes e oleoquímica. Também têm ganhado grande destaque na indústria farmacêutica por seu comportamento enantiosseletivo, facilitando e diminuindo o custo da produção de fármacos quando apenas um dos isômeros apresenta atividade biológica ou um deles é nocivo. [13-18]

Um exemplo é a síntese do ácido 2-cloro-propanóico enantiopuro, um intermediário para alguns fármacos e herbicidas. Outra característica das lipases relevante para a indústria é sua capacidade de catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meio orgânico ou em solvente supercrítico, como a esterificação enantiosseletiva do 1-(*p*-clorofenil)-2,2,2-trifluoroetanol em CO₂ supercrítico. As lipases também favorecem a hidrólise de ésteres e amidas na ausência de água. [13-18]

Apesar de toda a sua versatilidade em reações e boa estabilidade em diferentes meios, é muito difícil recuperar as lipases, bem como outras enzimas do meio reacional se ela estiver livre em solução. Dessa maneira, é preciso recorrer a métodos de imobilização em diferentes materiais para que se possa retirar as enzimas do meio reacional e reutilizá-las. Adicionalmente, muitos estudos apontam que a imobilização é capaz de melhorar ainda mais certas propriedades como atividade, estabilidade e especificidade. [19-21]

2.3. Imobilização de enzimas

As vantagens de se utilizar enzimas imobilizadas ao invés de sua forma livre são inúmeras, como, por exemplo, maior controle do processo pela remoção da enzima, facilidade de separação do produto final, reutilização do catalisador, maior estabilidade ao pH e à temperatura e proteção contra a desnaturação em solventes orgânicos. [20-12]

De forma geral, a imobilização consiste em confinar a enzima em um suporte sólido através de métodos como adsorção, aprisionamento e ligação cruzada, e a escolha do método a ser utilizado depende do suporte e da enzima. [9,12,22]

Na adsorção, a enzima é fixada na superfície do suporte através de interações de van der Waals, ligações de hidrogênio e atração eletrostática. Polietileno, polipropileno e celulose são alguns exemplos de materiais que podem ser utilizados como suportes de adsorção. [23] No aprisionamento, as enzimas são adicionadas à matriz polimérica do suporte, porém, diferentemente da adsorção, este suporte é sintetizado já na presença das enzimas, fazendo com que elas fiquem confinadas em sua rede polimérica. [9] Exemplos de aprisionamento consistem em enzimas imobilizadas em filmes de amido ou poli(óxido de etileno) e encapsuladas em organo-gel de gelatina ou cápsulas de quitosana. O terceiro método trata da formação de agregados enzimáticos insolúveis em água a partir de ligações cruzadas feitas por moléculas como o glutaraldeído ou a hexametilenodiamina, capazes de formar ligações com as aminas das proteínas. [17,23,24]

A **Figura 2** representa os três métodos de imobilização citados acima.



Figura 2. Diferentes métodos de imobilização de enzimas: adsorção (à esquerda), aprisionamento (ao centro) e ligações cruzadas (à direita). As enzimas estão representadas pelas esferas. [9]

Entretanto, como cada sistema reacional possui características distintas, os seus parâmetros físico-químicos irão afetar de maneira diferente a eficiência do

biocatalisador livre e imobilizado nas mais diversas formas. Portanto, é necessário fazer um estudo de qual método é mais apropriado para cada sistema de reação. [17]

Após a imobilização, o biocatalisador pode ser usado para a preparação de diversos compostos de interesse, incluindo os ésteres de aroma.

2.4. Suportes para imobilização de enzimas

Dentre os suportes mais empregados na imobilização de enzimas destacam-se os polímeros – macromoléculas formadas a partir da junção de várias moléculas menores (monômeros) – que podem ser tanto naturais quanto sintéticos. [3,12]

Os polímeros naturais como a celulose, amido, ágar e a gelatina são muito utilizados devido ao seu baixo custo e fácil degradação, enquanto que os sintéticos apresentam variedades na forma física e estrutura química. [12] O poli óxido de etileno (PEO, (1)) e o poli álcool vinílico (PVA (2)) são exemplos bastante utilizados pelo fato de serem atóxicos.

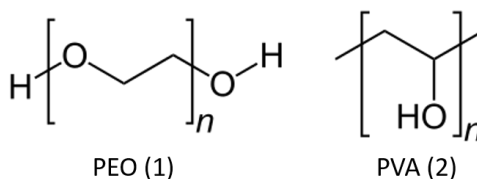


Figura 3. Estruturas químicas dos monômeros de PEO e PVA.

Os biopolímeros como a celulose, amido e colágeno são classificados como polissacarídeos – polímeros formados por dezenas, centenas ou milhares de unidades monossacarídicas conectadas por ligações glicosídicas. [3]

A celulose é o material orgânico mais abundante disponível na natureza, tendo uma produção média anual de 700 bilhões de toneladas, que pode ser extraída da madeira, do algodão e outros materiais a base de plantas, além ser sintetizada por alguns animais marinhos e microrganismos. Ela é composta por unidades de glicose ligadas por ligações β -1,4'-glicosídicas, como mostra a **Figura 4**, o que confere a celulose uma estrutura linear rígida, formando fibras com fortes ligações intermoleculares. [3,25]

Entre os suportes para enzima formados por celulose, pode-se citar a bucha vegetal.

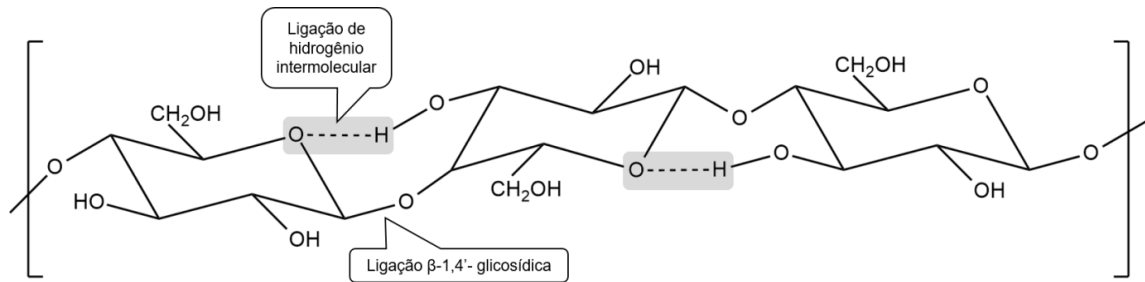


Figura 4. Estrutura da celulose, com ligações de hidrogênio intermoleculares e ligações β -1,4'-glicosídicas.

O amido é produzido por plantas superiores como forma de reserva energética e pode ser obtido de diversas fontes vegetais, como cereais, raízes, tubérculos, frutas e legumes, como mostra a **Figura 5**.^[3]



Figura 5. Exemplos de fontes vegetais de amido.

Sua estrutura granular semicristalina é constituída por uma mistura de dois polissacarídeos: amilose, formada por unidades de glicose unidas por ligações α -1,4'-glicosídicas com estrutura linear; e amilopectina, também formada por monômeros de glicose ligados por ligados por ligações α -1,4'-glicosídicas, mas com estrutura altamente ramificada através de ligações α -1,6'-glicosídicas. As estruturas da amilose e amilopectina podem ser observadas na **Figura 6**. A composição do amido varia bastante de uma fonte vegetal para outra, o que influencia na sua estrutura e propriedades físico-químicas, mas em média, o amido é composto por 20% de amilose e 80% de amilopectina.^[3,26,27]

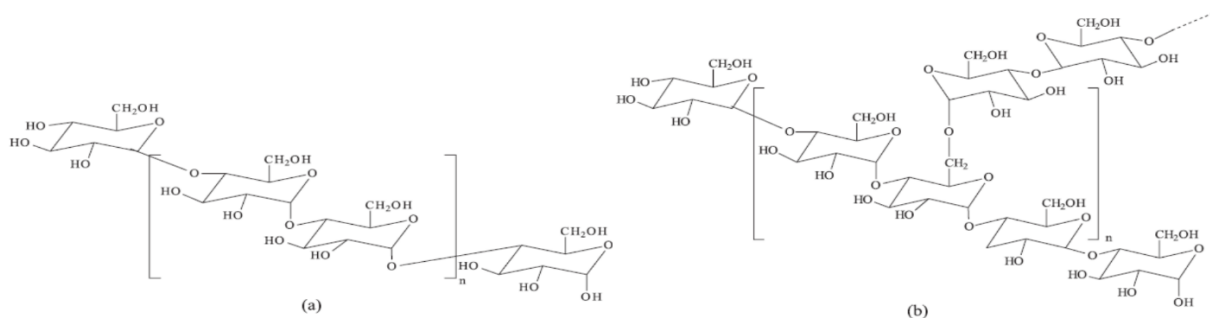


Figura 6. Estrutura química da amilose (a) e amilopectina (b).

As ligações α na amilose fazem com que ela se organize em estruturas helicoidais, como apresentado na **Figura 7**, deixando grupos OH livres para formarem ligações de hidrogênio com a água, tornando o amido solúvel em água. [3] Como suporte para imobilização de enzimas, o amido forma filmes que prendem as enzimas nas suas redes poliméricas, impedindo que elas se solubilizem no meio reacional. [28]



Figura 7. Ligações α -1,4'-glicosídicas da amilose levam a formação de uma estrutura helicoidal. [3]

O ágar também é um polímero de origem vegetal, extraído de algas marinhas, e, assim como o amido, é uma mistura de dois polissacarídeos: a agarose, um copolímero linear composto de unidades de β -1,3'-D-galactose e α -1,4'-3,6-anidro-L-galactose como mostra a **Figura 8**, e a agaropectina, cuja estrutura não é completamente estudada ainda, mas apresenta unidades de galactose e de ácido urônico sulfonados e possui estrutura ramificada. O ágar tem a capacidade de gelificar, o que o torna uma boa matéria-prima para espumas, filmes e revestimentos não prejudiciais ao meio ambiente. [29,30]

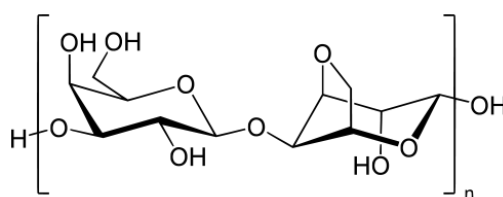


Figura 8. Estrutura de um monômero de agarose.

A gelatina é um biopolímero de origem animal, que consiste em uma mistura de proteínas, sais minerais e água. Sua estrutura, composição e propriedades variam de acordo com a sua fonte animal, uma vez que é um produto de hidrólise parcial do colágeno – uma proteína que possui 28 tipos conhecidos até o momento. De modo geral, a gelatina é composta em sua maioria pelo colágeno desnaturado, com composição de aminoácidos próxima a do colágeno que a deu origem. [31]

A gelatina possui a capacidade de gelificar, aprisionando moléculas de água na sua rede polimérica. Isso acontece porque as suas fibras formam hélices que, quando aquecidas, perdem sua conformação, abrindo a hélice. Quando resfriada, a gelatina retorna parcialmente a sua conformação original, prendendo entre as estruturas helicoidais moléculas de outros componentes que estiverem no meio, como água e enzimas, por exemplos. Dessa forma, filmes e géis de gelatina têm sido empregados largamente na indústria farmacêutica em cápsulas de remédios. [31]

2.5. Ésteres de aroma

Ésteres são moléculas orgânicas formadas por um ácido carboxílico substituído por um grupo alcóxido e estão entre os compostos mais abundantes na natureza, podendo ser encontrados tanto em animais quanto em vegetais. São encontrados, por exemplo, em gorduras, óleos e ceras, como a de abelha. [27]

Muitos ésteres apresentam odor agradáveis, e normalmente são os principais componentes dos óleos essenciais responsáveis pelos cheiros característicos de flores e frutos. Como exemplo pode-se citar o acetato de benzila (**3**), acetato de isoamila (**4**), butirato de metila (**5**) e octanoato de etila (**6**), que apresentam aromas de jasmim, banana, maçã e coco, respectivamente. As estruturas desses ésteres estão apresentadas na **Figura 9**. [3,32]

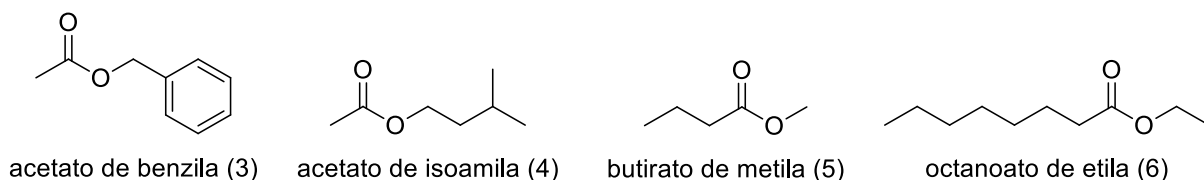


Figura 9. Estrutura química dos ésteres de aroma acetato de benzila (**3**), acetato de isoamila (**4**), butirato de metila (**5**) e octanoato de metila (**6**).

Por apresentarem muitos usos práticos, os ésteres também são muito úteis na indústria, podendo ser empregados na indústria química como solventes e

plastificantes, como o acetato de etila, e ésteres de alquila derivados de ácidos graxos, respectivamente. Também estão presentes na composição de polímeros, como, por exemplo, o éster polivinílico, dispersos em tintas; o poliéster, utilizado na fabricação de tecidos; acetato de celulose presente em filmes fotográficos; e o politereftalato de etileno, o PET, bastante usado na fabricação de embalagens. [33]

Os ésteres de aroma são amplamente empregados na fabricação de perfumes e, principalmente, utilizados como aditivos aromatizantes e flavorizantes na indústria de alimentos na produção de aromas e sabores artificiais. [33]

O método mais simples de obtenção de ésteres é a partir da reação de esterificação de Fisher, onde um ácido carboxílico sofre um ataque nucleofílico de um álcool para a formação do éster. Utiliza-se um ácido mineral como catalisador da reação. [27] Apesar de ser um sistema reacional simples, apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de excesso de um dos reagentes ou retirada de um dos produtos para deslocar o equilíbrio, o fato do ácido mineral permanecer dissolvido no meio reacional e não poder ser reutilizado, além de causar corrosão de reatores industriais e ser prejudicial ao meio ambiente, e o uso de elevadas temperaturas para a reação acontecer, mas que levam à geração de produtos de baixa qualidade. [3,27,33,34]

Devido as desvantagens da esterificação de Fisher, fez-se necessária a busca por novas formas de sintetizar ésteres para a indústria, e uma das melhores alternativas encontradas foi a síntese biocatalisada por lipases. As lipases se destacam pela sua facilidade de obtenção – origem animal, vegetal e microbiana – e sua alta estereo-, quimio- e regioseletividade, além de alta eficiência na síntese de ésteres. Assim, é possível usar reagentes em quantidades equimolares e sem a presença de ácidos minerais, seguindo os princípios da química verde. [34] Além disso, se a enzima estiver imobilizada, também é possível reutilizá-la em muitas reações, diminuindo o desperdício de reagentes. [24,27]

A partir destas considerações, neste trabalho a lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD) será imobilizada em diversos suportes e usada como biocatalisador na obtenção do octanoato de etila e acetato de isoamila.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD) em diferentes suportes que atuarão como catalisadores na preparação dos ésteres de aroma octanoato de etila e acetato de isoamila, avaliando como o suporte influencia na conversão dos produtos.

3.2. Objetivos específicos

- Preparar filmes de amido de diversas fontes vegetais (milho, gengibre, mandioca, inhame e pinhão, entre outros), de gelatina e de polímeros (PEO e PVA) na presença de agentes plastificantes, tais como sorbitol, quando necessário;
- Imobilizar a LPS-SD nos filmes poliméricos;
- Imobilizar a LPS-SD em gel de ágar e em bucha vegetal;
- Utilizar os sistemas da LPS-SD/suporte como catalisadores nas reações de formação do octanoato de etila e o acetato de isoamila;
- Avaliar a influência do suporte para a imobilização da enzima na conversão dos ésteres, mantendo constantes todos os parâmetros da reação tais como temperatura, tempo e razão molar entre os reagentes;
- Isolar e caracterizar os produtos obtidos das reações através das técnicas de ¹H-RMN e de infravermelho;
- Escolher um suporte para enzima que formou o acetato de isoamila em boa conversão e, a seguir, avaliar a influência do tempo e temperatura;
- Selecionar as melhores condições reacionais e reutilizar a LPS-SD/suporte, em ciclos consecutivos;
- Comparar os resultados obtidos com outros da literatura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes, solventes e biocatalisadores

Reagentes

- Ácido octanóico 99,5% – Vetec
- Álcool etílico absoluto P.A. 99,5% – Synth
- Poli-álcool vinílico – Vetec
- Amido de milho – Maizena
- Amidos vegetais – extraídos no laboratório de diversas fontes vegetais: gengibre, batata aipo, pinhão, inhame, mandioca e cará
- D(-)-sorbitol P.S. 99% – Vetec
- Gelatina tipo A: obtida da pele do porco – Sigma
- Poli-óxido de etileno massa molar 300 kD – Acros Organics
- β -ciclodextrina P.A. – Amaizo
- Acetato de vinila P.S. 99% – Vetec
- Álcool isoamílico P.A-ACS – Dinâmica
- Agar-agar, pó puríssimo – Isofar
- Sílica gel 60 para cromatografia em coluna (0,063 – 0,200 mm) – Vetec
- Sílica gel 60 G para cromatografia em camada fina (5 – 40 μ m) – Vetec

Solventes

- Acetato de etila P.A. – Reagen
- *n*-Hexano P.A. – Synth
- Clorofórmio P.A-ACS – Synth
- Clorofórmio deuterado (D, 99,8%) – Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

Biocatalisador

- Lipase PS “Amano” SD (LPS-SDF0551401) de *Burkholderia cepacia* (23000 U/g*) – Amano Enzyme Inc.

* Uma unidade é definida como a quantidade de lipase que libera 1,0 μ mol de ácidos graxos por minuto. Como substrato foi utilizado o óleo de oliva.

4.2. Equipamentos

- Agitador com banho termostaticado: Technal TE-0532
- Agitadores magnéticos: Dist
- Balanças analíticas: Adventurer Ohaus-AR2140 e AND-EK200i
- Espectrômetro de infravermelho: AAB Bomen FLTA 2000-100
- Espectrofotômetro de ¹H-RMN: Varian AC 400F, 400 MHz
- Rotaevaporador: R II Buchi
- Ultrassom: Thornton Unique UltraSonic Cleaner T1440

4.3. Procedimentos experimentais

4.3.1. Preparação dos suportes

4.3.1.1. Imobilização da lipase em filmes de amido

Em um béquer de 50 mL foram pesados 0,9 g de amido (de batata, cará, gengibre, inhame, mandioca, milho ou pinhão), 0,3 g de sorbitol e 0,1 g de β -ciclodextrina (β CD).^[35,36]

Os compostos sólidos foram dissolvidos em 15 mL de água destilada a temperatura ambiente em um béquer. Após ser deixado no ultrassom por seis minutos, o béquer foi aquecido a aproximadamente 70 °C e mantido sob agitação magnética até que o amido formasse um mingau. Este foi então retirado do aquecimento e resfriado sob agitação magnética.

Após resfriar a uma temperatura igual ou inferior a 35 °C, foram adicionados 30 mg de LPS-SD dissolvidos em cerca de 1,0 mL de água destilada. O sistema ficou sob agitação por mais cinco minutos para garantir a homogeneidade do meio.

A mistura amido/sorbitol/ β CD/LPS-SD foi então transferida para uma placa de petri, de modo que cobrisse toda a superfície da mesma, e colocada na capela até a completa secagem do filme.

Depois de seco, retirou-se o filme da placa de petri, cortando-o em pequenos pedaços e armazenando-o em um erlenmeyer com 20 mL de *n*-hexano, deixando-o pronto para uso nas reações de esterificação.

Um esquema de preparo dos filmes de amido está representado na **Figura 10**.

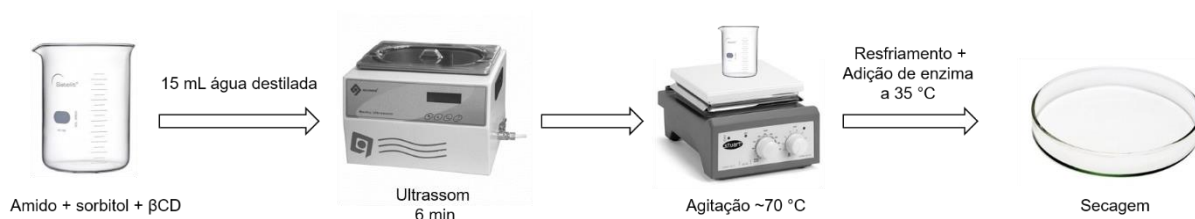


Figura 10. Preparação de filmes de amido.

O filme de amilopectina de pinhão foi preparado de maneira similar. A amilopectina foi extraída segundo procedimento descrito por McCready e Hassid [37] e doada pelo mestrando Paulo A. D. Moraes.

4.3.1.2. Imobilização da lipase em filmes de gelatina

Foram pesados 0,8 g de gelatina em um béquer de 50 mL e dissolvidos em 15 mL de água destilada a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de glicerol. [36]

O béquer foi colocado no ultrassom por seis minutos e, em seguida, aquecido sob agitação magnética até que se observasse o aumento da viscosidade da solução de gelatina. Ele foi retirado do aquecimento, deixando-o resfriar sob agitação até que alcançasse uma temperatura igual ou inferior a 35 °C.

Em seguida, foram adicionados 30 mg de LPS-SD dissolvida no mínimo de água necessário, e a solução foi agitada por mais cinco minutos para total homogeneização.

O conteúdo do béquer foi transferido para uma placa de petri, cobrindo toda a sua superfície, e a placa foi colocada na capela até a secagem total do filme.

Depois de seco, o filme foi retirado da placa de petri, cortado em pequenos pedaços e armazenado em um erlenmeyer com 20 mL de *n*-hexano, deixando-o pronto para ser usado nas reações de esterificação.

Um esquema do preparo do filme de gelatina está apresentado na **Figura 11**.

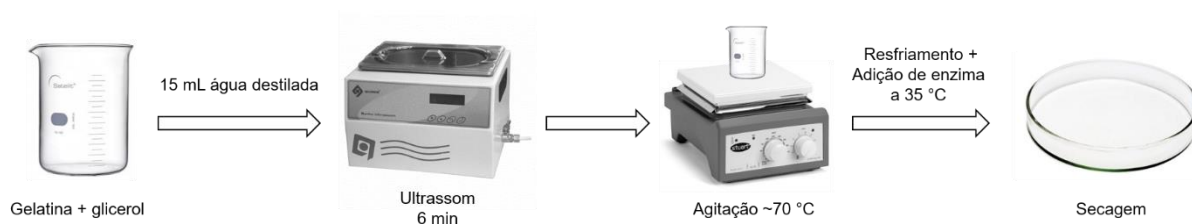


Figura 11. Preparação dos filmes de gelatina.

4.3.1.3. Imobilização da lipase em filmes de polímeros

Foram pesados 0,9 g de polímero (PEO ou PVA) e 0,15 g de sorbitol em um béquer de 50 mL, e dissolvidos em 15 mL de água destilada a temperatura ambiente. [36,38]

O béquer foi deixado no ultrassom por seis minutos e, em seguida, aquecido sob agitação magnética até que se observasse o aumento da viscosidade da solução. Retirou-se então o béquer do aquecimento, deixando-o resfriar sob agitação até que atingisse uma temperatura igual ou inferior a 35 °C.

Foram adicionados 30 mg de LPS-SD dissolvidas em cerca de 1,0 mL de água, e a solução ficou sob agitação por mais cinco minutos.

O conteúdo do béquer foi então transferido para uma placa de petri, cobrindo toda a sua superfície, que foi deixada na capela até a secagem total do filme.

Depois de seco, o filme foi retirado da placa de petri, cortado em pequenos pedaços e armazenado em um erlenmeyer com 20 mL de *n*-hexano.

Os procedimentos acima estão representados na **Figura 12**.

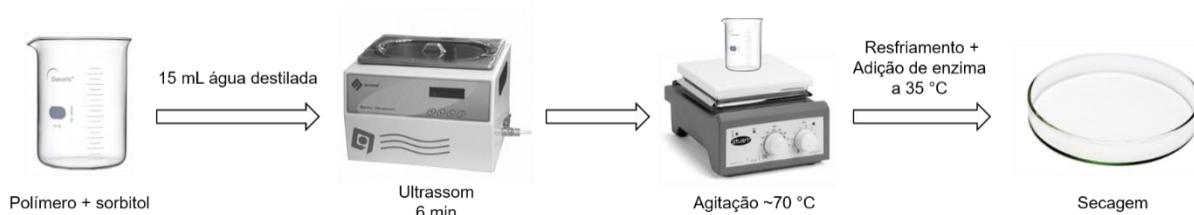


Figura 12. Preparação dos filmes de polímeros.

4.3.1.4. Imobilização da lipase gel de ágar

Em um béquer de 50 mL foram adicionados 0,4 g de ágar e 1,0 mL de água destilada a temperatura ambiente. O sistema foi colocado no ultrassom por seis minutos e, em seguida, adicionaram-se 8,0 mL de água fervente (~100 °C). A mistura foi agitada com um bastão de vidro até que se tornasse transparente. [35,36]

Quando a mistura atingiu 35 °C foram adicionados 30 mg da enzima LPS-SD dissolvidos em 2,0 mL de água destilada a temperatura ambiente, ainda sob agitação para homogeneizar bem o meio.

Depois da adição da enzima a mistura foi deixada em repouso para que gelificasse.

Após resfriar a temperatura ambiente, obteve-se um gel consistente que foi passado por uma peneira fina, coletando pequenos pedaços em um béquer.

Terminado o processo, o gel foi transferido para um erlenmeyer e coberto com *n*-hexano para uso posterior em reações de esterificação.

A **Figura 13** apresenta o processo de forma resumida.



Figura 13. Preparação do gel de ágar.

4.3.2. Imobilização da lipase em bucha vegetal

Em uma placa de petri foram pesados 0,5 g de bucha vegetal previamente lavada em uma solução de H₂O₂ por 24 horas, seca e cortada em pequenos pedaços de aproximadamente 1,0 cm³. [35,36]

Separadamente, foram pesados 30 mg da enzima LPS-SD e dissolvidos em 2,0 mL de solução tampão de fosfato de potássio (pH ~ 7,0). Essa solução foi despejada lentamente sobre a bucha vegetal, sendo espalhada igualmente por toda a superfície da bucha.

Deixou-se então a placa com a bucha coberta com solução de enzima na capela para que o solvente evaporasse e a bucha secasse. Depois de seca, a bucha foi transferida para um erlenmeyer e coberta com *n*-hexano para ser utilizada nas reações de esterificação.

4.3.3. Reações de esterificação

As reações realizadas neste trabalho foram a obtenção do octanoato de etila, característico por apresentar o aroma de coco, e a do acetato de isoamila, conhecido pelo aroma de banana.

4.3.3.1. Preparação do octanoato de etila

A reação de esterificação para a obtenção do octanoato de etila está apresentada na **Figura 14**.

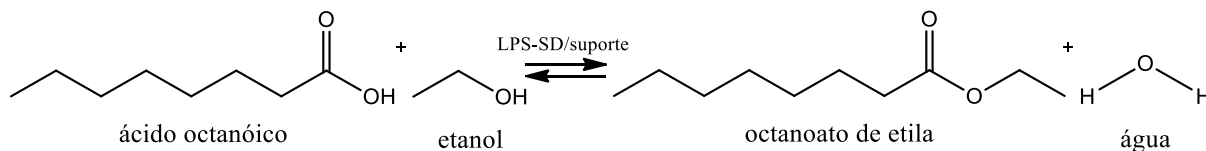


Figura 14. Reação de esterificação de ácido octanóico e etanol.

A reação de esterificação foi realizada utilizando 0,01 mol de ácido octanóico (1,26 mL) e 0,01 mol de etanol (0,58 mL), que foram adicionados ao erlenmeyer contendo a lipase imobilizada nos diversos suportes cobertos por *n*-hexano. O erlenmeyer foi colocado em banho termostaticado com agitação mecânica a uma temperatura de 35 °C por 24 h.

Para avaliar a influência dos suportes, a temperatura e o tempo de reação foram mantidos constantes em todas as reações.

Após as 24 horas de reação, ela foi retirada do banho e a fase líquida foi separada do filme sólido por decantação e estocada em um recipiente fechado. O filme foi lavado com *n*-hexano até que não apresentasse mais nenhum traço de ácido octanóico, etanol e/ou octanoato de etila. A lavagem do filme foi acompanhada por CCD (eluente acetato de etila/*n*-hexano 7:3). Enquanto a análise por CCD indicasse a presença de reagentes ou produto, o solvente de lavagem era adicionado ao estocado anteriormente e mais *n*-hexano era adicionado ao filme.

Por fim, após o filme estar completamente limpo, este era deixado em *n*-hexano puro para ser reutilizado. A solução estocada contendo os reagentes e o produto desejado foi rota-evaporada para remoção do solvente e o meio reacional concentrado foi analisado por ¹H-RMN, podendo-se então determinar a sua conversão.

No espectro de ¹H-RMN foram analisadas as integrais dos picos referentes aos hidrogênios do grupo –CH₂ vizinho a hidroxila do álcool em aproximadamente 3,50 ppm, e dos hidrogênios do grupo –CH₂ ligado ao grupo acetato, em aproximadamente 4,15 ppm. O valor de conversão em éster foi calculado a partir da **Equação 1**.

$$\text{Convers\~ao\%} = \frac{\text{integral do sinal dos hidrog\~enios metil\~enicos do \u00e9ster}}{\text{soma das integrais dos hidrog\~enios metil\~enicos do \u00e9ster e do \u00e1lcool}} \times 100 \quad \mathbf{1}$$

4.3.3.2. Preparação do acetato de isoamila

A reação de esterificação para a preparação do acetato de isoamila está apresentada na **Figura 15**.

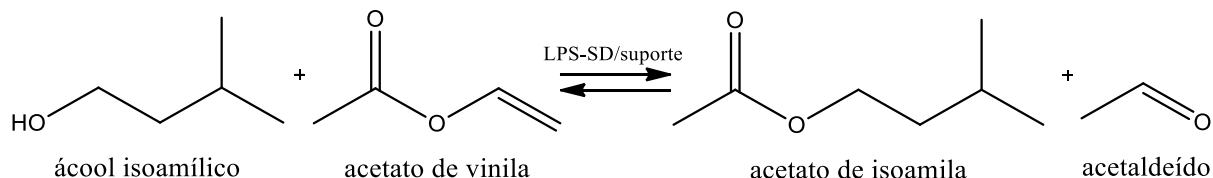


Figura 15. Reação de esterificação de álcool isoamílico e acetato de vinila.

A reação de esterificação foi realizada no erlenmeyer contendo lipase imobilizada e *n*-hexano, adicionando-se 0,01 mol de álcool isoamílico (1,10 mL) e 0,01 mol de acetato de vinila (0,930 mL). O erlenmeyer foi colocado em um banho termostatizado com agitação mecânica.

Para avaliar a influência dos suportes, a temperatura e o tempo de reação foram mantidos constantes nas primeiras reações em 35 °C e 24 h, respectivamente. Para se avaliar o efeito do tempo reacional, manteve-se a temperatura em 35 °C e o filme de amido de pinhão foi escolhido como padrão de comparação. A reação foi realizada em 6, 12, 24 e 36 horas. Para avaliar o efeito de temperatura, utilizou-se o filme de amido de pinhão como suporte da LPS-SD e a reação foi realizada em 24 h nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C.

Após o final de cada reação, ela era retirada do banho e a fase líquida era separada do suporte sólido por decantação, sendo estocada em um recipiente fechado. O suporte foi lavado com *n*-hexano até que não restasse traços de reagentes ou produto.

A lavagem do filme foi acompanhada por CCD (eluente *n*-hexano/acetato de etila 7:3) e, enquanto a análise indicasse presença de reagentes ou produto, o solvente de lavagem era adicionado ao meio reacional estocado anteriormente, e mais *n*-hexano era adicionado ao filme.

Por fim, quando o suporte estivesse completamente limpo, era deixado em *n*-hexano puro para ser reutilizado. A solução estocada contendo o produto desejado foi rotaevaporada para remoção do solvente e o meio reacional concentrado foi analisado por ¹H-RMN, podendo-se então determinar a sua conversão.

Para se calcular a conversão foi feita a mesma relação entre a integral do sinal de hidrogênios correspondente ao grupo –CH₂ vizinho ao grupo acetato do

éster e do sinal do grupo $-\text{CH}_2$ α a hidroxila do álcool que foi utilizada para calcular a conversão do octanoato de etila (**Equação 1**)

4.3.4. Isolamento e purificação do acetato de isoamila

A purificação do acetato de isoamila foi realizada através da técnica de separação e purificação em cromatografia de coluna. O empacotamento de sílica gel (40-63 μm) foi feito com clorofórmio, e foi então adicionado o produto bruto da reação de esterificação em que se utilizou como catalisador a LPS-SD imobilizada em filme de PEO, devido à alta conversão de 89%.

Como eluente da mistura, foi utilizada uma mistura de acetato de etila e *n*-hexano na proporção de 7:3. Foram coletadas oito amostras de aproximadamente 10 mL em tubos de ensaio, e todas foram analisadas por CCD. Aquelas que apresentaram o mesmo R_f (0,8) foram reunidas em um balão de fundo redondo e o solvente foi rotaevaporado.

Após obter o éster purificado, foi feita análise de infravermelho para caracterizar o produto obtido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filmes de amido, amilopectina, PEO e PVA preparados apresentaram uma aparência de plástico seco e bastante maleável. O filme de gelatina e o gel de ágar se mostraram bastante pegajosos, resultado da quantidade de água absorvida pelos biopolímeros estruturas. A bucha vegetal continuou com a mesma aparência após a imobilização da enzima.

De modo a avaliar qual a influência desses suportes para a imobilização da LPS-SD e posterior uso na preparação dos ésteres de aroma octanoato de etila e acetato de isoamila, foram feitas diversas reações. A conversão aos produtos foi utilizada como parâmetro de comparação de eficiência dos suportes.

Também foram analisadas a influência da temperatura e do tempo de reação na conversão em acetato de isoamila, utilizando a LPS-SD imobilizada em filme de amido de pinhão.

5.1. Preparação do octanoato de etila

5.1.1. Influência do suporte

Foram realizados dois conjuntos de reações de esterificação nas mesmas condições (24 h a 35 °C), com a LPS-SD imobilizada em filmes dos amidos de cará, gengibre, milho e pinhão. O primeiro conjunto de filmes foi feito em outubro de 2015, e denominado 1015; o segundo conjunto foi preparado em março de 2016 recebeu o código 0316.

Para cada conjunto de filmes foi realizada a reação de primeiro uso do suporte de enzima e o reuso. As conversões em éster, após o reuso foram determinadas por ¹H-RMN antes do solvente (*n*-hexano) ser rotaevaporado e após o solvente ser removido. Em todas as reações foi observada a formação do octanoato de etila através do espectro de ¹H-RMN.

A partir do espectro de ¹H-RMN do produto obtido nas reações e da **Equação 1** foram calculadas as conversões de cada uma das reações. O espectro de ¹H-RMN da reação utilizando filme de amido de pinhão como suporte da LPS-SD pode ser observado na **Figura 15**.

Na **Tabela 2** encontram-se os valores de conversão em octanoato de etila a 35 °C por 24 h.

Tabela 2. Valores de conversão em octanoato de etila nas reações de esterificação catalisadas pela LPS-SD imobilizada em diferentes suportes.

AMIDO	CONVERSÃO (%) (a, b)					
	1º uso	1º uso	1º reuso	1º reuso	1º reuso	1º reuso
	1015	0316	1015 (c)	0316 (c)	1015 (d)	0316 (d)
Cará	40	>99	86	>99	>99	>99
Gengibre	76	>99	58	>99	>99	>99
Milho	61	>99	71	57	>99	>99
Pinhão	58	97	>99	97	>99	>99

(a) Condições reacionais: ácido octanóico (0,01 mol), etanol (0,01 mol), 24 h, 35 °C; (b) Conversão determinada por ¹H-RMN. (c) análise feita antes de retirar o solvente por rotaevaporação e (d) análise feita depois de rotaevaporar.

A primeira reação com os filmes 1015 resultou em conversões satisfatórias (>40%). No entanto, a primeira série de reações de esterificação com os filmes 0316 apresentou conversões a octanoato de etila muito superiores às reações 1015, sendo todas >97%, como se pode observar na **Tabela 2**.

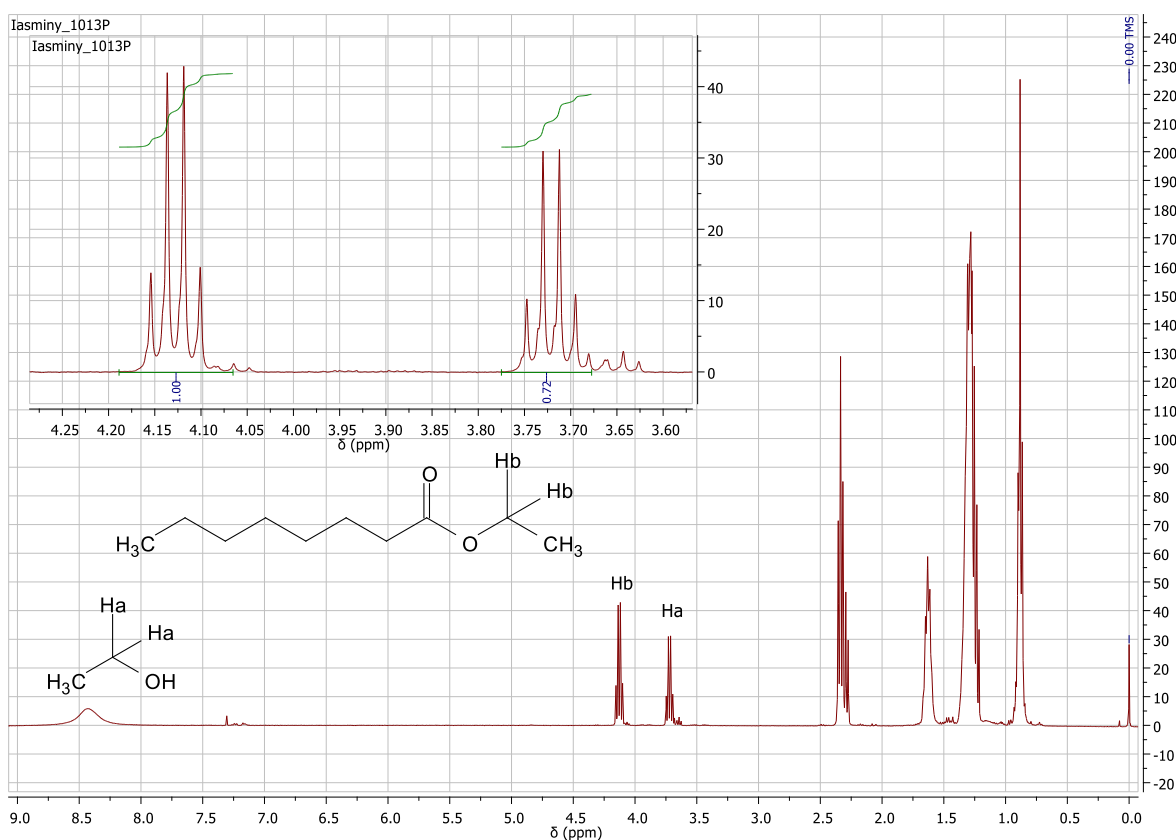


Figura 16. Espectro de ¹H-RMN do produto da reação de preparação do octanoato de etila feita com LPS-SD imobilizada em filme de amido de pinhão (400 MHz, CDCl₃). Conversão de 58%.

Considerando que em outubro a temperatura ambiente estava mais amena, (~25 °C) e, em março, o termômetro chegou a marcar temperaturas superiores a 40 °C durante o dia, foi levantada a hipótese de que o etanol (P.E. 78,37 °C) estaria volatilizando com muito mais facilidade nas reações feitas no verão.

Provavelmente, o etanol evaporou durante as reações, quando estava estocado para limpeza dos filmes, e principalmente, no rotaevaporador. Assim, a conversão calculada não era confiável, já que não refletia a real proporção de etanol consumido na reação, e, portanto, a conversão em éster.

Para comprovar a hipótese, fez-se um teste após a realização do reuso dos filmes 1015 e 0316. Foi retirada uma alíquota do meio reacional antes de rotaevaporar o solvente (1015 (c) e 0316 (c)) e outra depois de rotaevaporar o solvente (1015 (d) e 0316 (d)). As duas amostras foram analisadas pelo espectro de ¹H-RMN. Observou-se que as amostras rotaevaporadas apresentaram conversões maiores do que aquelas que não tiveram o solvente removido (ver dados na **Tabela 2**). Portanto, a preparação deste éster não foi realizada com todos os suportes planejados inicialmente.

Por este motivo, e para assegurar a validade dos resultados, decidiu-se preparar outro éster a partir de reagentes menos voláteis, como o álcool isoamílico, que possui ponto de ebulição 131,1 °C. Assim, o éster de aroma da banana, o acetato de isoamila, foi escolhido para dar continuidade aos estudos das reações com a LPS-SD imobilizada em todos os suportes citados anteriormente.

5.2. Preparação do acetato de isoamila

O acetato de isoamila foi preparado nas mesmas condições do octanoato de etila (24 h e 35 °C), utilizando LPS-SD imobilizada em diversos suportes poliméricos para se analisar a influência destes na conversão da reação (itens **5.2.1.** e **5.2.2.**).

Em seguida, foi escolhido o filme de amido de pinhão como suporte padrão para avaliar a influência de temperatura e tempo de reação na conversão dos reagentes em acetato de isoamila (itens **5.2.3.** e **5.2.4.**).

5.2.1. Influência do suporte

Neste estudo, utilizou-se a LPS-SD imobilizada em filmes de amido de batata, cará, gengibre, inhame, mandioca, milho e pinhão e de amilopectina do amido de pinhão. Foram também usados filmes de gelatina, PEO e PVA, gel de ágar e bucha vegetal como suportes.

A **Figura 16** apresenta o espectro de H^1 -RMN do produto da reação com a lipase imobilizada em filme de amido de cará.

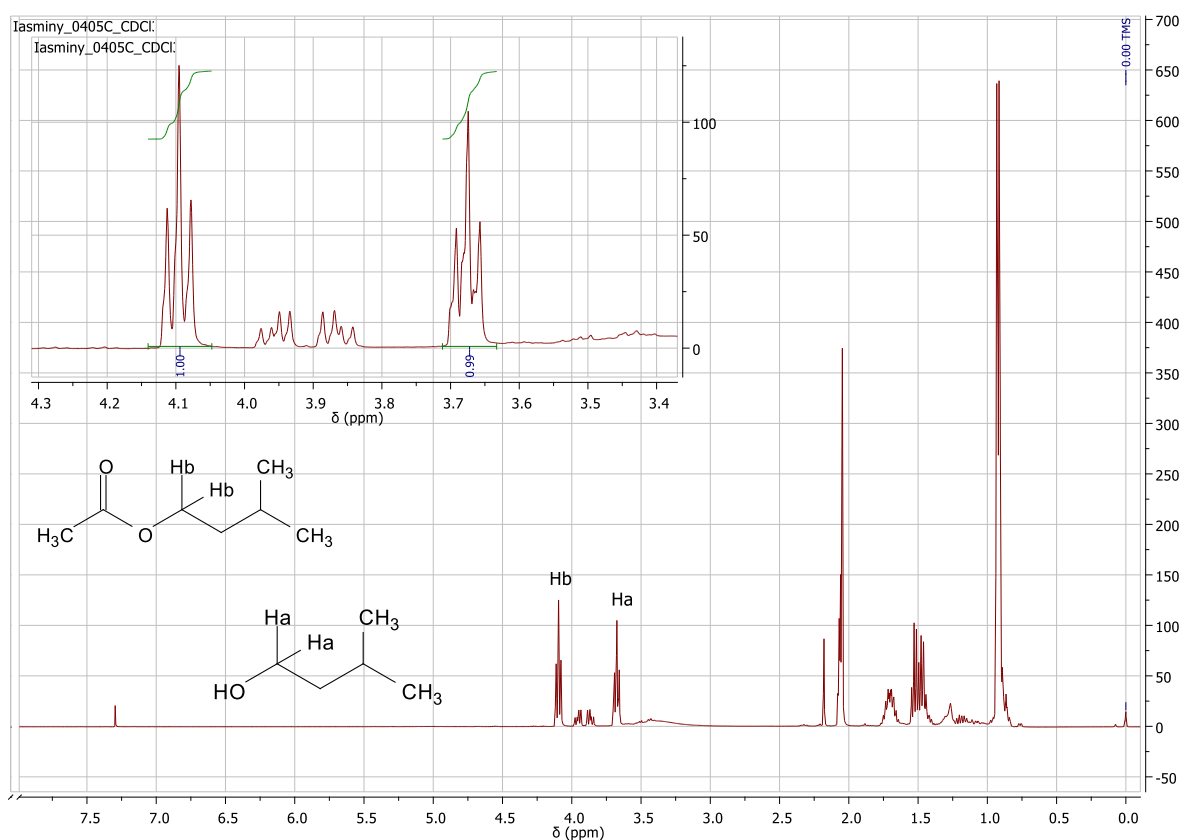


Figura 17. Espectro de 1H -RMN do produto da reação de preparação do acetato de isoamila feita com LPS-SD imobilizada em filme de amido de cará (400 MHz, $CDCl_3$). Conversão de 50%.

As reações foram realizadas durante 24 h a uma temperatura constante de 35 °C, e os valores de conversão das reações, que foram calculados a partir do espectro de H^1 -RMN utilizando a **Equação 1**, estão apresentados na **Figura 17**.

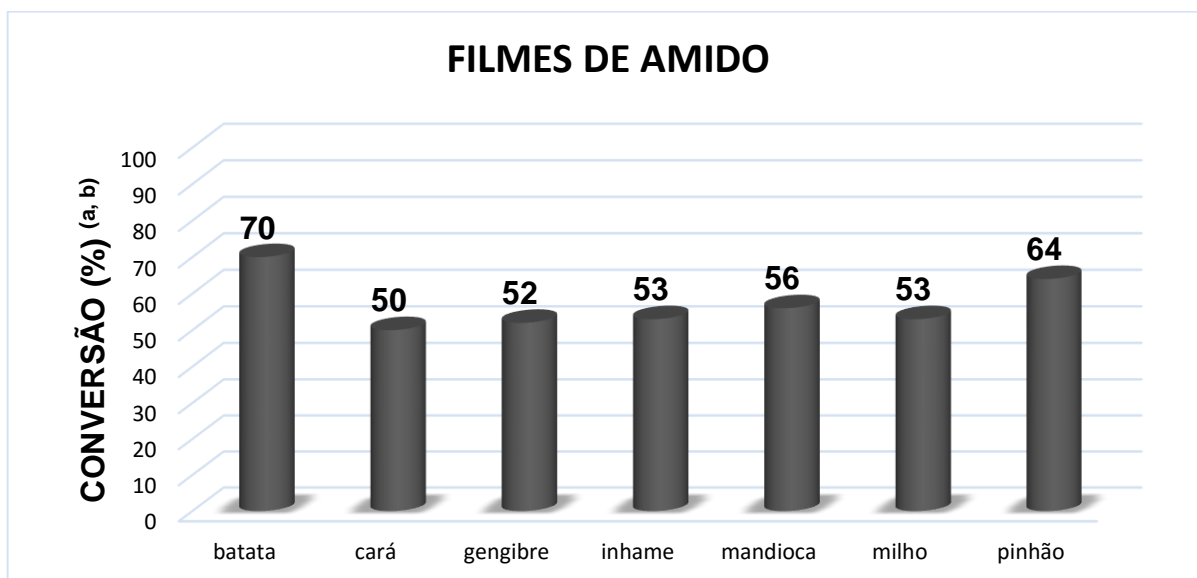


Figura 18. Valores de conversão em acetato de isoamila obtidos nas reações de esterificação catalisada pela LPS-SD imobilizada em filmes de diversos amidos. (a) Condições reacionais: acetato de vinila (0,01 mol), álcool isoamílico (0,01 mol), 24 h, 35 °C; (b) Conversão determinada por ¹H-RMN.

Ao utilizar a LPS-SD imobilizada em filmes de amido, as conversões variaram de 50 a 70%, não sendo observadas mudanças significativas, em especial ao usar os amidos de cará, gengibre, inhame, mandioca e milho (50-56%)

Como o amido é uma mistura de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, utilizou-se uma amostra de amilopectina pura extraída do pinhão para fazer um filme e imobilizar a LPS-SD. Como pode ser observado na **Tabela 3**, a conversão obtida na reação de esterificação ao usar este suporte foi de 57%, sendo similar aos valores obtidos com a LPS-SD imobilizada nos outros filmes de amido.

Tabela 3. Valores de conversão em acetato de isoamila nas reações de esterificação catalisada pela LPS-SD imobilizada em diferentes suportes.

CONVERSÃO (%) (a, b)					
FILMES DIVERSOS				OUTROS SUPORTES	
PEO	PVA	Amilopectina do pinhão	Gelatina	Gel de ágar	Bucha vegetal
89	48	57	31	8	81

(a) Condições reacionais: acetato de vinila (0,01 mol), álcool isoamílico (0,01 mol), 24 h, 35 °C; (b) Conversão determinada por ¹H-RMN.

Apesar dos amidos de diferentes fontes vegetais apresentarem composições diferentes de amilose e amilopectina, elas não diferiram muito uma da outra, uma vez que as conversões foram similares.

Ao se utilizar filmes de PEO, PVA e gelatina, as reações apresentaram valores muito distintos (31-89%). A maior conversão, de 89%, foi obtida ao utilizar LPS-SD imobilizada em filme de PEO. Resultados semelhantes foram obtidos na esterificação do ácido láurico com *n*-pentanol em *n*-hexano usando PSL imobilizada em filme de PEO (94% a 35 °C).^[38] Blendas de PEO e amido de gengibre também foram utilizadas como imobilizadores de LBC na esterificação do (*R,S*)-1-feniletanol com acetato de vinila em *n*-hexano (28 °C, 24 h), e um aumento de conversão ao (*R*)-éster de 14 para 25% foi observado com o aumento da proporção de PEO no filme polimérico de 0 para 90%, sendo que com PEO a conversão foi de 56%. Estes dados mostram a efetividade dos filmes de PEO como suportes para as lipases nas reações de esterificação. Acredita-se que o bom desempenho dele se deve a alta porosidade dos filmes, que deve facilitar a difusão de reagentes e produtos, favorecendo a ação da enzima.^[28]

A reação de esterificação com filme de PVA (48%) apresentou resultado similar àquela obtida com a LPS-SD imobilizada em filmes de amido (48%), e a reação com a lipase em filme de gelatina apresentou conversão de 31%, bem abaixo da média dos valores obtidos em outras reações.

A reação feita utilizando LPS-SD imobilizada em gel de ágar apresentou apenas 8% de conversão ao acetato de isoamila, sendo o menor valor de todos. Este resultado já havia sido observado na formação do acetato de 1-octila e do octanoato de *n*-pentila em trabalhos anteriores. Acredita-se que este resultado é devido à grande quantidade de água presente no gel (81% m/m determinado por titulação Karl-Fisher), o que pode dificultar ou ainda inibir a difusão de reagentes e produtos mais lipofílicos até a enzima para que ocorra a catálise e depois retorne ao meio reacional.^[35,36]

O suporte de bucha vegetal utilizado na reação a conversão em éster foi de 81%, maior que todos os filmes de amido e próxima à da reação com filme de PEO. O sistema LBC/bucha foi utilizado também em outros trabalhos, como

transesterificação do acetato de vinila com 1-octanol em *n*-hexano, e o resultado obtido foi de 84% de conversão (25 °C e 24 h), sendo o melhor suporte utilizado para essa reação. [35]

A partir dos resultados obtidos no primeiro uso dos suportes na reação de formação do acetato de isoamila, foram escolhidos os três melhores filmes entre os amidos (batata, pinhão e inhame), o pior deles (amido de cará), e todos os suportes citados na **Tabela 3**, exceto a bucha vegetal, para se realizar o estudo de reuso.

5.2.2. Reuso dos suportes

Após a escolha de quais suportes seriam utilizados para avaliar a possibilidade do reuso, a primeira reação foi feita nas mesmas condições das reações anteriores, ou seja 35 °C por 24 h, e 0,01 mol de cada reagente. Os valores de conversão foram obtidos através do espectro de ¹H-RMN e estão apresentados na **Tabela 4**. O espectro de ¹H-RMN do produto obtido ao usar a LPS-SD/PEO está apresentado na **Figura 19**.

Tabela 4. Valores de conversão em acetato de isoamila nas reações de esterificação catalisadas pela LPS-SD em diferentes reusos dos suportes.

SUPPORTES	CONVERSÃO (%) (a, b)		
	1° uso	1° reuso	2° reuso
Filme de amido de batata	70	44	-
Filme de amido de cará	50	45	19
Filme de amido de inhame	53	36	18
Filme de amido de pinhão	64	64	46
Filme de amilopectina do pinhão	57	49	41
Filme de PEO	89	84	76
Filme de PVA	48	41	35
Filme de gelatina	31	19	-
Gel de ágar	8	<1	-

(a) Condições reacionais: acetato de vinila (0,01 mol), álcool isoamílico (0,01 mol), 24 h, 35 °C; (b) Conversão determinada por ¹H-RMN.

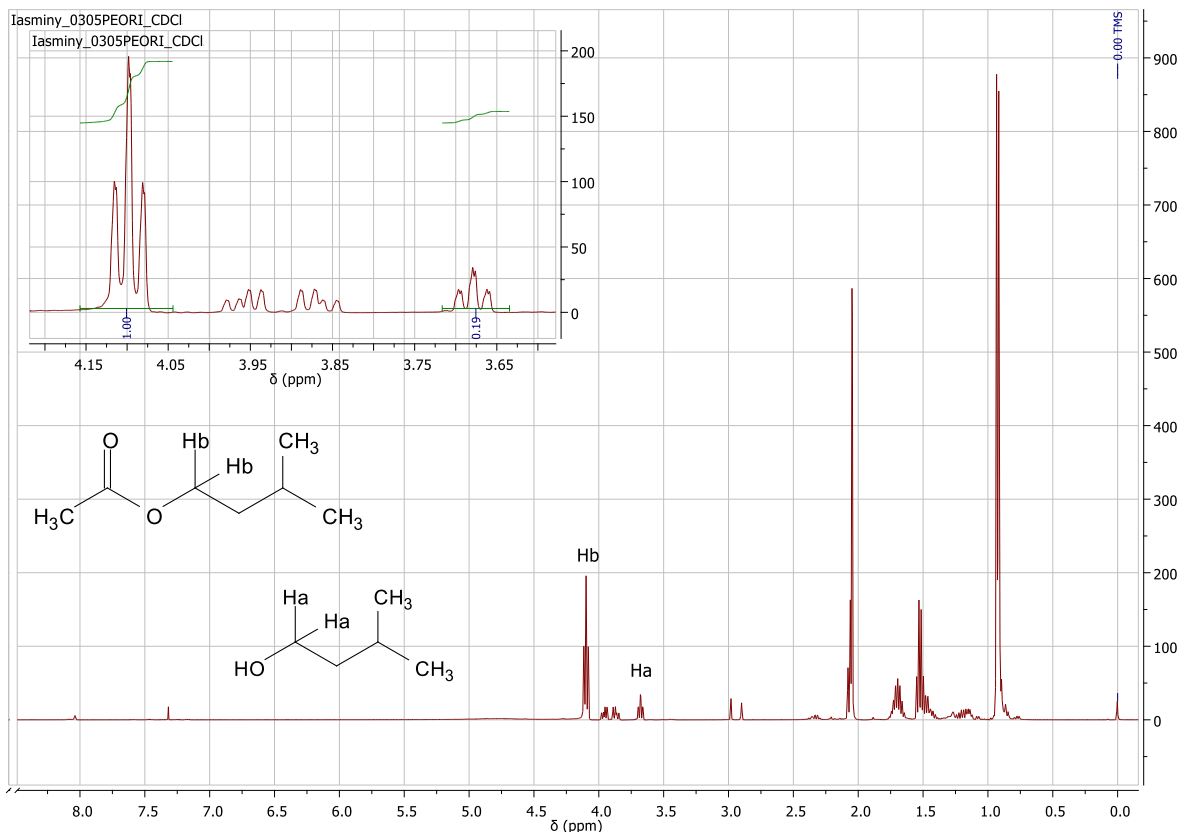


Figura 19. Espectro de ^1H -RMN do produto da reação de preparação do acetato de isoamila feita com LPS-SD imobilizada em filme de PEO (400 MHz, CDCl_3). Conversão de 84%.

Conforme citado na **Tabela 4**, todas as reações apresentaram queda na conversão quando se fez o primeiro reuso, exceto com filme de amido de pinhão, que manteve o mesmo valor. Algumas apresentaram uma pequena queda de conversão (menor que 10%), como com os filmes de amido de cará, de amilopectina do pinhão, de PEO e de PVA.

Outras, como as com os filmes de amido de batata e inhame e com o filme de gelatina apresentaram uma queda muito maior nos valores de conversão. A esterificação com gel de ágar já havia apresentado baixa conversão na primeira reação e, ao fazer o reuso, obteve-se um valor menor do que 1%.

Nas primeiras reações utilizando como suportes para LPS-SD o filme de gelatina e o gel de ágar, os valores de conversão em (4) já haviam sido muito baixos e, ao se fazer o primeiro reuso, os valores obtidos foram ainda menores (19% e <1%). Dessa forma, não foi realizado o segundo reuso com esses sistemas. Como a esterificação com a LPS-SD imobilizada em filme de amido de batata apresentou

uma queda de mais de 25% na conversão, também não foi feito o segundo reuso com esse filme.

No segundo reuso do filme de PEO, a reação continuou apresentando um valor bastante satisfatório de 76% conversão. A esterificação utilizando LPS-SD imobilizada em filme de amido de pinhão caiu de 64 para 46%.

As catálises com os filmes de PVA e amilopectina de pinhão continuaram apresentando pequenas quedas em relação as reações anteriores, mas com valores não tão bons (35 e 41%, respectivamente) quanto com os filmes de PEO e amido de pinhão. Nas reações de esterificação utilizando os filmes de amido de cará e inhame, o éster foi obtido com conversão menor do que 20% no segundo reuso.

De forma geral, a reação usando filme de PEO apresentou o melhor resultado dentre todos os suportes analisados, como já era previsto. Estudos anteriores com filmes de PEO, como o de Hoffmann *et al* mostraram que foi observada a variação de 26 para 16% de conversão durante seis usos do catalisador na esterificação enantiosseletiva do (*R,S*)-1-feniletanol. [28]

O segundo melhor desempenho foi obtido ao se utilizar o filme de amido de pinhão, que manteve constante os valores de conversão das duas primeiras reações (64%), enquanto que a terceira não apresentou uma queda tão brusca em relação as outras (46%).

Os outros suportes estudados não apresentaram bom desempenho no teste de reuso.

Sabendo quais os melhores suportes para imobilização da LPS-SD na preparação do acetato de isoamila, o filme de amido de pinhão foi o escolhido para se fazer as análises de temperatura e tempo de reação.

5.2.3. Influência da temperatura

Apesar do filme de PEO ter apresentado resultados excelentes nos estudos de uso e reuso nas reações de esterificação, o filme de amido de pinhão foi o escolhido para dar continuidade nos estudos de temperatura e tempo de reação, uma vez que também apresentou desempenho bastante satisfatório quando utilizado como suporte do catalisador na preparação do acetato de isoamila. Esta escolha

baseou-se no fato de que este é um polímero natural biodegradável, de fonte vegetal renovável, e que não apresenta toxicidade, além de ter um custo de obtenção muito menor do que o valor comercial do PEO, estando então de acordo com os princípios da química verde.

Para o estudo de temperatura, foram preparados filmes com o amido de pinhão com enzima LPS-SD da mesma forma que os demais filmes. As reações de esterificação foram feitas com as mesmas quantidades de reagentes – 0,01 mol de álcool isoamílico e 0,01 mol de acetato de vinila – e o tempo de reação foi mantido por 24 h. Sendo assim, a única condição de reação modificada foi a temperatura. Foram realizadas reações em três temperaturas diferentes, sendo de 25, 35 e 45 °C.

Os valores de conversão em acetato de isoamila podem ser observados na **Figura 20**.

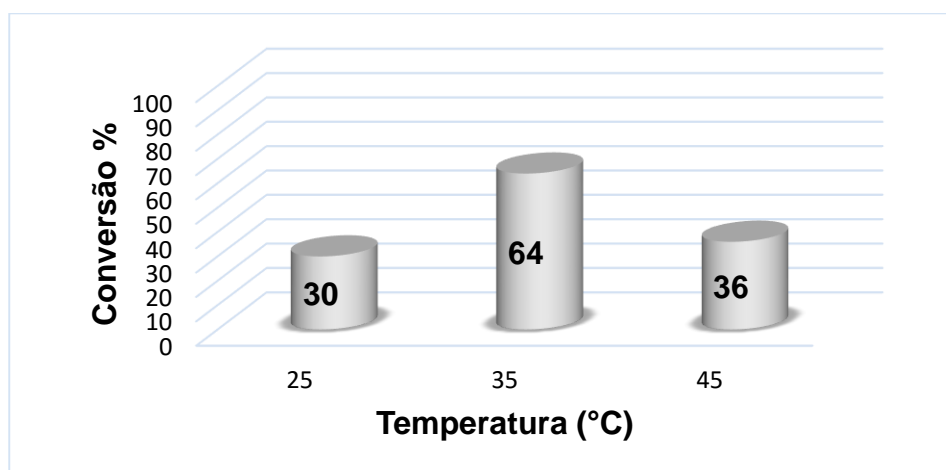


Figura 20. Valores de conversão em acetato de isoamila nas reações de esterificação catalisadas pela LPS-SD imobilizada em filmes de amido de pinhão nas temperaturas de 25, 25 e 45 °C. (a) Condições reacionais: acetato de vinila (0,01 mol), álcool isoamílico (0,01 mol), 24 h; (b) Conversão determinada por ¹H-RMN.

Ao se fazer a reação em 25 °C, a conversão obtida foi de 30%, em 35 °C o valor foi de 64%, bem maior que o anterior. Ao se fazer em uma temperatura maior, 45 °C, o resultado foi 36%, bem menor do que em 35 °C. Dessa forma, foi observado que a temperatura mais adequada para esta reação é de 35 °C.

O mesmo perfil foi observado na epoxidação do β-cariofileno utilizando a lipase F-AP15 imobilizada em gel de ágar, onde a conversão ao produto aumentou até 35 °C e depois começou a diminuir. [39]

Em temperaturas mais elevadas, o processo de desnaturação da enzima é acelerado porque a energia desse processo se torna menor do que a energia de ativação da enzima, de modo que sua eficiência diminui o que justifica os resultados obtidos na conversão do acetato de isoamila. Outro fator importante é a decomposição do acetato de vinila a acetaldeído, que é facilitada em altas temperaturas. [21,39]

Considerando então a temperatura de 35 °C como a temperatura ideal para a preparação do acetato de isoamila com LPS-SD imobilizada em filme de amido de pinhão, foi então realizado o estudo da influência do tempo na conversão da reação.

5.2.4. Influência do tempo

Para o estudo de tempo, também foi utilizado filme de amido de pinhão como suporte para a enzima LPS-SD pelos mesmos motivos citados anteriormente. A reação foi realizada a 35 °C no banho termostatizado com 0,01 mol de álcool isoamílico e 0,01 mol de acetato de vinila como reagentes. O tempo de reação foi então variado, sendo que as reações foram feitas em 6, 12, 24 e 36 h. As conversões em acetato de isoamila podem ser observadas na **Figura 21**.

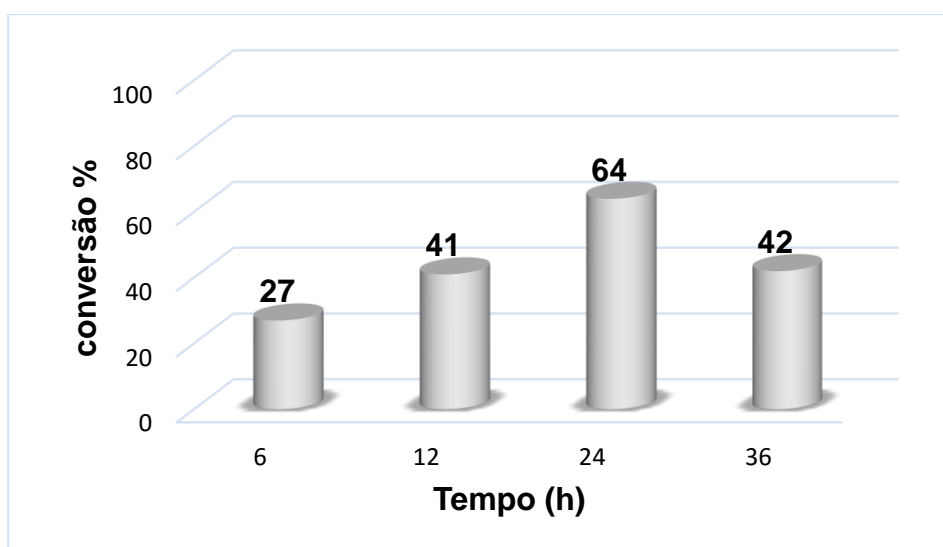


Figura 21. Valores de conversão em acetato de isoamila nas reações de esterificação catalisadas pela LPS-SD imobilizada em filmes de amido de pinhão por 6, 12, 24 e 36 h. (a) Condições reacionais: acetato de vinila (0,01 mol), álcool isoamílico (0,01 mol), 35 °C; (b) Conversão determinada por ¹H-RMN.

Ao se observar os resultados do estudo tempo, notou-se uma conversão crescente de 6 a 24 horas (27 a 64%). Entretanto, na reação feita em 36 h, foi observada uma queda considerável na conversão do produto, sendo de 42%.

Nas reações de transesterificação com ésteres de vinila ocorre a liberação de acetaldéido, que pode se ligar a enzima e desativá-la, o que pode justificar a diminuição da conversão do éster em tempo maior que 24 h. [21]

Para caracterizar o éster, também foi feita análise por espectroscopia de infravermelho.

5.2.5. Isolamento e caracterização do produto

O isolamento do produto foi feito através da técnica de cromatografia de coluna (ver item 4.3.4.). A seguir, foi realizado o espectro de infravermelho do produto purificado para a comprovação do produto obtido (**Figura 21**).

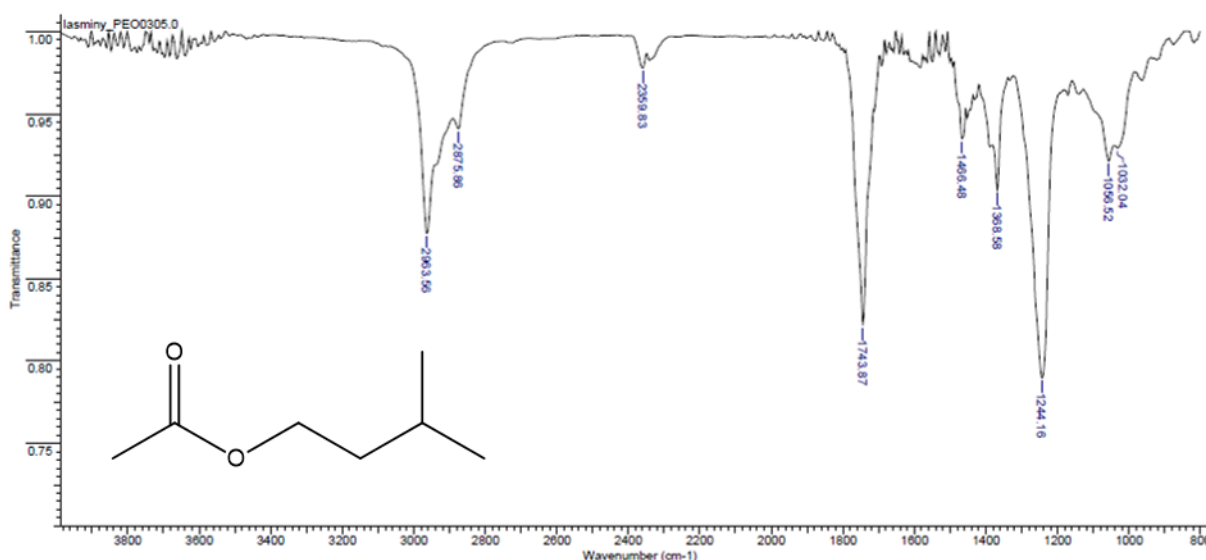


Figura 22. Espectro de infravermelho do acetato de isoamila (KBr).

Entre 2800 e 3000 cm^{-1} foi observado a banda de intensidade média correspondente a absorções das ligações C-H da cadeia alifática, em 1743 cm^{-1} pode-se observar a banda estreita e de forte intensidade característica de carbonilas de éster. Em 1244 cm^{-1} , observa-se a banda estreita e intensa que é associada ao estiramento da ligação C-O, também típico de éster. Estes valores, são concordantes com os reportados na literatura. [40]

Com esta análise, foi possível comprovar a obtenção do acetato de isoamila como produto da reação e que ele estava realmente puro.

CONCLUSÕES

Os suportes para imobilização da LPS-SD foram preparados apropriadamente, de modo que puderam ser utilizados como catalisadores nas reações de preparação dos ésteres de aroma octanoato de etila e acetato de isoamila.

Na reação de esterificação do octanoato de etila com etanol, inicialmente acreditou-se que as conversões eram satisfatórias, apresentando valores de 40 a 76%, dependendo do filme de amido utilizado. Entretanto, foi constatado os resultados obtidos não eram tão confiáveis devido à volatilidade do etanol.

O acetato de isoamila, foi obtido com conversões bastante variáveis de acordo com o tipo de suporte.

Ao se usar o filme de PEO e gel de ágar como suportes, as conversões em acetato de isoamila foram de 89 e 8%, respectivamente.

Ao usar os s filmes de amido, amilopectina e PVA, as conversões em éster foram 40 - 60%, o que pode ser considerado como moderados.

Devido ao fato do amido de pinhão ser um polímero natural biodegradável, atóxico, de fonte renovável e baixo custo comercial, ele foi o escolhido para servir de suporte para as enzimas LPS-SD nos estudos de tempo e temperatura.

As melhores condições para a preparação do acetato de isoamila utilizando LPS-SD imobilizada em filme de amido de pinhão foram 35 °C e 24 h, formando o éster em 64% de conversão.

Tais informações são importantes para um possível aprimoramento do sistema com objetivo de futura aplicação do mesmo na indústria, focando na preparação do acetato de isoamila respeitando os princípios da química verde.

Salienta-se que os suportes usados, em sua maioria, são de fontes vegetais, renováveis e de baixo custo estando de acordo com alguns princípios da química verde.

Os resultados obtidos mostraram que a escolha do suporte para a lipase deve ser cuidadosamente avaliada para cada enzima e reação estudada.

6. REFERÊNCIAS

1. FECHETE, I. The past, present and future of heterogeneous catalysis. **Catalysis Today**, v. 189, n. 1, p. 2-27, 2012.
2. MCQUARRIE, D. A. **Physical chemistry: a molecular approach**. 1ª. ed. Sausalito: University Science Books, 1997.
3. BRUICE, P. Y. **Organic Chemistry**. 4ª. ed. New Jersey: Pearson, 2004.
4. CUNHA, A. C.; FERREIRA, V. F.; DIAS, F. R. F. An overview of the different types of catalysts in organic synthesis. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, 2012.
5. SHELDON, R. A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, p. 1437-1451, 2012. ISSN 10.1039/c1cs15219j.
6. OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.
7. VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e aceptores. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 95-102, 2005.
8. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6ª. ed. New York: Freeman, 2013.
9. SHELDON, R. A. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 6223-6235, 2013. ISSN 10.1039/c3cs60075k.
10. BEILEN, J. B. V.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 338-344, 2002.
11. SHARMA, R.; CHISTI, Y. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.
12. MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 821-840, 2011.

13. CARVALHO, P. D. O. et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.
14. TSAI, S.-W. Enantioference of *Candida antarctica* lipase B toward carboxylic acids: Substrate models and enantioselectivity thereof. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 98-116, 2014.
15. STERGIOU, P.-Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1846-1859, 2013.
16. COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. D. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863-873, 1999.
17. CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262, 2013.
18. KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.
19. MANOEL, E. A. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53-57, 2015.
20. MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.
21. FABER, K. **Biotransformation in organic chemistry: a textbook**. 6^a. ed. Berlin: Springer, 2011.
22. BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639-1650, 2009.
23. NASCIMENTO, M. D. G.; DALLA-VECCHIA, R.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630,

- 2004.
24. MILNER, S. E.; MAGUIRE, A. R. Recent trends in whole cell and isolated enzymes in enantioselectivity synthesis. **Arkivoc**, v. 2012, n. 1, p. 321, 2012.
 25. XU, Q. et al. A facile route to prepare cellulose-based films. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 274-281, 2016.
 26. MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137-156, 2010.
 27. MCMURRY, J. **Organic Chemistry**. 7^a. ed. Belmont: Cengage Brooks, 2010.
 28. HOFFMANN, I.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. D. G. Enantioselective Resolution of (R,S)-1-Phenylethanol Catalyzed by Lipases Immobilized in Starch Films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1559-1567, 2011.
 29. SHARMA, M.; SHARMA, V.; MAJUMDAR, D. K. Entrapment of α -amilase in agar beads for biocatalysis of macromolecular substrate. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 1-8, 2014.
 30. RHIM, J.-W.; LEE, S.-B.; HONG, S.-I. Preparation and characterization of agar/clay nanocomposite films: The effect of clay type. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p. N40-N48, 2011.
 31. DUCONSEILLE, A. et al. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 360-376, 2015.
 32. SANTOS, J. E. R. et al. Analysis of volatile organic compounds in virgin coconut oil and their sensory attributes. **Philippine Journal of Science**, v. 140, n. 2, p. 161-171, 2011.
 33. OLIVEIRA, C. A. et al. Synthesis of fruit flavor esters: an experiment for undergraduate courses within one of the principles of green chemistry. **Revista**

Virtual de Química, v. 6, n. 1, 2014.

34. KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1793-1806, 2015.
35. NASCIMENTO, M. D. G. et al. The use of organic solvents/ionic liquids mixtures in reactions catalyzed by lipases from *Burkholderia cepacia* immobilized in different supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 1-8, 2015.
36. SILVA, J. C. D.; NASCIMENTO, M. D. G. The influence of organic medium and supports in the resolution of (R,S)-menthol catalyzed by lipases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p. 1-8, 2016.
37. MCCREADY, R. M.; HASSID, W. Z. The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato starch. **Journal of American Chemical Society**, v. 65, n. 6, p. 1154-1157, 1943.
38. CRESPO, J. D. S. et al. The use of lipases immobilized on poly(ethylene oxide) for the preparation of alkyl esters. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 401-409, 2005.
39. SILVA, J. M. R. D.; NASCIMENTO, M. D. G. Epoxidação do β -cariofileno com lipases imobilizadas em gel de ágar. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 1022-1027, 2014.
40. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, R. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
41. SHELDON, R. A. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Review**, v. 42, p. 6223-6235, 2013. ISSN 10.1039/c3cs60075k.
42. SHELDON, R. A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. **Chemical Society Review**, v. 41, p. 1437-1451, 2012. ISSN 10.1039/c1cs15219j.

