

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Estudo Cinético da Síntese do Octanoato de *n*-Pentila Catalisada
pela Enzima Lipozyme TL IM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Agenor Furigo Junior, D.Sc.

EVERTON SKORONSKI

Florianópolis, 2006

**Estudo Cinético da Síntese do Octanoato de *n*-Pentila Catalisada
pela Enzima Lipozyme TL IM**

Por

EVERTON SKORONSKI

Dissertação julgada para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Agenor Furigo Junior, D.Sc.

Orientador e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química

Banca Examinadora:

Prof. Agenor Furigo Junior, D.Sc. – Presidente (EQA-UFSC)

Prof. Dile Pontarolo Stremel, D.Sc. – Membro Externo (EQM-UNISUL)

Prof. Luismar Marques Porto, Ph.D. - Membro Interno (EQA-UFSC)

Florianópolis, 09 de Fevereiro de 2006

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e aos meus pais, Irmo Hintz Skoronski (*in memorian*) e Letícia Wernke Skoronski por contribuir hora de forma direta, hora de forma indireta, na minha formação social e acadêmica.

Ao professor Agenor Furigo Júnior pela orientação, compreensão e incentivo na realização desse trabalho.

Ao professor Jair Juarez João (UNISUL), por permitir que grande parte do trabalho pudesse ter sido realizada nas dependências do CENTEC-UNISUL, por orientar na realização das análises quantitativas e qualitativas do trabalho, além do incentivo e amizade demonstrada ao longo do tempo.

Aos alunos de iniciação científica do curso de Engenharia Química da UNISUL Samuel Bucco e Thiago Medeiros Bonetti, por auxiliar na execução dos experimentos.

À professora Erly Perine Popoaski, Diretora do Colégio Dehon de Tubarão, pela amizade e amor materno e por ter oferecido a minha primeira oportunidade profissional, garantindo meus custeios durante o curso de mestrado.

À NOVOZYMES, por fornecer a enzima, à empresa INQUIL, por fornecer uma bolsa de mestrado durante 12 meses.

Aos professores Luismar Marques Porto e Dile Pontarolo Stremel pela disposição em fazer parte da banca examinadora.

Enfim, à minha família e à minha namorada Vanessa de Souza Inácio, pelo companheirismo, compreensão e força em todos os momentos.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	ix
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Enzimas.....	5
3.1.1. Considerações iniciais.....	5
3.1.2. Mecanismo de atuação das enzimas	6
3.1.3. Fatores que influenciam a atuação das enzimas.....	9
3.1.4. Imobilização enzimática	12
3.2. Ésteres	17
3.2.1. Definição e propriedades físicas.....	17
3.2.2. Principais aplicações dos ésteres.....	18
3.2.3. Obtenção dos ésteres	22
3.3. Modelos cinéticos para reações enzimáticas	31
3.3.1. Equação de Michaelis e Mentem.....	32
3.3.2. Modelos envolvendo Inibição	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Material.....	41
4.1.1. Reagentes utilizados na síntese.....	41
4.1.2. Reagentes utilizados nas análises de titulação volumétrica.....	41
4.1.3. Reagentes empregados na análise de FTIR.....	42
4.1.4. Enzima utilizada nas sínteses	42

4.1.5. Equipamentos utilizados para as sínteses	42
4.1.6. Equipamento utilizado para a determinação da concentração de ácido octanóico	43
4.1.7. Equipamento utilizado para a caracterização do éster	44
4.2. Métodos.....	44
4.2.1. Preparação do meio reacional.....	44
4.2.2. Determinação do grau de avanço da reação.....	45
4.2.3. Caracterização do éster	46
4.2.4. Avaliação da capacidade de reutilização do catalisador	47
4.2.5. Determinação das velocidades iniciais.....	47
4.2.6. Ajuste de modelos cinéticos	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1. Cinéticas obtidas nas reações de esterificação.....	50
5.2. Representação gráfica da influência da concentração inicial de substrato na velocidade inicial da reação	54
5.3. Ajuste dos modelos cinéticos	57
5.4. Acompanhamento da reação através de espectroscopia de infravermelho.....	63
5.4. Avaliação da capacidade de reutilização do catalisador	65
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	68
6.1. Conclusões.....	68
6.2. Sugestões	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1	Figura ilustrando o abaixamento da energia de ativação de uma reação devido à presença de uma enzima com atividade catalítica	8
Figura 3.2	Modelo Chave-Fechadura para a fixação dos substratos nos sítios catalíticos das enzimas.....	9
Figura 3.3	Gráfico ilustrando a influência da temperatura sobre a conversão dos reagentes na reação catalisada pela enzima γ -glutamil transpeptidase e sem a presença de catalisador.....	11
Figura 3.4	Influência do pH do meio, sobre a atividade enzimática das enzimas Tripsina e Pepsina.....	12
Figura 3.5	Principais métodos de imobilização de enzimas.....	14
Figura 3.6	Processo de imobilização de uma enzima através da formação de uma matriz polimérica.....	15
Figura 3.7	Representação esquemática dos dois modelos de imobilização de enzimas por inclusão em membranas	16
Figura 3.8	Reação de obtenção de ésteres metílicos (biodiesel) a partir da metanólise em meio básico de triglicerídeos	21
Figura 3.9	Rota sintética para a obtenção de ésteres por esterificação direta em meio ácido.....	24
Figura 3.10	Reação de obtenção do γ -fenilbutirato de etila a partir do ácido γ -fenilbutírico pelo etanol em meio básico	25
Figura 3.11	Reação de obtenção do adipato de etila a partir da esterificação direta do ácido adípico pelo etanol em meio ácido	25

Figura 3.12	Cinéticas das reações de esterificação com os álcoois metílicos e etílicos.....	31
Figura 3.13	Influência da concentração de enzima na velocidade da reação	34
Figura 3.14	Influência da concentração inicial de substrato na velocidade da reação enzimática.....	34
Figura 3.15	Representação gráfica da equação de Michelis e Menten	37
Figura 3.16	Representação esquemática da determinação dos parâmetros da equação de Michaelis e Mentem através do método de Lineweaver-Burk.....	38
Figura 4.1	Banho-maria tipo DUB-NOFF utilizado para conduzir a síntese do éster.....	43
Figura 4.2	Bureta digital utilizada nas titulações ácido-base.....	43
Figura 4.3	Espectrofotômetro de Infravermelho utilizado para a caracterização do Éster	44
Figura 4.4	Exemplo de espectro de Infravermelho mostrando os picos referentes a deformação axial da ligação C=O no éster ($1736,637\text{ cm}^{-1}$) e no ácido ($1709,203\text{ cm}^{-1}$).	47
Figura 5.1	Cinéticas de esterificação do ácido octanoico pelo <i>n</i> -pentanol em <i>n</i> -hexano, catalisada pela enzima Lipozyme [®] TL IM, obtidas para a temperatura de 30°C em banho-maria tipo DUB-NOFF agitado a 70rpm.....	51
Figura 5.2	Cinéticas de esterificação do ácido octanoico pelo <i>n</i> -pentanol em <i>n</i> -hexano, catalisada pela enzima Lipozyme [®] TL IM, obtidas para a temperatura de 40°C em banho-maria tipo DUB-NOFF agitado a 70rpm.....	52
Figura 5.3	Cinéticas de esterificação do ácido octanoico pelo <i>n</i> -pentanol em <i>n</i> -hexano, catalisada pela enzima Lipozyme [®] TL IM, obtidas para a temperatura de 50°C em banho-maria tipo DUB-NOFF agitado a 70rpm.....	53

Figura 5.4	Influência da concentração inicial de substrato sobre a velocidade inicial da reação de obtenção do octanoato de <i>n</i> -pentila em <i>n</i> -hexano, catalisada pela enzima Lipozyme [®] TL IM conduzida a 30, 40 e 50°C em banho-maria tipo DUB-NOFF a 70rpm.....	55
Figura 5.5	Ajuste do modelo matemático clássico de inibição aos dados experimentais obtidos a partir das reações realizadas na temperatura de 30°C.....	58
Figura 5.6	Ajuste do modelo matemático clássico de inibição aos dados experimentais obtidos a partir das reações realizadas na temperatura de 40°C.....	58
Figura 5.7	Ajuste do modelo matemático clássico de inibição aos dados experimentais obtidos a partir das reações realizadas na temperatura de 50°C.....	59
Figura 5.8	Ajuste do modelo matemático proposto por Wu e colaboradores aos dados experimentais obtidos a partir das reações realizadas na temperatura de 30°C.....	60
Figura 5.9	Ajuste do modelo matemático proposto por Wu e colaboradores aos dados experimentais obtidos a partir das reações realizadas na temperatura de 40°C.....	61
Figura 5.10	Ajuste do modelo matemático proposto por Wu e colaboradores aos dados experimentais obtidos a partir das reações realizadas na temperatura de 50°C.....	61
Figura 5.11	Espectro de infravermelho para o instante inicial da reação.....	64
Figura 5.12	Espectro de infravermelho para amostra removida durante o andamento da reação.....	64
Figura 5.13	Espectro de infravermelho para amostra removida próxima ao final da reação.....	65
Figura 5.14	Conversões obtidas pela esterificação do ácido octanóico pelo <i>n</i> -pentanol, em <i>n</i> -hexano, catalisada pela enzima Lipozyme TL IM em 60 min de reação, após várias utilizações da enzima, em função da temperatura do sistema.....	67'

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1	Principais grupos funcionais responsáveis pela formação de ligação covalente entre enzima e suporte.....	18
Tabela 3.2	Propriedades físicas de alguns ésteres	19
Tabela 3.3	Principais ésteres utilizados como monômeros na indústria.....	22
Tabela 3.4	Efeito do solvente no rendimento dos ésteres	27
Tabela 3.5	Rendimentos alcançados para a síntese dos diferentes ésteres	28
Tabela 3.6	Rendimentos obtidos para a síntese dos diversos ésteres.....	29
Tabela 3.7	Rendimentos alcançados para as diferentes lípases.....	30
Tabela 5.1	Concentrações iniciais de substrato utilizadas nos experimentos, determinadas após a titulação volumétrica com solução alcoólica de KOH para as diversas temperaturas de reação estudadas ...	50
Tabela 5.2	Parâmetros obtidos para a equação de ajuste e coeficiente de correlação para as cinéticas conduzidas a 30°C	50
Tabela 5.3	Parâmetros obtidos para a equação de ajuste e coeficiente de correlação para as cinéticas conduzidas a 40°C	51
Tabela 5.4	Parâmetros obtidos para a equação de ajuste e coeficiente de correlação para as cinéticas conduzidas a 50°C	52
Tabela 5.5	Velocidades iniciais calculadas para as diversas concentrações iniciais.	54
Tabela 5.6	Parâmetros obtidos para os modelos matemáticos	59
Tabela 5.7	Parâmetros obtidos para o modelo matemático proposto por Wu e colaboradores para as temperaturas de realização das reações	62

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$^1\text{H-RMN}$ - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

A_0 - Fator pré-exponencial [(min^{-1}) para reações de 1ª ordem]

C_b - Concentração de solução de KOH utilizada na titulação (mol.L^{-1});

C_e - Concentração inicial da enzima (mol.L^{-1}).

C_s - Concentração de substrato (mol.L^{-1}).

C_{s0} - concentração inicial de substrato (mol.L^{-1}).

C_x - Concentração do complexo no instante t (mol.L^{-1}).

E_A - Energia de ativação da reação (J.mol^{-1}).

FTIR – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier

IUN - Unidade Novo de Transesterificação.

k - Constante de velocidade da reação [(min^{-1}) para reações de 1ª ordem].

k_1 - Constante de velocidade de formação do complexo ($\text{L.mol}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

k_2 - Constante de velocidade de dissociação do complexo (min^{-1}).

k_3 - Constante de velocidade de decomposição do complexo formando o produto (min^{-1}).

K_i - Constante de inibição (mol.L^{-1})

K_s - Parâmetro da equação (mol.L^{-1})

$\text{Log}(P)$ - Coeficiente de partição.

n - Parâmetro da equação.

R - Constante universal dos gases ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$).

T - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$ ou K).

t - Tempo de reação (min).

v - Velocidade de formação do produto ($\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

V_a - Volume de amostra (mL).

V_b - Volume de solução de KOH consumida na titulação (mL).

V_m - Parâmetro da equação ($\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

V_{max} - Velocidade máxima de formação de produtos ($\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

RESUMO

Os ésteres são importantes compostos orgânicos, utilizados em diversos setores industriais como petroquímica, alimentos, cosméticos, tintas e vernizes, entre outros. Uma grande aplicação deles está relacionada à sua utilização como aromas. Quando sintetizados utilizando enzimas como catalisador podem ser considerados aromas naturais, aumentando seu valor no mercado. Nesse trabalho estudou-se a obtenção do éster alifático (aroma) octanoato do *n*-pentila por esterificação direta utilizando enzima Lipozyme TL IM como catalisador. Foi verificada a influência da concentração inicial dos reagentes (0,1 a 0,95 mol.L⁻¹) na velocidade inicial da reação em função da temperatura de síntese (30, 40 e 50 °C). A velocidade inicial da reação foi determinada através do consumo de ácido octanóico ao longo do tempo. A concentração de ácido foi determinada por titulação ácido-base com solução alcoólica de KOH e o éster caracterizado por FTIR. Modelos cinéticos encontrados na literatura foram ajustados aos dados experimentais. Os resultados obtidos demonstram que a enzima sofre inibição em concentrações iniciais de substrato acima de 0,65 mol.L⁻¹, para qualquer valor de temperatura utilizada. A velocidade máxima atingida pela reação possui valores aproximados de 0,0067, 0,0092 e 0,0080 mol.L⁻¹.min⁻¹ para 30, 40 e 50°C, respectivamente. O modelo proposto por Wu e colaboradores se adaptou bem ao comportamento reação. Os parâmetros $K_i = 0,738 \pm 0,032$ mol.L⁻¹ e $n = 17,11 \pm 1,83$ mostraram ser independentes da temperatura. O parâmetro V_m mostrou ser afetado pelo efeito da temperatura, apresentando valores de 0,0163 (30 °C), 0,0298 (40°C) e 0,0155(50°C) mol.L⁻¹.min⁻¹. Para o parâmetro K_s ele variou de maneira dependente a V_{max} atingindo valores de 0,969, 1,473 e 0,702 mol.L⁻¹ para as temperaturas de 30, 40 e 50°C respectivamente. A enzima pode ser reutilizada por aproximadamente 6, 16 e 26 vezes para as temperaturas de 50, 40 e 30°C, respectivamente. A maior quantidade de éster produzida pode ser obtida à temperatura de 30°C (0,057 mol) para bateladas de 10 mL com concentração inicial dos reagentes igual a 0,65 mol.L⁻¹.

ABSTRACT

Esters are important organic compounds, used in several industrial sectors as petrochemical, food, cosmetics, inks and varnishes among others. A major application of ester is related to their use as flavors. When synthesized using enzymes as catalyst, they are considered natural, increasing their value. In this work we studied the production of the aliphatic ester (flavor) amyl octanoate by direct esterification using the enzyme Lipozyme TL IM as catalyst. It was verified the influence of the initial concentration of the substrate (0.1 to 0.95 mol.L^{-1}) in the initial rate of reaction as a function of synthesis temperature (30 , 40 and $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$). The initial rate of the reaction was determined by the octanoic acid consumption along time. Acid concentration was determined by acid-base titration with alcoholic solution of KOH and the ester characterized by FTIR. Kinetic models described in the literature were adjusted to the experimental data. Results demonstrate that the enzyme suffers inhibition for initial concentrations of substrate above 0.65 mol.L^{-1} , for temperatures between 30 to $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The maximum rate reached by the reaction has been determined as 0.0067 , 0.0092 and $0.0080 \text{ mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ for 30 , 40 and $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. The model proposed by Wu and co-worker fits the experimental data. The parameters $K_f = 0.738 \pm 0.032 \text{ mol.L}^{-1}$ and $n = 17.11 \pm 1.83$ have been shown independent of temperature. The parameter V_m was affected by the effect of the temperature, having values of 0.0163 ($30 \text{ }^{\circ}\text{C}$), 0.0298 ($40 \text{ }^{\circ}\text{C}$) and 0.0155 ($50 \text{ }^{\circ}\text{C}$) $\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$. For the parameter K_s , it has dependence with temperature reaction and V_{max} , having values of 0.969 ($30 \text{ }^{\circ}\text{C}$), 1.473 ($40 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e 0.702 ($50 \text{ }^{\circ}\text{C}$) mol.L^{-1} . The enzyme can be reused for approximately 6, 16 and 26 times for temperatures of 50 , 40 and $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. The largest amount of ester produced can be obtained at the temperature of $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (0.057 mol) for batches of 10 mL with initial concentration of the reagents (0.65 mol.L^{-1}).

1 - INTRODUÇÃO

Os ésteres são importantes compostos orgânicos, obtidos por síntese química (esterificação, transesterificação ou interesterificação) ou extraídos de alguns produtos, utilizando-se solvente adequado. Suas aplicações comerciais são bastante difundidas, sendo que diversos processos de obtenção dessas substâncias encontram-se bem estabelecidos no setor industrial. Entre os principais setores produtivos associados aos ésteres, podemos citar o de combustíveis, onde o biodiesel tem papel de destaque, sua utilização como monômeros para produção de polímeros, sua aplicação como óleos na indústria alimentícia, seu uso em fármacos na clínica médica e principalmente sua utilização como aromas em diversos segmentos industriais como a indústria de perfumes e alimentos.

A síntese de ésteres de um modo geral envolve reações que possuem velocidades bastante baixas, se forem realizadas sem a utilização de um catalisador adequado. Assim, é necessário o emprego de catalisadores, sendo geralmente utilizados ácidos como o sulfúrico e o clorídrico ou bases como o hidróxido de sódio ou o hidróxido de potássio. Por tratar-se de uma catálise heterogênea, os processos de purificação dos produtos da reação acabam tornando oneroso o processo de síntese de forma geral, além de não gerar produtos com um grau de pureza elevado. Diante disso, diversos trabalhos na literatura vêm gerando dados para o aperfeiçoamento das vias de produção desses compostos.

Estudos recentes demonstram que as enzimas, em particular as lipases, podem ser aplicadas na síntese de diversos ésteres. Os processos que utilizam esse tipo de catalisador podem ser conduzidos em condições muito mais brandas de pressão, temperatura e pH quando comparados aos processos que utilizam catalisadores inorgânicos. Entretanto, as enzimas estão sempre sujeitas à inativação por fatores físicos como temperatura, pressão, choque

mecânico entre outros, ou por fatores químicos resultantes da interação de certos compostos com a enzima. Dessa forma, métodos de imobilização vêm sendo desenvolvidos, permitindo que as enzimas possam ser reutilizadas várias vezes sem perda considerável de sua atividade catalítica, facilitando sua separação do meio reacional por torná-la insolúvel nele.

Assim, processos contínuos podem ser desenvolvidos, utilizando reatores contínuos com o catalisador acondicionado em seu interior (*Fixed Bed Reactor*) onde a corrente de saída do equipamento praticamente contém apenas os produtos gerados da reação, dissolvidos no solvente utilizado na síntese, dispensando operações unitárias para a remoção do catalisador.

Além das vantagens operacionais proporcionadas pelo uso de enzimas na síntese de ésteres, características atrativas para a venda desses compostos podem ser atribuídas a eles, quando produzidos por catalisador biológico. Um exemplo está associado à produção de aromas. Quando o éster é produzido por catalisador inorgânico, é considerado artificial, embora seja quimicamente igual ao natural, obtido por processos físicos. Entretanto, se o composto for sintetizado por via biológica, por fermentação ou utilizando enzima como catalisador, ele é considerado natural tornando o composto mais atrativo comercialmente.

Embora diversos trabalhos na literatura descrevam a síntese de ésteres a partir de enzimas, um detalhamento maior sob o ponto de vista de cinética química deve ser mais explorado, gerando dados para a construção de reatores em escala real. Com esse enfoque, é possível transformar os resultados obtidos de forma acadêmica em tecnologia, atendendo os reais objetivos da pesquisa científica.

Nesse contexto, a descrição da cinética química envolvendo enzimas como catalisador, um dos principais enfoques da Engenharia Bioquímica, apresenta uma importante ligação entre o trabalho desenvolvido na Universidade e o setor fabril. Trabalhos nesse sentido foram pioneiramente propostos por Michaelis e Menten e ao longo do tempo modificações no modelo gerado por esses autores foram propostos, de forma a adequar a

equação às diversas particularidades encontradas nas várias reações onde as enzimas possam atuar.

Dentre as inúmeras sínteses de diversos ésteres que poderiam ser escolhidas como foco desse trabalho, optou-se por descrever a cinética de obtenção do éster alifático **octanoato de *n*-pentila**, catalisada pela enzima comercial Lipozyme[®] TL IM, produzida e comercializada na forma imobilizada pela NOVOZYMES. Esse composto é um éster não encontrado na natureza, e é largamente empregado como aromatizante em cigarros, gomas de mascar e sobremesas, possuindo aroma de vinho branco.

A escolha dessa reação está baseada em trabalhos preliminares realizados por (JOÃO e ZANELLA, 2000), onde esse composto foi obtido com o melhor rendimento frente a outros ésteres alifáticos, sendo a síntese conduzida pela mesma enzima em questão.

Para a realização do trabalho, foram inicialmente coletados dados experimentais referentes ao avanço da reação, variando as condições de trabalho como concentração inicial de reagentes e temperatura do meio sendo que, após essa etapa, foram ajustados aos dados experimentais obtidos, modelos matemáticos encontrados na literatura.

2 - OBJETIVOS

O desenvolvimento desse trabalho consistiu em estudar a síntese de ésteres alifáticos utilizando a enzima comercial Lipozyme[®] TL IM. Dentre os principais objetivos específicos, podemos citar:

- Descrever a cinética de obtenção do éster alifático octanoato de *n*-pentila, obtido da esterificação do ácido octanóico com o *n*-pentanol.
- Determinar a influência da concentração inicial dos reagentes na velocidade inicial da reação em função da temperatura da reação e ajustar modelos matemáticos que representem à relação entre essas variáveis.
- Determinar os parâmetros cinéticos da reação e discutir a influência causada pela temperatura sobre eles.
- Avaliar a capacidade de reutilização da enzima, para a síntese em questão, após sua utilização em diversas bateladas, em função da temperatura de realização da síntese.

Os dados gerados com esse trabalho visam contribuir com os resultados obtidos em diversos trabalhos sobre a síntese de ésteres desenvolvidos anteriormente, embora os valores aqui obtidos possam sofrer variações dependendo da origem dos reagentes e também da natureza, forma de obtenção ou manuseio da enzima.

Dessa forma, valores aqui obtidos poderão servir como referência para futuros estudos, fortalecendo ainda mais a discussão com relação à síntese tratada, gerando conclusões mais concretas, possibilitando a utilização dos dados para o desenvolvimento e otimização de processos tecnológicos.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - ENZIMAS

3.1.1 - Considerações iniciais

As enzimas constituem a maior e mais altamente especializada classe de proteínas. Elas catalisam milhares de reações químicas que no seu conjunto constituem o metabolismo intermediário das células (LEHNINGER, 1977).

De acordo com sua estrutura química, as enzimas podem ser classificadas de duas formas (SCRIBAN, 1985):

- *Holoproteínas*, quando são constituídas unicamente de um encadeamento de aminoácidos;
- *Heteroproteínas*, quando possuem uma parte não protéica, o *co-fator*, necessário a atividade catalítica e ligada, mais ou menos fortemente, a proteína.

Essas proteínas são catalisadores biológicos que intervêm em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis às quais elas aceleram por ativação específica. Elas permitem atingir rapidamente o estado de equilíbrio da reação sem modificá-lo. São as peças-chaves da biotecnologia e da bioindústria. São elas que, na engenharia microbiológica, catalisam as reações metabólicas adicionadas e asseguram a sua regulação. Da mesma forma, elas levaram a engenharia genética a realizar modificações no equipamento enzimático de alguns microorganismos com vistas a torná-los aptos à biossíntese de metabólitos de interesse (SCRIBAN, 1985).

Grande parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A atividade das enzimas foi reconhecida primeiramente em estudos antigos da digestão no estômago no período de 1780 a 1825, através de observações feitas por Spalanzani em 1783 na Itália, quando o mesmo observou a degradação de pedaços de carne em suco estomacal de pássaros. Mais tarde, Luis Pasteur deduziu que a fermentação do açúcar a álcool pela levedura é catalisada por “fermentos” ou enzimas. Em 1860 ele postulou que elas são inextrincavelmente ligadas à estrutura e à vida das leveduras. Portanto, foi um grande momento da história da pesquisa enzimática quando em 1897, E. Büchner, conseguiu extrair das células de levedura as enzimas que catalisam a fermentação alcoólica. Essa realização demonstrou claramente que essas enzimas importantes que catalisam uma das principais vias metabólicas produtoras de energia podem funcionar independentemente da estrutura celular (LEHNINGER, 1977; UHLIG, 1998).

Preparados enzimáticos, extraídos de plantas e tecidos animais, foram utilizados antes mesmo do conhecimento da natureza e propriedades das enzimas. O desenvolvimento da atual indústria enzimática iniciou com o japonês Jokichi Takamine. Em 1894, ele patenteou um processo para a obtenção de um preparo enzimático, constituído de uma mistura de carbohidrases e enzimas proteolíticas (UHLIG, 1998).

Mais tarde, por volta de 1910 a 1960, processos industriais como produção de cervejas e sucos acabaram incorporando a tecnologia enzimática como forma de melhoria de produção. Além disso, detergentes utilizando enzimas em sua composição foram produzidos na mesma época (UHLIG, 1998).

3.1.2 - Mecanismo de atuação das enzimas

As enzimas catalisam reações químicas que, de outra maneira ocorreriam apenas a velocidades extremamente baixas. São verdadeiros catalisadores, pois não alteram o estado de equilíbrio das reações que catalisam e não são consumidas durante a reação. Elas aceleram a velocidade

das reações por diversos mecanismos distintos (LEHNINGER, 1977; REHM *et al.*, 1995).

De acordo com a Equação de Arrhenius (Equação 3.1), observamos que a constante de velocidade k de uma reação depende de uma energia de ativação E_A e da temperatura T , sendo que A_o e E_A são constantes empíricas. R é a constante universal dos gases.

$$k = A_o e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (3.1)$$

Embora seja uma equação fenomenológica, ela indica a necessidade de ultrapassar uma barreira de energia, definida como *energia de ativação*, como mostra a Figura 3.1. Essa barreira pode ser ultrapassada com o aumento da temperatura, que intensifica o número de moléculas com energia superior a energia de ativação. Uma outra forma seria diminuir a energia de ativação da reação, sem a necessidade de elevarmos a temperatura a valores elevados. Um catalisador, de alguma maneira, diminui a energia de ativação da reação, fazendo com que a constante de velocidade aumente, sem necessidade do aumento da temperatura (REHM *et al.*, 1995; LEVENSPIEL, 2000; LEHNINGER, 1977).

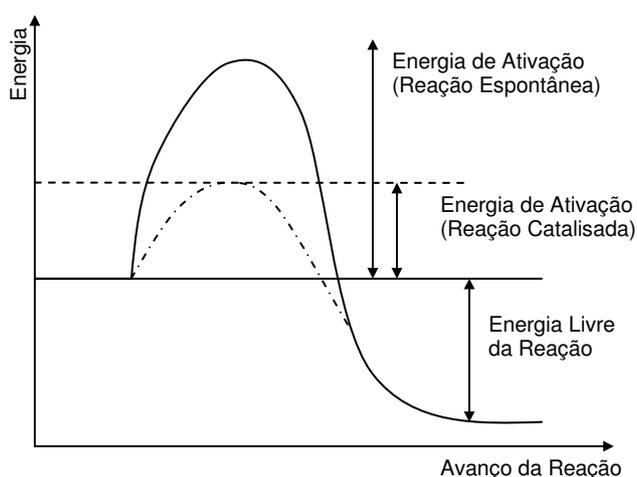


Figura 3.1 – Figura ilustrando o abaixamento da energia de ativação de uma reação devido à presença de uma enzima com atividade catalítica.

Fonte: UHLIG, 1998.

A diminuição da energia de ativação ocorre, porque as ligações temporárias entre a enzima e o substrato diminuem a força das ligações entre os substratos. Dessa forma a energia necessária para a quebra das ligações dos reagentes é diminuída e a reação pode alcançar rapidamente seu equilíbrio em temperaturas baixas (UHLIG, 1998).

As enzimas são moléculas de proteínas tridimensionais com um sítio ativo em um local definido de sua superfície. Essa parte da superfície pode ser definida como um “bolso” que irá permitir somente a entrada de uma espécie de substrato para a ocorrência da reação. Fischer definiu enzima e substrato com o “fechadura” e “chave” como observado na Figura 3.2 (UHLIG, 1998).

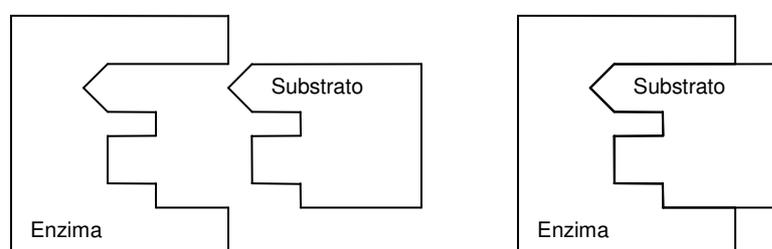


Figura 3.2 – Modelo Chave-Fechadura para a fixação dos substratos nos sítios catalíticos das enzimas.

Fonte: UHLIG, 1998.

Assim, devido à especificidade, as enzimas apresentam duas características muito importantes (SCRIBAN, 1985):

- Possuem especificidade em relação à reação. Assim, uma enzima só pode catalisar um determinado tipo de reação, como a hidrólise de gorduras por lipases;
- Possuem especificidade quanto ao substrato. Dessa maneira, a enzima pode apenas fixar o substrato em pontos bem precisos por estabelecimento de ligações de hidrogênio;

A conformação da proteína enzimática é tal que ela só reconhece um tipo de substrato. Após ter fixado esse substrato em seu sítio catalítico, a

enzima vai em seguida transformá-lo. Para este fim, sua estrutura espacial é tal que, na mesma vizinhança e a distâncias adequadas, encontram-se agrupamentos funcionais cujas ações diferentes e complementares realizam a reação. O sítio catalítico de uma enzima é uma região muito pequena da enzima, quando comparada ao tamanho total da proteína (SCRIBAN, 1985).

3.1.3 - Fatores que influenciam a atuação das enzimas

Pelo fato das enzimas serem proteínas, qualquer fator que possa prejudicar sua estrutura química, irá interferir na sua atividade catalítica. Dessa forma, o aquecimento das enzimas, tratamento com ácidos ou bases fortes, ou exposição a agentes desnaturadores podem destruir sua atividade catalítica (LEHNINGER, 1977).

Temperatura

A atividade enzimática em geral aumenta com o incremento da temperatura. Em geral, numa faixa de 10 a 40°C, um aumento de 10°C na temperatura do sistema reacional provoca um aumento considerável na velocidade da reação. Toda enzima possui uma faixa ótima de temperatura para sua operação. Altas temperaturas podem provocar sua desnaturação (UHLIG, 1998).

A desnaturação provoca mudança nas estruturas terciária e quaternária da proteína, fazendo a enzima passar de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade catalítica. Ao contrário, para temperaturas baixas que não possuem efeito desnaturante, a repetição de transições sólido-líquido, congelamento-descongelamento provoca notáveis perdas de atividades catalíticas (SCRIBAN, 1985).

Para reações catalisadas por enzimas, um aumento de 1°C na temperatura pode provocar um aumento de 10% na atividade enzimática da enzima. Na Figura 3.3 podemos observar a dependência da atividade da enzima γ -glutamil transpeptidase em função da temperatura.

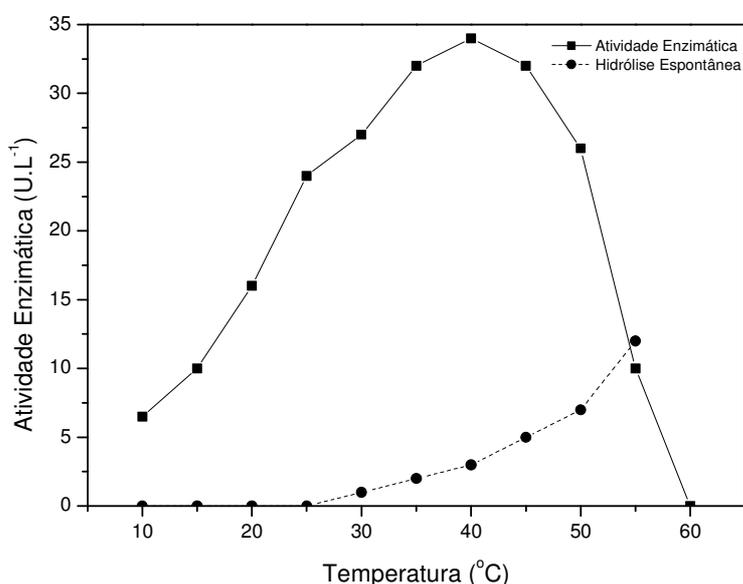


Figura 3.3 – Gráfico ilustrando a influência da temperatura sobre a conversão dos reagentes na reação catalisada pela enzima γ -glutamil transpeptidase (—) e sem a presença de catalisador (---).

Fonte: REHM *et al.*, 1995.

Podemos observar que essa enzima possui uma temperatura ótima por volta de 40°C a partir de 60° praticamente não observamos atividade alguma. A linha tracejada indica a mesma reação sem a adição de enzima, acelerada somente pela elevação da temperatura (REHM *et al.*, 1995).

Em muitos processos as enzimas são totalmente inativadas a temperaturas de 70-80°C. Entretanto, algumas enzimas são ativas acima de 100°C, como as enzimas hidrolíticas necessárias para a conversão de amido em glicose. Nesse exemplo, a alta estabilidade da enzima em temperaturas elevadas apresenta uma significativa vantagem econômica (UHLIG, 1998).

pH

Todas as enzimas são sensíveis às variações de concentração de H^+ do meio. Existe uma zona de pH para a qual a atividade enzimática é máxima. Essa zona de pH é resultante de vários parâmetros: temperatura, força iônica, concentração em substrato que são, todos, parâmetros exteriores, mas também da natureza da enzima.

Dentre os resíduos de aminoácidos da molécula enzimática que possuem grupos ionizáveis, alguns vão ligar e posicionar os substratos, outros vão participar da reação e a maioria vai servir para manter a conformação da enzima. Esses resíduos, assim como o substrato em muitos casos é sensível a variação do pH e possuem estados de ionização diferentes, de acordo com o valor do pH (SCRIBAN, 1995).

A Figura 3.4 apresenta de forma ilustrativa a influência do pH do meio sobre a atividade enzimática observada para as enzimas Tripsina e Pepsina.

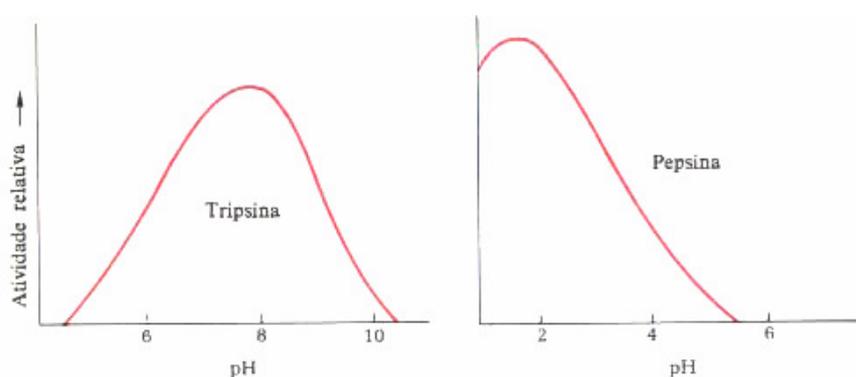


Figura 3.4 – Influência do pH do meio, sobre a atividade enzimática das enzimas Tripsina e Pepsina.

Fonte: LEHNINGER, 1977.

Inibidores, ativadores e co-fatores

Muitas enzimas necessitam de co-fatores muito caros como NAD, FAD e alguns metais para que possam apresentar atividade enzimática. Dessa forma a necessidade da presença desses compostos durante o processamento pode ser um fator limitante no processo.

A presença de ativadores durante o processo não costuma ser um fator a ser considerado em diversos casos. Entretanto, os inibidores enzimáticos apresentam uma maior importância a ser considerada. Os inibidores podem ser os produtos da reação, os substratos ou outras moléculas que afetem a atividade da enzima (TUCKER e WOODS, 1995).

3.1.4 - Imobilização enzimática

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, novas técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (DALLA VECCHIA *et al.*, 2004).

O custo elevado dos processos de extração e purificação das macromoléculas enzimáticas e sua grande instabilidade em solução são obstáculos à recuperação do biocatalisador, após a utilização. Por isso, a maioria das operações industriais é feita de maneira descontínua, por bateladas, com a renovação da enzima no início de cada ciclo.

A imobilização sobre suporte insolúvel que é acompanhado, frequentemente, de um aumento da estabilidade da enzima, facilita o emprego de reatores contínuos, funcionando por longos períodos, sem renovação do catalisador (SCRIBAN, 1985, WISEMAN, 1987).

Métodos de imobilização

Os principais métodos para imobilização de enzimas encontram-se na Figura 3.5. O método adequado deve ser tal, que as propriedades do catalisador não sejam prejudicadas devido à imobilização. Essas propriedades se referem à estrutura terciária, em particular, com relação ao seu sítio ativo (FABER, 2000; SCRIBAN, 1985).

Além disso, para ser efetivo na imobilização o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período e

permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

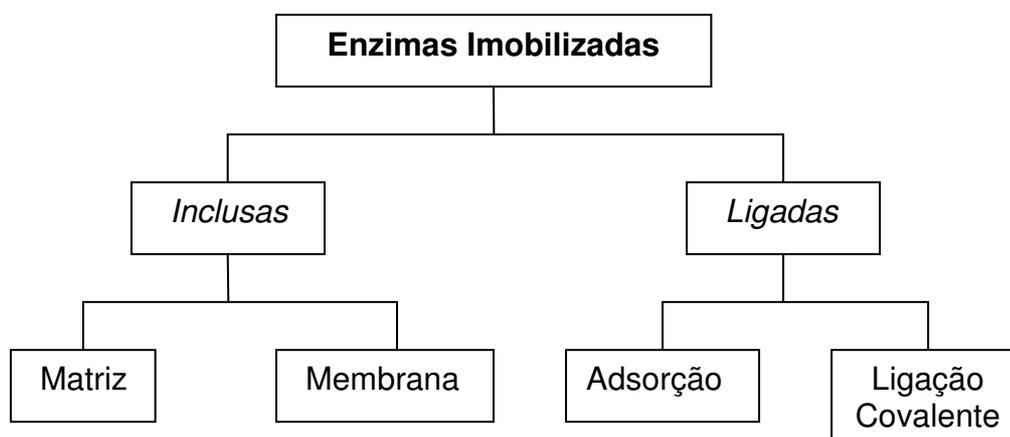


Figura 3.5 – Principais métodos de imobilização de enzimas.

Fonte: Modificado de SCRIBAN, 1985

Imobilização por inclusão

Nesse método, as enzimas ficam confinadas na rede tridimensional de um polímero insolúvel na água ou aprisionadas no interior de microcápsulas delimitadas por uma membrana semipermeável cujos poros são suficientemente pequenos para impedir a difusão da macromolécula, mas suficientemente largos para permitir a passagem do substrato e dos produtos da reação (SCRIBAN, 1985).

A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

No método de inclusão em uma *matriz*, a enzima é dissolvida e dispersada numa solução de monômero que, em seguida é polimerizado na presença de um agente de reticulação e de um colóide protetor que pode ser albumina, agar ou dextrina (SCRIBAN, 1985).

A Figura 3.6 mostra de maneira esquemática como ocorre a formação da matriz através da reação de formação da poliacrilamida.

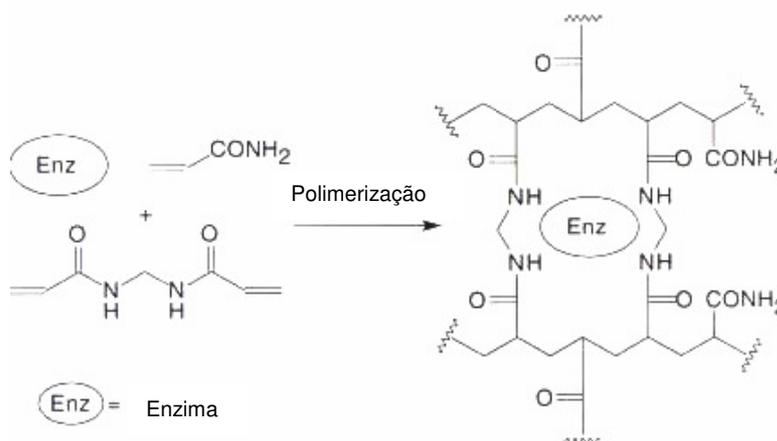


Figura 3.6 – Processo de imobilização de uma enzima através da formação de uma matriz polimérica. Na figura observamos a reação de formação da poliacrilamida, gerando a matriz para a imobilização por inclusão de uma determinada enzima.

Fonte: FABER, 2000.

Os principais polímeros utilizados para inclusão em matriz são a poliacrilamida, o metacrilato, o polietileno glicol, o polivinil, a pirrolidona, e ainda polímeros naturais como amido (SCRIBAN, 1985).

Na inclusão em *membranas*, a enzima é retida no interior de uma cápsula delimitada por uma membrana semipermeável (SCRIBAN, 1985).

Existem dois métodos principais para a imobilização de enzimas por meio de membranas. O primeiro consiste na polimerização superficial, por meio da formação de micelas. Uma solução aquosa contendo a enzima e um monômero hidrófilo é emulsionada em um solvente orgânico que não se mistura com a água. Por adição de um monômero hidrófobo é realizada uma

reação de polimerização formando uma membrana ao redor das microgotículas. Em geral adiciona-se um agente emulsificante para ajustar o formato das cápsulas.

O outro método conhecido por método das lisossomas, agregados de fosfolípídeos dispersos na solução enzimática são submetidos à sonicação. São obtidas pequenas esferas constituídas de uma dupla camada lipídica encerrando gotículas de enzima em solução aquosa (FABER, 2000; SCRIBAN, 1985).

Na Figura 3.7, é possível observar de forma esquemática os dois tipos de inclusão em membranas.

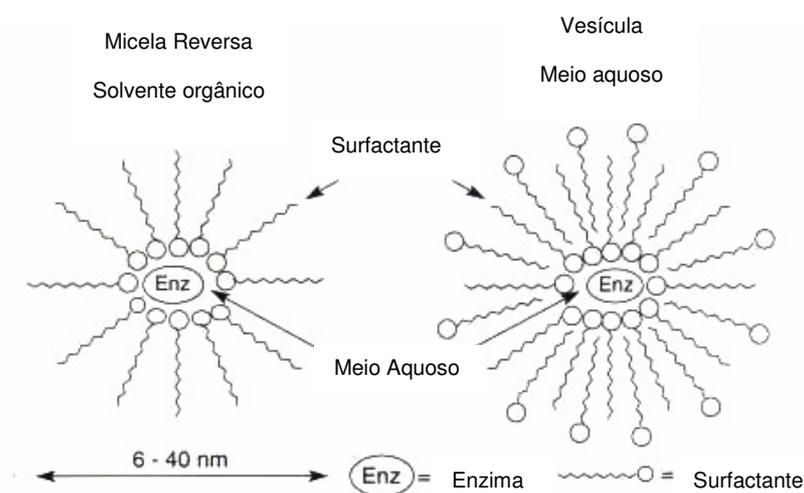


Figura 3.7 – Representação esquemática dos dois modelos de imobilização de enzimas por inclusão em membranas. Na figura da esquerda, observamos a imobilização por meio da formação de micelas. Na direita o método das lisossomas.

Fonte: FABER, 2000.

Imobilização por Ligação Química

A imobilização de uma enzima por meio de ligação química entre o suporte e a enzima pode ocorrer por adsorção ou por ligação covalente.

O procedimento de adsorção de uma proteína é muito simples, e é um dos métodos mais utilizados. Nesse processo, são empregados um número bastante grande de forças de interação de baixa energia entre o suporte e a

proteína, como interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Se o suporte é portador de cargas elétricas, as ligações iônicas que se podem estabelecer além das forças físicas de adsorção, conferem ao complexo uma estabilidade muito grande (SCRIBAN, 1985; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Numerosos materiais têm sido utilizados como suportes para adsorção de proteínas como: carvão ativado, alumina, terra diatomácea (celite), celulose e resinas sintéticas (FABER, 2000).

Vários parâmetros influenciam na quantidade de enzima adsorvida no suporte. Entre eles podemos citar (SCRIBAN, 1985):

- Concentração de Enzima;
- pH do Meio;
- Força Iônica do Meio;
- Temperatura;
- Natureza do Suporte;

Uma outra forma de ligar a enzima ao suporte seria por estabelecimento de ligações covalentes. Nesse método, uma reação química cria uma ligação irreversível entre a molécula enzimática e os grupos reativos do suporte (SCRIBAN, 1985; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; FABER, 2000).

A tabela a seguir apresenta os principais grupos funcionais responsáveis pela fixação da enzima em suportes.

Tabela 3.1 – Principais grupos funcionais responsáveis pela formação de ligação covalente entre enzima e suporte.

Função Orgânica	Grupamento Funcional
Função Amidada	N terminal NH ₂ (Lisina)
Função carboxílica	COOH (ácido aspártico) COOH (ácido glutâmico) COOH terminal
Função Tiol	SH (cisteína)
Núcleo fenólico	Tirosina
Núcleo imidazol	Histidina
Função hidroxila	OH serina, treonina

Fonte: SCRIBAN, 1985

3.2 - ÉSTERES

3.2.1 - Definição e propriedades físicas

Ésteres são compostos orgânicos derivados dos ácidos carboxílicos pela substituição de sua hidroxila por um grupo alquila (proveniente de álcoois) ou arila (proveniente de fenóis) (AMARAL, 1981; MORRISON e BOYD, 1996).

Os ésteres derivados de ácidos e de álcoois inferiores (essências de frutas) são líquidos incolores, de odor agradável e miscíveis com a água. Os ésteres derivados de ácidos e álcoois superiores (ceras) são sólidos e insolúveis na água. São compostos polares, mas não tendo um hidrogênio ligado ao oxigênio, suas moléculas não podem formar ligações de hidrogênio fortes umas com as outras. Como resultado, os ésteres possuem pontos de ebulição menores do que os dos ácidos e dos álcoois de peso molecular semelhante (AMARAL, 1981; SOLOMONS e FRYHLE, 2002).

Os ésteres são solúveis em muitos solventes orgânicos apolares e pouco polares como hidrocarbonetos, haletos de alquila e éteres, devido às interações intermoleculares de Van der Waals ou dipolo-dipolo com esses

solventes. São solúveis em álcoois e os de até três carbonos são praticamente solúveis em água por formarem ligações hidrogênio com tais solventes. O acetato de etila é pouco solúvel em água (cerca de 10%) em volume, sendo frequentemente empregado em partições de extratos aquosos (COSTA *et al.*, 2003).

A Tabela 3.2 apresenta alguns ésteres e suas respectivas propriedades físicas, como ponto de fusão e ebulição em condições normais de pressão e a solubilidade em água.

Tabela 3.2 – Propriedades físicas de alguns ésteres.

Éster	P. F. (°C)	P. E. (°C)	Solubilidade em Água (g.100mL ⁻¹ a 20°C)
Formato de Metila	-99	31,5	Muito Solúvel
Formato de Etila	-79	54	Solúvel
Acetato de Metila	-99	57	24,4
Acetato de Etila	-82	77	7,39 (25°C)
Butanoato de Etila	-93	120	0,51
Hexanoato de Etila	-68	168	0,063
Octanoato de Pentila	-35	260	Menor que 0,001
Benzoato de Metila	-12	199	0,15
Benzoato de Etila	-35	213	0,08

Fonte: Modificado de SOLOMONS e FRYHLE, 2002

3.2.2 - Principais Aplicações dos Ésteres

Uso em Síntese

Os ésteres são freqüentemente empregados como solventes em reações orgânicas porque formam um meio reacional moderadamente polar e aprótico. O uso do acetato de etila como solvente é vantajoso por apresentar um ponto de ebulição razoavelmente baixo (p.e. 70°C) para ser destilado a partir da mistura reacional.

Por ser pouco solúvel em água, o acetato de etila é empregado em partições de extratos aquosos. Os acetatos de etila e *n*-butila são utilizados como solvente de secagem rápida (devido ao seu baixo ponto de ebulição e à alta pressão de vapor) para nitrocelulose, etilcelulose, borracha e resinas vinílicas, enquanto o acetato de *n*-butila é usado como solvente para lacas (COSTA *et al.*, 2003).

Óleos e gorduras

Os óleos, gorduras e ceras naturais são lipídeos constituídos principalmente por ésteres graxos de altos pesos moleculares. As ceras são misturas complexas de compostos de cadeias longas, como ácidos, alcanos, álcoois e, principalmente, ésteres graxos. O palmiato de miricila é o principal constituinte da cera de abelha. Os óleos (líquidos) e as gorduras (sólidos), que são coletivamente denominados glicerídeos, são ésteres graxos formados a partir do glicerol e de ácidos graxos de 12 a 22 carbonos. Dessa forma, um éster graxo pode apresentar três resíduos de palmitato, enquanto outro éster graxo pode conter um resíduo de estearato e dois de laurato, mitato e estearato; os resíduos insaturados são derivados dos ácidos oléico, linoléico e linolênico (COSTA *et al.*, 2003).

Clinica Médica

Algumas substâncias que contêm a função éster carboxílico são importantes em clínica médica. O cloridrato de procaína, comercializado sob o nome de Novocaína[®], é um dos anestésicos locais mais comuns. Por sua vez, o salicilato de metila (componente do Gelol[®]) é utilizado no tratamento de traumatismos musculares (COSTA *et al.*, 2003).

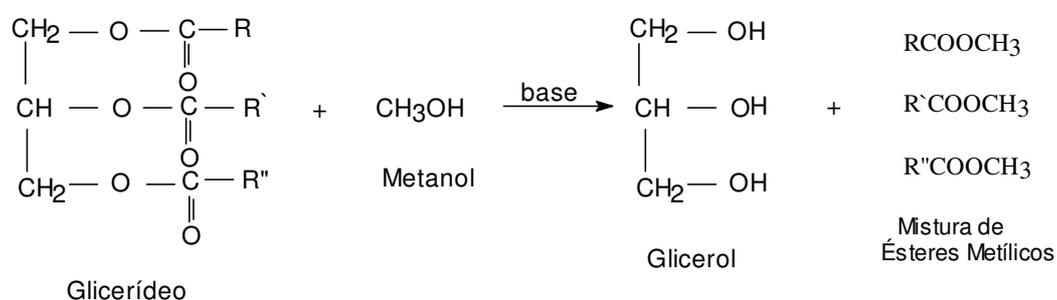
Utilização como Combustíveis

Recentemente, devido ao grande apelo ambiental com relação à diminuição do uso de combustíveis fósseis, pesquisas por novas fontes de combustíveis que sejam menos agressivos ao meio ambiente têm recebido um grande incentivo tanto privado quanto governamental. Nesse contexto, enquadra-se a viabilidade de utilizar o *Biodiesel* (ésteres etílicos ou metílicos

de ácidos graxos), como substituto ao *Diesel*, obtido a partir do refino do petróleo (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Esse novo combustível apresenta características bastante interessantes, tanto sob o ponto de vista ambiental, quanto à sua obtenção, pois é produzido a partir de recursos renováveis.

Sua preparação envolve a alcoólise (metanol ou etanol) de óleos vegetais (triacilgliceróis) em meio básico ou ácido. Na Figura 3.8 podemos observar um exemplo de reação de formação do biodiesel, sendo esse obtido a partir da metanólise em meio básico de triglicerídeos.



Fonte: MORRISON e BOYD, 1996.

Figura 3.8 – Reação de obtenção de ésteres metílicos (biodiesel) a partir da metanólise em meio básico de triglicerídeos.

Resultados recentes, obtidos por COSTA NETO (2002) demonstram que é possível substituir o catalisador inorgânico (ácido ou base) por enzimas.

Aplicação em Polímeros

Alguns ésteres são monômeros importantes para a obtenção de polímeros, uma vez que muitos plásticos e resinas produzidas são *poliésteres* (COSTA *et al.*, 2003).

A Tabela 3.3 apresenta alguns ésteres utilizados como monômeros e os principais polímeros produzidos a partir desses.

Tabela 3.3 – Principais ésteres utilizados como monômeros na indústria.

Monômero	Polímero	Usos
Tereftalato de Metila	Politereftalato de Etileno (PET)	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricação de fibras (<i>Dacron</i>, <i>Terylene</i>) para indústria têxtil. • Fabricação de filmes (<i>Mylar</i>) para produção de garrafas plásticas tipo PET.
Metacrilato de Metila	Polimetacrilato de Metila	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricação de fibras acrílicas para lentes de contato (<i>Plexiglas</i>) e filmes transparentes para janelas.
Acetato de Vinila	Poliacetato de Vinila	<ul style="list-style-type: none"> • Fabricação de película para vidros à prova de choques em veículos. • Fabricação de Fixador para tintas

Fonte: Modificado de COSTA *et al.*, 2003.

Utilização Como Aromas

A grande variedade de produtos de uso pessoal que utilizamos no dia-a-dia (perfumes, sabonetes, xampus, etc) tem como característica o odor agradável, sem o qual não teriam o mesmo atrativo. Os perfumes, colônias e loções têm origem na antiguidade. O termo *perfume* origina-se do latim *per* (através) + *fumus* (fumaça, no sentido de odor). Os perfumes modernos são misturas de vários produtos sintéticos, óleos animais e extratos de plantas de fragrâncias agradáveis na forma de solução em álcool etílico. As colônias são soluções mais diluídas (cerca de 10 vezes) do que perfumes, sendo por isso mais baratas (COSTA *et al.*, 2003).

A seguir encontramos alguns dos ésteres utilizados em misturas de fragrâncias para alimentos:

- *Maçã*: *n*-hexanal, butirato de etila, propionato de *n*-propila, acetato *n*-butila, trans-2-hexenal, 2-metilbutirato de etila, acetato de 2-metilbutila, 1-hexanol, hexen-1-ol, trans-2-hexen-1-ol, acetato de hexila; álcoois; aldeídos; cetona; ácidos (FLAT *et al.*, 1969);
- *Banana*: álcoois; ésteres, incluindo acetato de amila, acetato de isoamila, butirato de butila e butirato de amila (MACIEL *et al.*, 1986)
- *Pêssego*: acetato de etila, dissulfeto de dimetila, acetato de cis-3-hexenila, octanoato de metila e octanoato de etila (O'DONNELL, 1994).
- *Pêra*: ésteres do ácido 2,4-decadnodióico, especialmente os etílicos, *n*-propílicos e *n*-butílicos (O'DONNELL, 1994).
- *Morango*: Acetatos, butiratos e propionatos de metila e etila (SANZ *et al.*, 1994);

3.2.3 - Obtenção de Ésteres

Alguns ésteres podem ser obtidos na natureza por simples extração utilizando-se um solvente adequado, como óleos vegetais e alguns ésteres utilizados como aromas. Com exceção dos óleos, os outros ésteres citados acabam custando um preço muito alto, inviabilizando seu uso comercial. Além disso, outros ésteres não são encontrados em tanta abundância na natureza ou nem mesmo se possui registro de sua ocorrência, levando esses compostos a serem obtidos por vias sintéticas (ABBAS e COMEAU, 2003).

Basicamente existem duas vias sintéticas para a síntese de ésteres, primeiro utilizando-se um catalisador inorgânico (geralmente ácido sulfúrico) e uma outra utilizando enzimas como catalisadores.

Síntese de Ésteres por via Química

Um ácido carboxílico transforma-se diretamente num éster quando aquecido com um álcool, em presença de pequena quantidade de ácido mineral, normalmente ácido sulfúrico concentrado ou ácido clorídrico anidro conforme podemos observar na Figura 3.9 (SOLOMONS e FRYHLE, 2002). A reação é reversível e, geralmente, quando se atinge o equilíbrio, estão presentes apreciáveis quantidades tanto dos reagentes, como dos produtos. Por exemplo, quando se faz reagir um mol de ácido acético com um mol de álcool etílico em presença de pequena quantidade de ácido sulfúrico, verifica-se que ao atingir-se o equilíbrio (depois de várias horas), se tem um terço da quantidade inicial de cada reagente e dois terços de cada um dos produtos, água e éster (MORRISON e BOYD, 1996).

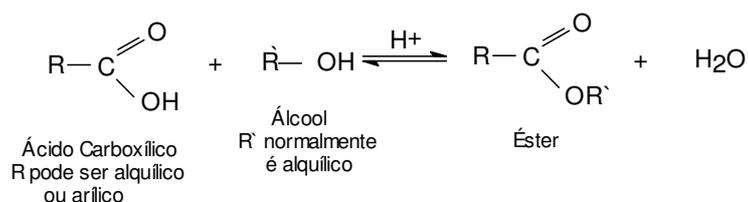


Figura 3.9 – Rota sintética para a obtenção de ésteres por esterificação direta em meio ácido.

Utilizando-se do princípio do deslocamento de equilíbrio é possível aumentarmos o rendimento dessas reações a partir do aumento da concentração dos reagentes. Dessa forma, se um dos dois reagentes, álcool ou ácido for razoavelmente barato, é possível se trabalhar com o excesso de algum desses compostos. Um exemplo seria a síntese do γ -fenilbutirato de etila, obtido a partir da síntese do ácido γ -fenilbutírico pelo etanol em presença de ácido sulfúrico, conforme mostra a Figura 3.10.

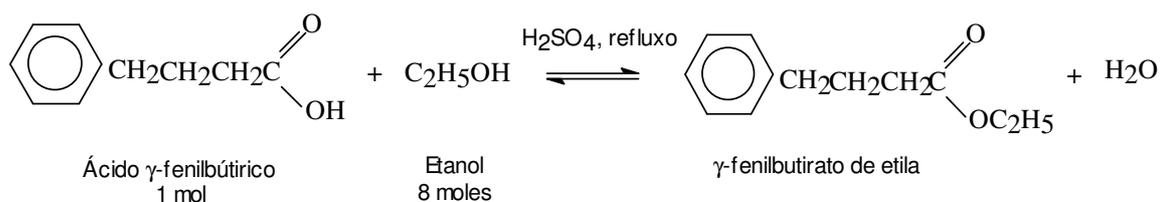


Figura 3.10 – Reação de obtenção do γ -fenilbutirato de etila a partir do ácido γ -fenilbutírico pelo etanol em meio ácido, utilizando excesso de 700% do álcool em relação à quantidade exigida estequiometricamente, com conversão se 85-88%.

Fonte: MORRISON e BOYD, 1996.

Nessa reação é possível atingir um rendimento de aproximadamente 88% se utilizarmos uma relação de 1:8 de ácido e álcool pelo fato do etanol ser bastante barato frente ao ácido (MORRISON e BOYD, 1996).

Uma outra forma de deslocarmos o equilíbrio da reação seria remover um dos produtos da reação. Um exemplo é a síntese do adipato de etila a partir do ácido adípico e etanol, ilustrada na Figura 3.11.

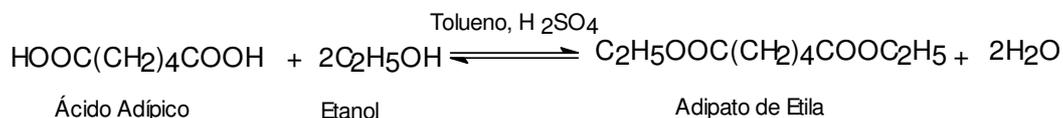


Figura 3.11 – Reação de obtenção do adipato de etila a partir da esterificação direta do ácido adípico pelo etanol em meio ácido.

Fonte: MORRISON e BOYD, 1996.

Nessa reação, aquecem-se ácido adípico e etanol em uma relação de 1:2 juntamente com tolueno e pequena quantidade de ácido sulfúrico em um balão provido de coluna de destilação. O componente de menor temperatura de ebulição na mistura reacional (p.e. 75°C) é um azeótropo de água, álcool etílico e tolueno. Consequentemente a água, à medida que se forma, é removida na destilação. Com esse procedimento obtêm-se um rendimento de 95-97% para a reação (MORRISON e BOYD, 1996).

A presença de grupos volumosos na proximidade do centro reativo, tanto no ácido, quanto no álcool, reduz a velocidade da esterificação por *impedimento estereo*. As filas a seguir mostram a reatividade de álcoois e ácidos na reação de esterificação.

Reatividade: $\text{CH}_3\text{OH} > \text{Álcool Primário} > \text{Álcool Secundário} > \text{Álcool Terciário}$;

$\text{HCOOH} > \text{CH}_3\text{COOH} > \text{RCH}_2\text{COOH} > \text{R}_2\text{CHCOOH} > \text{R}_3\text{CCOOH}$;

Síntese Por Via Enzimática

Os ésteres quando são sintetizados por via química são considerados como artificiais, embora tenham a mesma estrutura dos naturais. Entretanto, quando são sintetizados por catálise enzimática são considerados naturais, o que aumenta em muito a sua valorização no mercado (ABBAS e COMEAU, 2003; UHLIG, 1998; GABELMAN, 1994).

Para a síntese de ésteres por via bioquímica, são aplicadas *Lipases* como catalisadores nas reações de esterificação direta (GANDHI *et al.*, 1997).

As Lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos para formar ácidos graxos livres e glicerol. São glicoproteínas na qual a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo. Elas têm sido isoladas de uma variedade de tecidos de animais e plantas, podendo ser também produzidas por processos de fermentação usando várias espécies de microorganismos (fungos e bactérias) (FABER, 1997).

As vantagens de se utilizar lipases em meio orgânico, deve-se principalmente ao seu baixo custo, à disponibilidade comercial, à versatilidade catalítica, por não requererem co-fatores, e atuarem em uma faixa de pH e temperatura bastante ampla (JESUS e SILVA, 1997).

JOÃO e ZANELLA (2000) estudaram a síntese de ésteres alifáticos utilizando enzimas imobilizadas. Inicialmente verificou o efeito do solvente sobre a esterificação do ácido adípico com *n*-butanol, utilizando enzimas Lipozyme TL RM a 25°C em banho-maria agitado. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Efeito do solvente no rendimento dos ésteres.

Solvente	Rendimento do diéster	
	% (após 24h)	LogP do solvente
1,4-Dioxano	10	-1,10
DMF	12	-1,00
Acetonitrila	37	-0,33
Acetona	51	-0,23
Éter Etílico	55	0,85
Diclorometano	58	0,93
Clorofórmio	61	2,00
Tolueno	66	2,50
CCl ₄	72	3,00
Ciclohexano	92	3,20
Hexano	93	3,50
Heptano	100	4,00

Fonte: Modificado de JOÃO e ZANELLA, 2000.

Segundo JOÃO e ZANELLA (2004), em todos os sistemas catalíticos contendo solventes, a atividade catalítica e a estabilidade da enzima são influenciadas pela natureza do solvente. Um parâmetro que influencia a atividade enzimática com relação à interação que o solvente pode apresentar com a enzima é o *LogP* (coeficiente de partição). Esse coeficiente é utilizado como medida da hidrofobicidade de uma substância, indicando a sua polaridade. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que os melhores rendimentos foram obtidos para solventes mais apolares.

Além disso, JOÃO e ZANELLA (2000) verificaram a atividade catalítica de enzimas Lipozyme TM IM e Lipolase imobilizada em organo-gel, para a síntese de diversos tipos de ésteres utilizando hexano como solvente externo. Os rendimentos da reação foram determinados por ressonância magnética de próton (¹H-RMN). As reações foram conduzidas em banho-maria agitado a 25°C. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Rendimentos alcançados para a síntese dos diferentes ésteres.

Éster	Rendimento % (após 24h)	
	Lipozyme TL IM	Lipolase imobilizada
Acetato de <i>n</i> -propila	5	0
Acetato de isopentila	7	0
Acetato de <i>n</i> -octila	4	0
Acetato de benzila	8	0
Hexanoato de metila	65	42
Hexanoato de etila	76	58
Hexanoato de <i>n</i> -butila	93	82
Hexanoato de <i>n</i> -pentila	93	88
Hexanoato de iso-pentila	92	80
Hexanoato de undecila	90	72
Octanoato de etila	25	24
Octanoato de propila	67	53
Octanoato de butila	95	92
Octanoato de pentila	93	93
Octanoato de hexila	92	78
Octanoato de octila	82	72
Octanoato de decila	77	57
Octanoato de undecila	76	49

Fonte: Modificado de JOÃO e ZANELLA, 2000

De maneira geral, os rendimentos obtidos para a esterificação do ácido octanóico e hexanóico com os diferentes álcoois primários, ficaram sempre acima de 80%, independente da enzima e do suporte utilizado, o que pode ser explicado pela alta eficiência das enzimas para estes substratos. Exceções foram observadas para o metanol e etanol, o que pode estar associado com a polaridade destes substratos. Isto se aplica para todos aqueles substratos que apresentam uma maior polaridade (por ex. ácido acético e ácido benzóico). O efeito da diminuição no rendimento da reação causado pelo aumento da cadeia carbônica do álcool (acima de 5 átomos de carbono), pode ser atribuído ao efeito de reconhecimento da enzima, ou seja, substratos de cadeia carbônica

maiores estão impedidos estericamente não se alojando efetivamente no centro ativo da enzima para que possa ocorrer a catálise (JOÃO e ZANELLA, 2000).

O organo-gel foi destruído por alguns substratos polares, como o ácido acético e o metanol. Já o suporte de resina fenólica da Lipozyme TL IM possibilitou a síntese de ésteres com esses substratos (JOÃO e ZANELLA, 2000).

JESUS e SILVA (2003) exploraram a síntese de alguns ésteres de alcoóis alifáticos, utilizando diversas lipases imobilizadas em crisotila. A Tabela 3.6 apresenta os rendimentos obtidos para as sínteses dos diversos ésteres, utilizando lipases de *Mucor javanicus*, conduzidas a 25°C sob agitação e utilizando hexano como solvente.

Tabela 3.6 – Rendimentos obtidos para a síntese dos diversos ésteres.

Ácido	Éster	Rendimento % (após 48h)
Hexanóico	Hexanoato de metila	49
	Hexanoato de etila	41
	Hexanoato de <i>n</i> -butila	64
	Hexanoato de <i>n</i> -pentila	66
Octanóico	Octanoato metila	64
	Octanoato de etila	69
	Octanoato de <i>n</i> -butila	76
	Octanoato de <i>n</i> -pentila	77
	Octanoato de <i>n</i> -octila	78
Láurico	Laurato de Metila	62
	Laurato de Etila	65
	Laurato de <i>n</i> -butila	97
	Laurato de <i>n</i> -pentila	82
	Laurato de <i>n</i> -octila	84

Fonte: JESUS e SILVA, 2003

Na tabela anterior podemos observar que os melhores resultados foram obtidos com o ácido láurico, com rendimentos de 62 a 97%. Ácidos carboxílicos com mais de 8 carbonos apresentam-se como melhores substratos para lípases.

Na Tabela 3.7, temos os rendimentos alcançados na reação de formação de alguns ésteres, utilizando quatro lipases diferentes, sendo a síntese conduzida sob agitação e utilizando hexano como solvente.

Tabela 3.7 – Rendimentos alcançados para as diferentes lipases.

Lipase	Ácido	Éster	Rendimento % (após 48h)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Hexanóico	Hexanoato de <i>n</i> -butila	76
	Octanóico	Octanoato de <i>n</i> -butila	98
	Láurico	Laurato de <i>n</i> -butila	56
<i>Aspergillus niger</i>	Hexanóico	Hexanoato de <i>n</i> -butila	n.d.
	Octanóico	Octanoato de <i>n</i> -butila	n.d.
	Láurico	Laurato de <i>n</i> -butila	n.d.
<i>Cândida rugosa</i>	Hexanóico	Hexanoato de <i>n</i> -butila	53
	Octanóico	Octanoato de <i>n</i> -butila	70
	Láurico	Laurato de <i>n</i> -butila	68
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Hexanóico	Hexanoato de <i>n</i> -butila	71
	Octanóico	Octanoato de <i>n</i> -butila	57
	Láurico	Laurato de <i>n</i> -butila	85

Fonte: JESUS e SILVA, 2003

GANDHI *et al.* (1995) estudaram a influência do butanol na atividade de enzimas Lipozyme RM em solução aquosa. Os resultados demonstraram que após uma concentração de 0,8 mol.L⁻¹ de álcool a enzima perde rapidamente sua atividade, sofrendo inibição total a 0,99 mol.L⁻¹. Segundo os autores, acima de 0,8 mol.L⁻¹ ocorre a precipitação do butanol na solução aquosa, fazendo com que a enzima fique mais exposta a esse solvente, ocasionado uma maior interação com os sítios ativos.

GHANDI *et al.* (1995) também verificaram o efeito da temperatura na síntese do laurato de Laurila utilizando Lipozyme RM em solução aquosa e observaram que os melhores rendimentos são alcançados a 40°C. Acima de 50°C a atividade da enzima sofre um grande decréscimo e a 70°C praticamente não existe reação.

ABBAS e COMEAU (2003), realizaram a síntese de alguns aromas (ésteres) utilizando lipase de *Mucor sp* como catalisador. Observaram que essa enzima possui um máximo de atividade por volta de 40°C e acima disso a atividade da enzima decai rapidamente.

Além disso, verificaram a velocidade da reação para diferentes tamanhos da cadeia lateral de ácidos e álcoois, utilizando ciclohexano como solvente externo. Verificaram que o hexanoato de butila é mais rapidamente sintetizado que o propionato de butila e ainda, o propionato de etila e o butirato de etila, possuem velocidade de formação menor que o hexanoato de etila (figura 3.12).

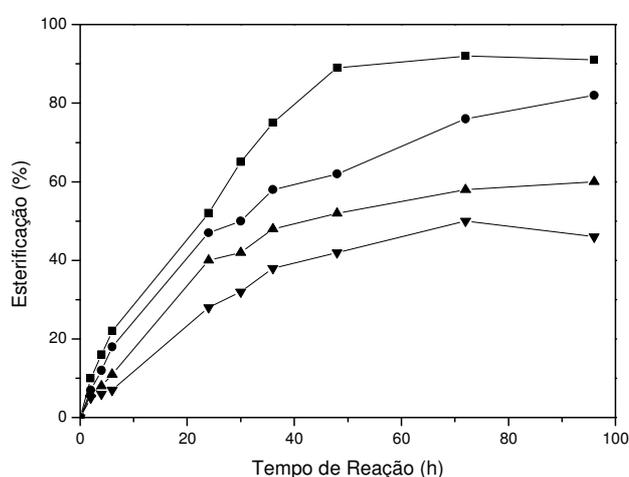


Figura 3.12 – Cinética das reações de esterificação com os alcoóis metílico e etílico. Condições reacionais: substratos em razão equimolecular (0,15mol), 5mL de ciclohexano, 35°C. (▲) butirato de etila, (●) propionato de metila, (▼) propionato de etila, (■) butirato de metila.

Fonte: ABBAS e COMEAU, 2003.

OLIVEIRA *et al.* (2004), estudaram a influência das variáveis no processo de alcoólise enzimática do óleo de mamona utilizando enzima Lipozyme IM como catalisador. Os experimentos foram conduzidos para se determinar os melhores rendimentos da reação, variando diversas condições experimentais como: temperatura da reação, concentração de enzima adicionada, razão estequiométrica de óleo e álcool, quantidade de água adicionada e tempo de reação. Os resultados demonstraram que a temperatura ótima para a reação foi por volta de 40°C, a concentração de enzima adicionada apresenta um resultado positivo sobre a reação, a quantidade de água apresentou um efeito negativo sobre a reação e houve inibição por excesso de substrato.

CHANG *et al.* (2003) sintetizaram o butirato de hexila, usando Lipozyme IM-77 (*Rhizomucor miehei*). Foram variados parâmetros reacionais como tempo de reação (2 a 10h), temperatura (25 a 65°C), quantidade de enzima (10 a 50% w/w^a), razão molar de ácido e álcool (1:1 a 3:1) e quantidade de água adicionada ao meio (0 a 20%^a). Os melhores resultados obtidos foram para um tempo de reação igual a 8,3 h, uma temperatura de 50°C, quantidade de enzima igual a 42,7%, razão molar de ácido e álcool 1,8:1 e quantidade de água adicionada de 12,6%.^a

3.3 - Modelos cinéticos para reações enzimáticas

Os objetivos da cinética enzimática são os seguintes (BORZANI, 2001):

- Medir as velocidades das reações que se processam;
- Estudar a influência de algumas variáveis reacionais, como temperatura, pH, concentração de reagentes e enzimas e substâncias que possam interferir na velocidade das reações;
- Estabelecer uma relação da velocidade das reações com os fatores que a influenciam;
- Colaborar na otimização do processo;

^a Porcentagem em massa referente ao peso total dos substratos.

- Estabelecer critérios para o controle do processo em questão;
- Gerar dados para o projeto de equipamentos.

A atividade de uma enzima é determinada pela concentração da enzima, concentração de substratos e se disponível, pela concentração de co-fatores, concentração e tipos de inibidores, pH e temperatura (WISEMAN, 1987).

Durante uma reação enzimática, mesmo mantendo-se constantes a temperatura e o pH, a concentração de substrato decresce e a concentração da enzima aumenta. Além disso, os produtos formados podem atuar como inibidores, reduzindo a atividade catalítica da enzima. Dessa forma, o único ponto em que as condições experimentais são conhecidas é o instante inicial. Por esse motivo, a velocidade da reação enzimática deve ser calculada, sempre que possível, no instante $t=0$, obtendo-se assim a velocidade inicial de formação de produto ou consumo de substrato (BORZANI *et al.*, 2001).

Entretanto, existem casos mais complexos em que a velocidade inicial não pode ser medida, ou porque não existe uma técnica experimental que permita acompanhar as variações das concentrações no sistema em estudo, ou porque a transformação não pode ser representada por uma equação química com reagentes e produtos bem definidos. A velocidade da reação, nesses casos, é frequentemente representada por uma velocidade média de consumo, ou de produção, de substâncias convenientemente escolhidas ou, ainda, de variação de uma propriedade do sistema (viscosidade, textura, absorvância, etc.) em um intervalo de tempo prefixado. O amolecimento de carnes pela adição da papaína é um exemplo de processo enzimático em que não há condições de medir uma velocidade inicial.

3.3.1 - Equação de Michaelis e Menten

A primeira tentativa de se estabelecer uma relação entre a velocidade inicial de uma reação enzimática em função da concentração inicial de substrato foi proposta por Michaelis e Menten (WISEMAN, 1987).

Quando realizamos ensaios, com diferentes quantidades de enzimas, para as mesmas condições experimentais, observa-se que até um certo ponto

a velocidade inicial da reação aumenta de forma linear com a concentração de enzima (BORZANI *et al.*, 2001), conforma observamos na Figura 3.13 abaixo:

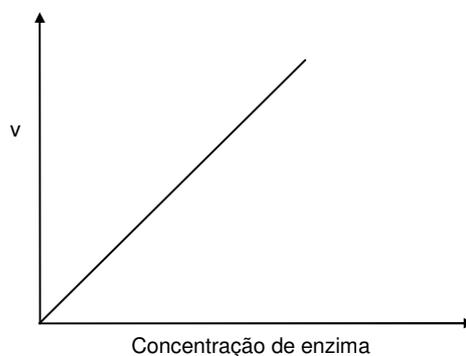


Figura 3.13 – Influência da concentração de enzima na velocidade inicial da reação.

Fonte: Modificado de BORZANI *et al.*, 2001.

Se os ensaios diferirem entre si pela concentração inicial dos substratos, mantendo constante todos os outros parâmetros, as velocidades iniciais para cada experimento sofrerão alterações. A velocidade da reação é função crescente até um determinado valor de concentração. Acima desse valor a velocidade atinge seu valor máximo permanecendo praticamente constante (BORZANI *et al.*, 2001).

O gráfico da Figura 3.14 representa de maneira esquemática o comportamento descrito anteriormente.

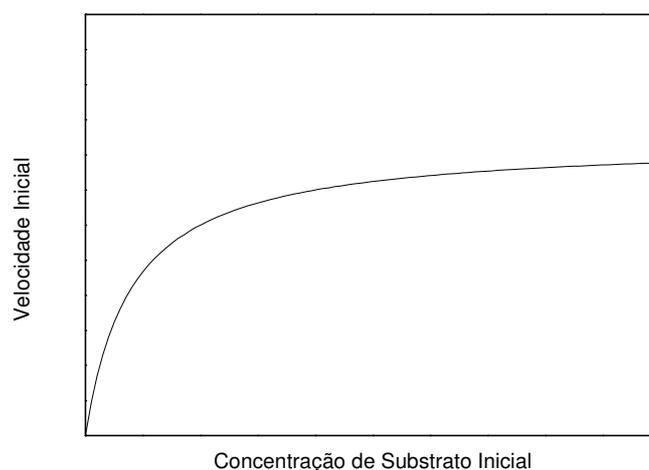


Figura 3.14 – Influência da concentração inicial de substrato na velocidade da reação enzimática.

Fonte: Modificado de BORZANI *et al.*, 2001.

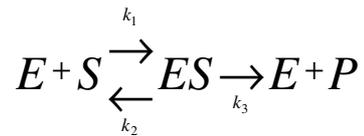
As hipóteses básicas para o modelo de Michaelis e Menten são as seguintes (BORZANI *et al.*, 2001):

- O substrato e a enzima reagem reversivelmente entre si formando um composto intermediário denominado *complexo enzima-substrato*;
- O complexo formado ou se decompõe, ou reage com outra substância regenerando a enzima e formando os produtos da reação;

Para o caso mais simples, são ainda admissíveis as seguintes hipóteses:

- A formação do complexo enzima-substrato se dá na proporção de 1 mol de substrato para 1 mol de enzima, produzindo 1 mol do complexo;
- O complexo formado se decompõe, sem reagir com outras substâncias existentes no sistema.

Esquemáticamente temos:



onde:

k_1 = constante de velocidade de formação do complexo ($L \cdot mol^{-1} \cdot min^{-1}$).

k_2 = constante de velocidade de dissociação do complexo (min^{-1}).

k_3 = constante de velocidade de decomposição do complexo formando o produto (min^{-1}).

Dessa forma:

$$\frac{dC_x}{dt} = k_1(C_e - C_x)(C_s - C_x) - k_2 \cdot C_x - k_3 \cdot C_x \quad (3.2)$$

onde:

C_s = Concentração inicial do substrato ($mol \cdot L^{-1}$).

C_e = Concentração inicial da enzima ($mol \cdot L^{-1}$).

C_x = Concentração do complexo no instante t ($mol \cdot L^{-1}$).

Admitindo que a concentração do substrato é muito maior que a da enzima, e portanto maior que a do complexo, a Equação (3.2) se torna:

$$\frac{dC_x}{dt} = k_1(C_e - C_x)C_s - (k_2 + k_3) \cdot C_x \quad (3.3)$$

Pela hipótese de Briggs e Haldane, a concentração do complexo se mantém constante após passar por um período transiente muito curto. Dessa forma, dC_x/dt pode ser considerado igual a zero. Assim, a Equação (3.3) fica:

$$C_x = \frac{k_1 \cdot C_e \cdot C_s}{k_2 + k_3 + k_1 \cdot C_s} = \frac{C_e \cdot C_s}{K_s + C_s} \quad (3.4)$$

de forma que:

$$K_s = (k_2 + k_3) / k_1 \quad (3.5)$$

A Equação (3.4) permite, agora, calcular a velocidade de formação do produto:

$$V = k_3 \cdot C_x = k_3 \cdot C_e \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (3.6)$$

Onde:

V = velocidade de formação do produto ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

O valor máximo da velocidade será alcançado quando toda a enzima se encontrar na forma de complexo, isto é, quando $C_x = C_e$. Indicando por V_{max} essa velocidade máxima, temos que $V_{max} = k_3 \cdot C_e$.

Dessa forma, a Equação (3.6) fica:

$$V = V_{max} \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (3.7)$$

O gráfico representando essa equação encontra-se na figura abaixo:

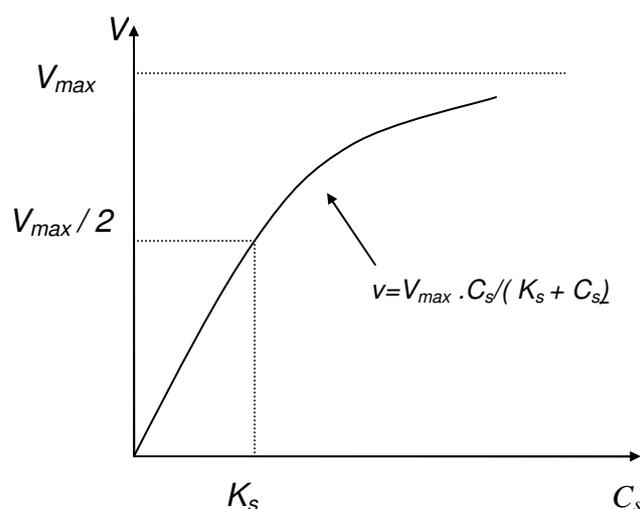


Figura 3.15 – Representação gráfica da equação de Michaelis e Menten.

Fonte: Modificado de BORZANI *et al.*, 2001

A constante K_s denominada constante de Michaelis da enzima é a concentração de substrato à qual corresponde uma velocidade igual à metade da máxima.

A determinação de K_s e V_{max} a partir de valores experimentais de C_s e V , pode ser realizada através de um método de linearização conhecido por método de Lineweaver-Burk. Ele consiste em inverter os dois lados da Equação (3.7) de modo a gerar (LEVENSPIEL, 2000):

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_s}{V_{max}} \cdot \frac{1}{C_s}$$

(3.8)

Graficamente podemos determinar os parâmetros da equação por regressão linear. O gráfico a seguir mostra de forma esquemática como fazer essa determinação:

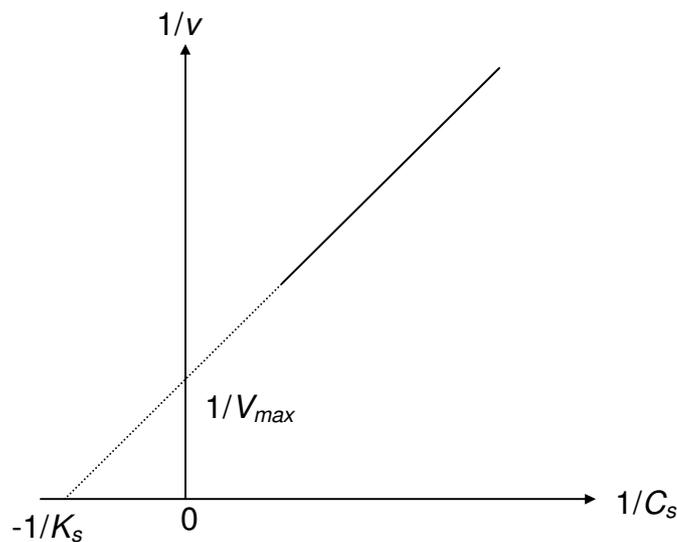


Figura 3.16 – Representação esquemática da determinação dos parâmetros da equação de Michaelis e Mentem através do método de Lineweaver-Burk.

Fonte: BORZANI *et al.*, 2001

3.3.2 - Modelos envolvendo inibição

O estudo da inibição enzimática é de extrema importância para maximização da atividade enzimática em um sistema reacional. Quatro tipos de inibição podem ser considerados (WISEMAN, 1987):

- Inibição irreversível;
- Inibição reversível competitiva;
- Inibição reversível não competitiva;
- Inibição reversível pelo substrato;

A inibição irreversível ocorre quando a molécula inibidora se combina irreversivelmente com a enzima, modificando sua estrutura e provocando uma grande redução na atividade enzimática (REHM *et al.*, 1995).

Segundo WISEMAN (1987), na inibição competitiva ocorre uma competição do inibidor com o substrato normal da reação pelo sítio ativo da enzima.

É possível reduzir a influência do inibidor nesse tipo de inibição quando trabalha-se com altas concentrações de substrato. Um exemplo de inibição competitiva é o observado na hidrólise da sacarose, catalisada pela invertase. A inibição, provocada pela alfadextrina na hidrólise de amido catalisada pela alfaamilase, é outro exemplo de inibição competitiva (BORZANI *et al.*, 2001).

Na inibição não competitiva, o inibidor não compete com o substrato pelo sítio ativo, mas ocupa outros sítios ativos da enzima. Nesse processo um excesso de substrato não é capaz de minimizar os efeitos inibitórios (WISEMAN, 1987; BORZANI *et al.*, 2001).

A inibição pelo substrato é menos comum, mas ocorre a altas concentrações de substrato. Ela ocorre quando o substrato se liga a sítios não ativos da enzima, alterando a conformação dos sítios ativos, causando uma diminuição na atividade da enzima (REHM *et al.*, 1995).

Os modelos matemáticos a seguir representam classicamente as equações de Michaelis e Mentem, modificadas devido à presença de inibidores no sistema reacional (SHULER e KARGI, 1992):

- *Modelo para inibição competitiva*

$$V = \frac{V_m C_s}{C_s + K_s \left(1 + \frac{C_i}{K_i}\right)} \quad (3.9)$$

Nesse caso, a presença de um inibidor altera o valor de K_s , aumentando o valor dessa constante para um valor K_{sapp} .

$$K_s \cdot \left(1 + \frac{C_i}{K_i}\right) = K_{sapp} \quad (3.10)$$

$$V = \frac{V_{\max} C_s}{C_s + K_{sapp}} \quad (3.11)$$

- *Modelo para inibição não competitiva*

$$V = \frac{V_m C_s}{\left(1 + \frac{C_i}{K_i}\right) \cdot (C_s + K_s)} \quad (3.12)$$

Na equação acima a presença de um inibidor altera o valor de V_m , diminuindo o seu valor para um outro V_{mapp} .

$$\frac{V_m}{\left(1 + \frac{C_i}{K_i}\right)} = V_{mapp} \quad (3.13)$$

$$V = \frac{V_{mapp} \cdot C_s}{C_s + K_s} \quad (3.14)$$

- Modelo clássico para inibição pelo substrato

$$V = \frac{V_m C_s}{C_s + K_s + \frac{C_s^2}{K_i}} \quad (3.13)$$

Para baixas concentrações de substrato, o termo de inibição praticamente é desprezível e a equação fica semelhante à de Michaelis e Menten.

- Modelo de inibição pelo substrato proposto por Wu e colaboradores (SCHIMIDELL *et al.*, 2000)

$$v = V_m \frac{1}{1 + \frac{K_s}{C_s} + \left(\frac{C_s}{K_i}\right)^n} \quad (3.14)$$

Esse modelo é utilizado em cinéticas de fermentação onde concentrações elevadas de substrato diminuem de maneira intensa a velocidade inicial da reação.

onde:

v = velocidade de formação do produto ($\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

V_m = parâmetro da equação ($\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

C_s = concentração de substrato (mol.L^{-1}).

K_s = parâmetro da equação (mol.L^{-1})

K_i = constante de inibição (mol.L^{-1})

n = parâmetro da equação

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - MATERIAL

4.1.1 - Reagentes utilizados na síntese

No presente trabalho o éster escolhido para estudo foi o *Octanoato de Pentila*, obtido a partir da esterificação direta do *Ácido Octanóico* com *Pentanol*, utilizando *n*-hexano como solvente externo. A seleção desse composto reside no fato de o mesmo ser sintetizado com elevadas conversões, segundo resultados preliminares obtidos por JOÃO e ZANELLA (2000). Assim, os reagentes utilizados na síntese foram:

- *Ácido Octanóico*, P.A. da MERCK®;
- *n*- *Pentanol* P.A. da MERCK®;
- *n*-*Hexano* P.A. da MERCK®;

4.1.2 - Reagentes utilizados nas análises de titulação volumétrica

A determinação do conteúdo de *ácido octanóico* no meio reacional foi realizada utilizando-se a técnica de Titulação Volumétrica. Durante a execução do método foram utilizadas soluções titulantes de concentração 0,01 mol.L⁻¹ e 0,02 mol.L⁻¹ de *KOH* (hidróxido de potássio) P.A. da NUCLEAR® dissolvidos em solução alcoólica 96 °GL da NUCLEAR®.

As soluções de base foram padronizadas com *Hidrogeno-Ftalato de Potássio* P.A. da MERCK®. O indicador ácido-base utilizado nas titulações foi *Fenolftaleína* da MERCK®.

4.1.3 - Reagentes empregados nas análises de FTIR

Para a realização das análises de Infravermelho, foram confeccionados discos comprimidos de *KBr* (Brometo de Potássio) P.A. da FLUKA[®].

4.1.4 - Enzima utilizada nas sínteses

Para a síntese do *Octanoato de Pentila*, foi utilizada a enzima Lipozyme[®] TL IM, gentilmente cedida pela NOVOZYMES, localizada em Araucária, Paraná. Essa enzima é produzida por fermentação a partir de *Thermomyces lanuginosus*. É imobilizada em resina fenólica e adequada para aplicação em reatores de leito fixo, pelo fato de ser granulada. É recomendável o uso em solventes orgânicos, uma vez que em meio aquoso, o suporte pode sofrer solvatação.

As principais características técnicas dessa enzima são as seguintes:

- Atividade Catalítica: 75 IUN.g⁻¹ b;
- Densidade do Meio: 0,54g.mL⁻¹;
- Diâmetro de Partícula: 0,3 – 1,0mm;
- Conteúdo de água: 5% (m/m);

4.1.5 - Equipamentos utilizados para as sínteses

As reações foram conduzidas em erlenmeyers de vidro, com capacidade para 125mL, fechados com rolhas envolvidas com papel alumínio. Para fornecer condições estáveis de temperatura e velocidade de agitação ao meio reacional, foi utilizado um banho-maria do tipo DUB-NOFF, conforme podemos observar na Figura 4.1 a seguir.

^b Uma Unidade de Interesterificação (IUN) é definida como a conversão de 0,01% (m/m) de triestearato de glicerina/minuto utilizando como substrato óleo vegetal hidrogenado/óleo vegetal bruto (27/73% (w/w)) a 70°C com concentração de enzima igual a 10% (w/w).



Figura 4.1 – Banho-maria tipo DUB-NOFF utilizado para conduzir a síntese do éster.

4.1.6 - Equipamento utilizado para a determinação da concentração de ácido octanóico

Para a determinação por titulação volumétrica da quantidade de ácido octanóico presente no meio reacional, foi utilizada uma bureta volumétrica digital com capacidade para 50 mL e com duas casas decimais de precisão, conforme a Figura 4.2 a seguir.



Figura 4.2 – Bureta digital utilizada nas titulações ácido-base.

4.1.7 - Equipamento utilizado para a caracterização do éster

Para a caracterização do éster foi utilizado um Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier, da Perkin Elmer (Figura 4.3).



Figura 4.3 – Espectrofotômetro de Infravermelho utilizado para a caracterização do éster.

4.2 - Métodos

4.2.1 - Preparação do meio reacional

A síntese do éster foi realizada em diferentes condições de concentração de substrato ($0,1$ a $0,95 \text{ mol.L}^{-1}$) e temperatura (30 , 40 e 50°C). Foram mantidos parâmetros reacionais constantes, como a razão estequiométrica de álcool/ácido, fixada em $1:1$, a quantidade de enzima adicionada no meio, que foi de $10\% \text{ (m/m)}^c$ para todos os ensaios e não foi adicionada quantidade alguma de água ao meio.

A mistura reacional era preparada em balões volumétricos de 10mL , e em seguida submetida à análise do teor de ácido octanóico por titulação. A partir da determinação da concentração real de ácido octanóico, a enzima mantida sob refrigeração, era pesada em uma balança analítica de precisão e adicionada ao erlenmeyer, isento dos reagentes dissolvidos no solvente. Antes de adicionar a mistura reacional no interior do erlenmeyer juntamente com a enzima, ambos eram aquecidos em banho-maria, na temperatura atual do teste, para que as condições termodinâmicas de estudo fossem mantidas desde o início da reação.

^c (m/m) indica a quantidade de enzima em massa, referente à quantidade total dos reagentes.

A partir disso, a reação era conduzida por 40 minutos, em banho Maria, sob rotação constante de aproximadamente 70 rpm.

4.2.2 - Determinação do grau de avanço da reação

A determinação da quantidade de ácido octanóico na reação foi feita por titulação volumétrica do tipo ácido-base, sendo um indicativo do avanço de conversão do ácido em éster ao longo do tempo. Embora a reação ocorra com dois substratos, esses eram consumidos com a mesma velocidade pelo fato de a reação ocorrer na razão molar de 1:1, permitindo a concentração de ácido octanóico representar a concentração de substratos.

Para tanto, foram utilizadas duas soluções de KOH, dissolvido em solução alcoólica, com concentrações de 0,01 mol.L⁻¹ e 0,02 mol.L⁻¹. Essas duas concentrações foram estabelecidas para gerarem um consumo razoável de solução titulante, sendo que para as reações conduzidas com quantidade inicial de substrato de 0,5 mol.L⁻¹ foi utilizada a solução mais diluída e para concentrações iniciais maiores foi utilizada a outra solução.

O indicador fenolftaleína foi adicionado na solução de KOH, pois se trata de um ácido fraco, e devido à baixa concentração de trabalho, poderia consumir uma quantidade apreciável de base durante a titulação, caso fosse adicionado com a solução de ácido a ser titulada. Assim, após a solução de KOH receber o indicador fenolftaleína, essa era padronizada com Hidrogeno-ftalato de potássio para determinar a concentração real da solução de base preparada.

Alíquotas de 200 µL eram retiradas do meio reacional a cada 10 minutos para análise e diluídas para 2 mL com solução alcoólica 96 °GL.

A quantidade de ácido remanescente na reação foi determinada pela seguinte equação:

$$C_s = \frac{C_b \cdot V_b}{V_a} \quad (4.1)$$

onde:

C_s = Concentração de ácido octanóico (substrato) no meio reacional (mol.L^{-1}).

C_b = Concentração de solução de KOH utilizada na titulação (mol.L^{-1});

V_a = Volume de amostra (mL).

V_b = Volume de solução de KOH consumida na titulação (mL).

Com os dados obtidos, foram construídos gráficos que relacionam a concentração de ácido octanóico restante na solução em determinado instante.

4.2.3 - Caracterização do éster

Para determinar qualitativamente a geração do éster no meio reacional, foram retiradas alíquotas do meio reacional e realizadas análises de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier. Para a realização desse teste, eram preparados discos comprimidos de KBr (Brometo de Potássio).

Os gráficos gerados indicam a absorvância gerada por certos grupos funcionais em função de seu número de onda, dado em cm^{-1} . Para ácidos carboxílicos saturados, a deformação axial do grupo C=O se situa entre 1700 e 1725 cm^{-1} . Para ésteres derivados desse tipo de ácido, a absorção do grupo C=O se situa entre 1735 e 1750 cm^{-1} . Dessa forma, podemos perceber o avanço da esterificação através da diminuição da absorvância do grupo referente ao ácido carboxílico e o conseqüente aumento na absorvância referente ao éster (MORRISON e BOYD, 1996; SILVERSTEIN, 1997).

O gráfico da Figura 4.4 apresenta um exemplo de espectro que pode ser obtido no decorrer de uma reação de esterificação.

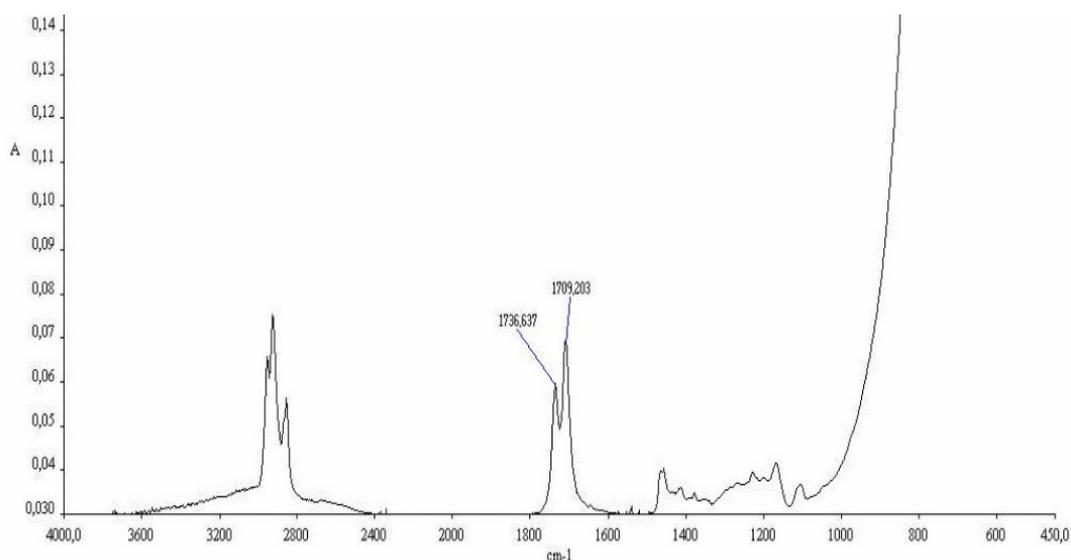


Figura 4.4 – Exemplo de espectro de Infravermelho mostrando os picos referentes a deformação axial da ligação C=O no éster ($1736,637\text{ cm}^{-1}$) e no ácido ($1709,203\text{ cm}^{-1}$).

4.2.4 - Avaliação da capacidade de reutilização do catalisador

Para avaliar o número de reutilizações possíveis para o catalisador, foram realizadas bateladas de 1h de duração, preparadas com a adição de *n*-pentanol e ácido octanóico na razão de 1:1 na concentração de $0,65\text{ mol.L}^{-1}$, utilizando *n*-hexano como solvente. As reações foram conduzidas em banho-maria DUB-NOFF sob agitação constante de 70rpm nas temperaturas de 30, 40 e 50°C .

Entre uma batelada e outra, a enzima utilizada era filtrada em papel filtro quantitativo, e lavada com 20 mL de *n*-hexano por três vezes para remover vestígios remanescentes da batelada anterior para que fosse possível utilizá-la na batelada seguinte.

O parâmetro de avaliação escolhido foi o percentual de conversão obtido ao final da titulação, determinada por titulação ácido-base.

4.2.5 - Determinação das velocidades iniciais

Para determinar a velocidade inicial alcançada pela reação para cada concentração inicial de substratos foram inicialmente realizados ajustes lineares (Equação 4.2) com o objetivo de descrever matematicamente o

consumo de ácido octanóico durante os instantes iniciais da síntese. O coeficiente angular da reta obtida representa a velocidade média da reação durante o intervalo de tempo considerado.

$$C_s = a.t + b \quad (4.2)$$

onde:

C_s = Concentração de ácido octanóico (mol.L⁻¹);

t = Tempo de reação (min);

a = Coeficiente angular da reta (mol.L⁻¹.min⁻¹);

b = Coeficiente linear da reta (mol.L⁻¹);

4.2.6 - Ajuste de modelos cinéticos

Para descrever matematicamente a influência da concentração inicial dos substratos na velocidade inicial da reação, foram utilizados modelos matemáticos de inibição por substrato descritos na literatura.

Os dois modelos utilizados foram (SCHIMIDELL, 2000):

- Modelo clássico de inibição:
$$v = V_m \frac{C_s}{C_s + K_s + \frac{C_s^2}{K_i}} \quad (3.13)$$

- Modelo proposto por WU e colaboradores para cinética de fermentação:

$$v = V_m \frac{1}{1 + \frac{K_s}{C_s} + \left(\frac{C_s}{K_i}\right)^n} \quad (3.14)$$

onde:

v = velocidade de formação do produto (mol.L⁻¹.min⁻¹).

V_m = parâmetro da equação (mol.L⁻¹.min⁻¹).

C_s = concentração de substrato (mol.L^{-1}).

K_s = parâmetro da equação (mol.L^{-1}).

K_i = constante de inibição (mol.L^{-1}).

n = parâmetro da equação.

Para a determinação dos parâmetros, V_m , K_s e K_i , foi utilizado o software STATISTICA[®] for Windows versão 5.1 da Stat Soft, na qual foi aplicado o método Hooke-Jeeves.

Como critério de convergência para o método, foi estabelecido um valor de 0,0001 como resultado da função objetivo $\Sigma([\text{valor observado} - \text{valor modelo}]^2)$.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Cinéticas obtidas nas reações de esterificação

Para o estudo das cinéticas de esterificação do ácido octanóico com o *n*-pentanol foram realizados ensaios bateladas como descrito na seção 4.2.1. Foram preparadas (nove) soluções reacionais com concentrações iniciais de substratos distintas, que variaram de 0,1 a 0,95 mol.L⁻¹. As reações foram conduzidas nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C. Na Tabela 5.1, encontramos de forma resumida, os valores trabalhados para as concentrações iniciais.

Tabela 5.1 – Concentrações iniciais de substrato utilizadas nos experimentos, determinadas após a titulação volumétrica com solução alcoólica de KOH para as diversas temperaturas de reação estudadas.

Experimento	Concentração (mol.L ⁻¹)		
	30 °C	40 °C	50 °C
1	0,102	0,101	0,103
2	0,195	0,190	0,188
3	0,297	0,286	0,286
4	0,380	0,400	0,371
5	0,561	0,564	0,460
6	0,642	0,675	0,563
7	0,731	0,758	0,655
8	0,817	0,860	0,740
9	0,900	0,943	0,810

Os resultados obtidos para as cinéticas nas diversas temperaturas encontram-se nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 a seguir. Em cada curva foi realizado um ajuste linear e determinado seu coeficiente de correlação com os pontos experimentais. Esses valores se situam nas Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4.

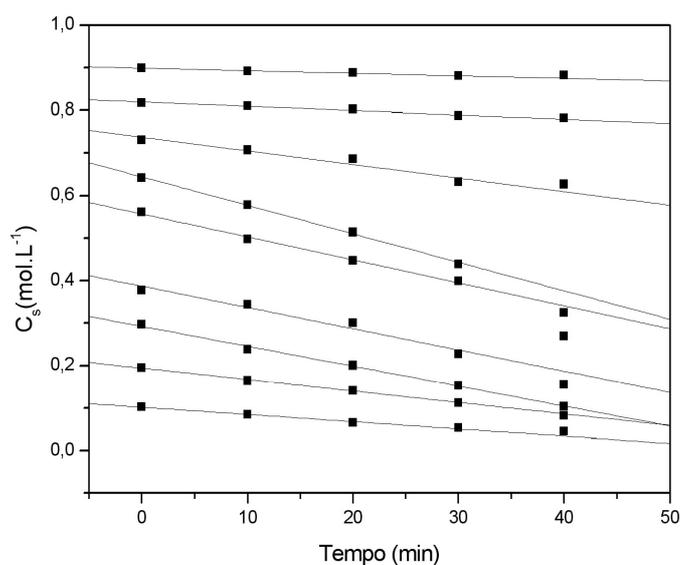


Figura 5.1 – Cinéticas de esterificação do ácido octanoico pelo *n*-pentanol em *n*-hexano, catalisada pela enzima Lipozyme® TL IM, obtidas para a temperatura de 30°C em banho-maria tipo DUB-NOFF agitado a 70rpm.

Tabela 5.2 – Parâmetros obtidos para a equação de ajuste e coeficiente de correlação para as cinéticas conduzidas a 30°C.

Experimento	Parâmetro		
	$a \cdot 10^3$ (mol.L ⁻¹ .min ⁻¹)	b (mol.L ⁻¹)	R ²
1	1,7	0,102	0,991
2	2,7	0,194	0,998
3	4,7	0,292	0,993
4	5,0	0,387	0,968
5	5,4	0,557	0,995
6	6,7	0,644	0,998
7	3,2	0,737	0,947
8	1,0	0,819	0,959
9	0,6	0,899	0,970

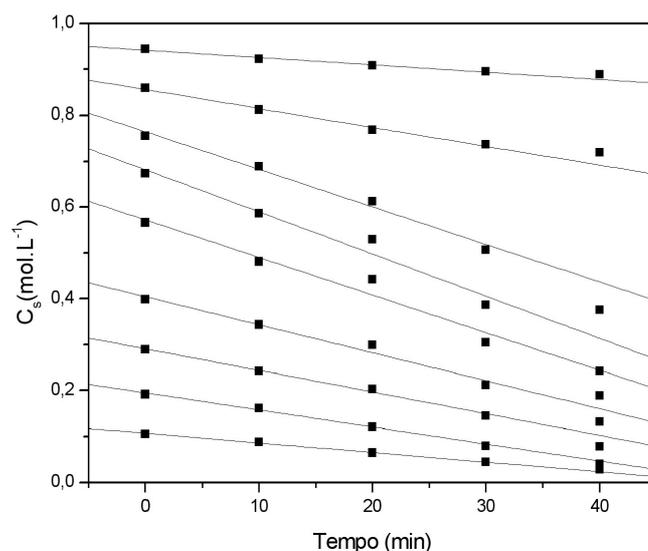


Figura 5.2 – Cinéticas de esterificação do ácido octanoico pelo *n*-pentanol em *n*-hexano, catalisada pela enzima Lipozyme[®] TL IM, obtidas para a temperatura de 40°C em banho-maria tipo DUB-NOFF agitado a 70rpm.

Tabela 5.3 – Parâmetros obtidos para a equação de ajuste e coeficiente de correlação para as cinéticas conduzidas a 40°C.

Ponto	Parâmetro		
	$a \cdot 10^3$ (mol.L ⁻¹ .min ⁻¹)	b (mol.L ⁻¹)	R ²
1	2,1	0,107	0,996
2	3,7	0,195	0,995
3	4,7	0,291	0,994
4	6,1	0,402	0,980
5	8,2	0,572	0,966
6	9,2	0,682	0,988
7	8,2	0,765	0,943
8	4,1	0,856	0,992
9	1,6	0,942	0,982

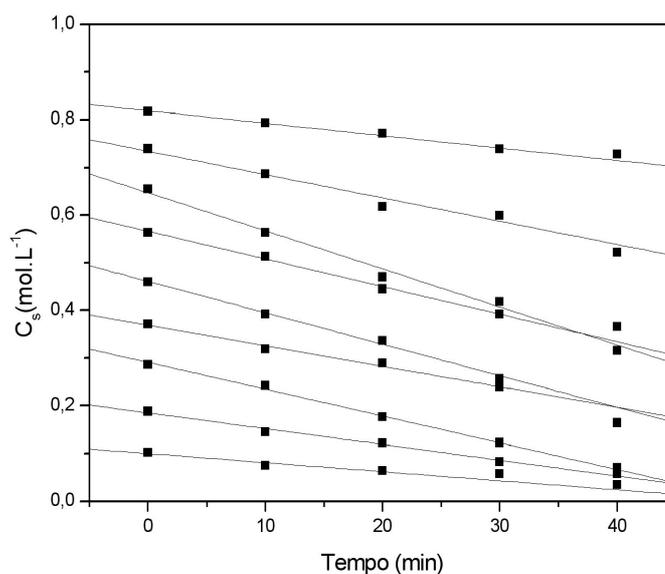


Figura 5.3 – Cinéticas de esterificação do ácido octanoico pelo *n*-pentanol em *n*-hexano, catalisada pela enzima Lipozyme[®] TL IM, obtidas para a temperatura de 50°C em banho-maria tipo DUB-NOFF agitado a 70rpm.

Tabela 5.4 – Parâmetros obtidos para a equação de ajuste e coeficiente de correlação para as cinéticas conduzidas a 50°C.

Ponto	Parâmetro		
	$a \cdot 10^3$ (mol.L ⁻¹ .min ⁻¹)	b (mol.L ⁻¹)	R ²
1	1,9	0,100	0,944
2	3,3	0,185	0,969
3	4,3	0,368	0,990
4	5,6	0,291	0,995
5	6,6	0,461	0,996
6	5,8	0,566	0,997
7	8,0	0,647	0,985
8	4,9	0,734	0,960
9	2,6	0,820	0,990

Os resultados obtidos para os ajustes das curvas cinéticas com os dados experimentais apresentaram uma boa correlação, variando de aproximadamente 0,940 à 1,000. Isso indica que a velocidade da reação no

intervalo de tempo investigado pode ser descrita por uma lei de ordem zero (Equação 4.2)

Procurou-se explorar técnicas para análise quantitativa da concentração de ácido octanóico e/ou éster nas amostras, através de cromatografia gasosa e infravermelho, mas não se teve uma boa reprodutibilidade dos resultados.

Para as análises de infravermelho o resultado não foi alcançado pelo fato de a técnica exigir a inserção da amostra em um local específico, através de gotejamento, que dificilmente consegue ser reprodutível. Assim, a quantidade de amostra inserida no equipamento para análise sofria bastante variação.

Com relação à cromatografia gasosa, o tempo de análise além de ser bastante longo, exige um maior tempo para otimização da técnica de análise.

Concentrações iniciais dos substratos próximas de $1,00 \text{ mol.L}^{-1}$ foram exploradas, porém as velocidades de reação apresentadas foram extremamente baixas, não provocando mudanças detectáveis na concentração do ácido octanóico pelo método de análise por titulação volumétrica.

5.2 - Representação gráfica da influência da concentração inicial de substrato na velocidade inicial da reação

Para se determinar a velocidade inicial para as diversas concentrações iniciais de substrato, foi aplicado o método discutido na seção 4.2.5. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.5.

Tabela 5.5 – Velocidades iniciais determinadas para as diversas concentrações iniciais. Na tabela C_s é dado em mol.L^{-1} e V em $\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Ponto	30 °C		40 °C		50 °C	
	C_s	$V.10^3$	C_s	$V.10^3$	C_s	$V.10^3$
1	0,102	1,7	0,101	2,1	0,103	1,9
2	0,195	2,7	0,190	3,7	0,188	3,3
3	0,297	4,7	0,286	4,7	0,286	4,3
4	0,380	5,0	0,400	6,1	0,371	5,6
5	0,561	5,4	0,564	8,2	0,460	6,6
6	0,642	6,7	0,675	9,2	0,563	5,8
7	0,731	3,2	0,758	8,2	0,655	8,0
8	0,817	1,0	0,860	4,1	0,740	4,9
9	0,900	0,6	0,943	1,6	0,810	2,6

A partir dessa tabela foi possível traçar o gráfico apresentado na Figura 5.4 a seguir.

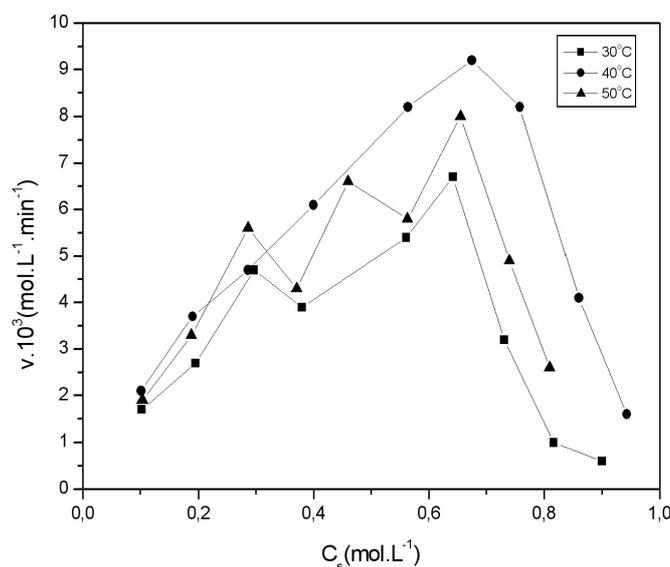


Figura 5.4- Influência da concentração inicial de substrato sobre a velocidade inicial da reação de obtenção do octanoato de *n*-pentila em *n*-hexano, catalisada pela enzima Lipozyme® TL IM conduzida a 30, 40 e 50 °C em banho-maria tipo DUB-NOFF a 70 rpm.

Os resultados demonstram que até um determinado ponto, a velocidade inicial da reação é função direta da concentração inicial dos substratos. Entretanto, para concentrações muito altas a enzima sofre inibição pelo substrato. Esse fato é bastante comum com lipases, quando atuam em reações onde alcoóis fazem parte dela.

Além disso, podemos perceber que a concentração onde ocorre inibição é um parâmetro independente da temperatura, uma vez que nos três valores estudados (30, 40 e 50 °C) a inibição ocorre para valores acima de 0,65 mol.L⁻¹ aproximadamente. Para valores próximos a 1,00 mol.L⁻¹ a reação é bastante lenta ou até mesmo inexistente, uma vez que não foi possível detectar sinal do avanço da reação pelas técnicas de titulação volumétrica e espectroscopia de infravermelho.

Com relação à velocidade máxima alcançada, podemos perceber que de 30 para 40 °C ocorre um aumento significativo no valor máximo alcançado, partindo de 6,7 e alcançando 9,2 mol.L⁻¹.min⁻¹. Isso pode ser atribuído a maior mobilidade das moléculas no meio reacional em temperaturas maiores, favorecendo o número de choques efetivos para a fixação dos substratos no sítio ativo da enzima.

Para a temperatura de 50 °C a enzima apresentou uma atividade menor para a catálise da reação do que aquela observada a temperatura de 40 °C, embora a ficha técnica da enzima apresente que sua temperatura ótima se situa entre 55 e 70 °C. Outros trabalhos encontrados na literatura (OLIVEIRA *et al* (2004), GHANDI *et al.* (1995)) demonstram que esse valor de temperatura se situa por volta de 40 °C. Uma explicação para esse fenômeno pode estar ligada ao fato da reação padrão, utilizada para gerar os dados presentes na ficha técnica, ter sido efetuada com substratos pouco danosos à enzima. Os compostos utilizados nos trabalhos no qual se obteve a menor temperatura para a atividade máxima da enzima são diferentes e provavelmente mais agressivos, sobretudo a altas temperaturas, onde a interação deles com a enzima é maior.

Para a temperatura de 60 °C, não foi possível realizar uma avaliação quantitativa para a síntese em questão, pelo fato de o solvente apresentar uma pressão de vapor elevada nessa temperatura, intensificando em muito a taxa de evaporação do solvente e mascarando de certa forma as medidas de concentração dos compostos presentes no meio reacional.

5.3 – Ajuste dos modelos cinéticos

Com o objetivo de estabelecer uma relação matemática entre a concentração inicial dos substratos e a velocidade inicial da reação, foram ajustados modelos matemáticos encontrados na literatura aos resultados experimentais, e determinados seus parâmetros.

O primeiro modelo a ser testado, foi o modelo clássico de inibição pelo substrato (Equação 3.12) conforme apresentado na seção 4.2.6. Os resultados obtidos encontram-se nos gráficos das Figuras 5.5, 5.6 e 5.7 a seguir.

$$V = V_m \frac{C_s}{C_s + K_s + \frac{C_s^2}{K_i}} \quad (3.13)$$

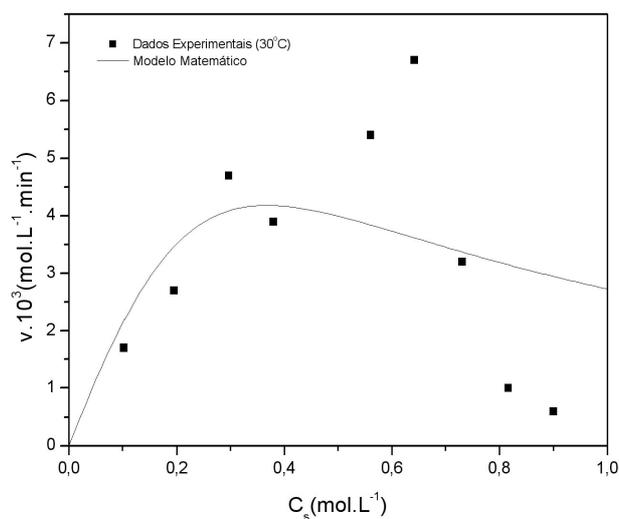


Figura 5.5 – Ajuste do modelo matemático clássico de inibição aos dados experimentais obtidos a partir das reações realizadas na temperatura de 30°C.

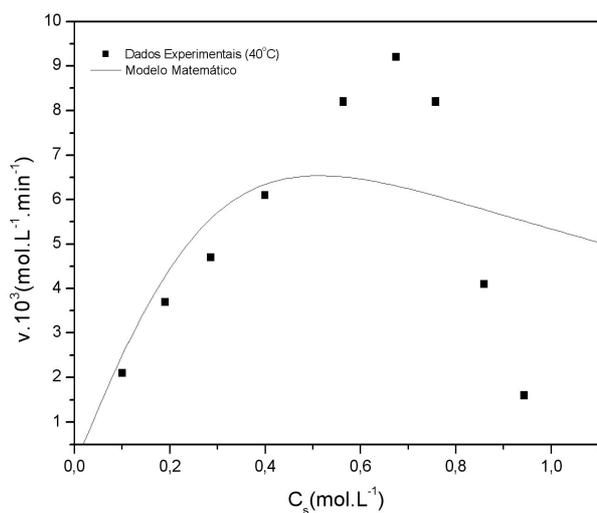


Figura 5.6 – Ajuste do modelo matemático clássico de inibição aos dados experimentais obtidos a partir das reações realizadas na temperatura de 40°C.

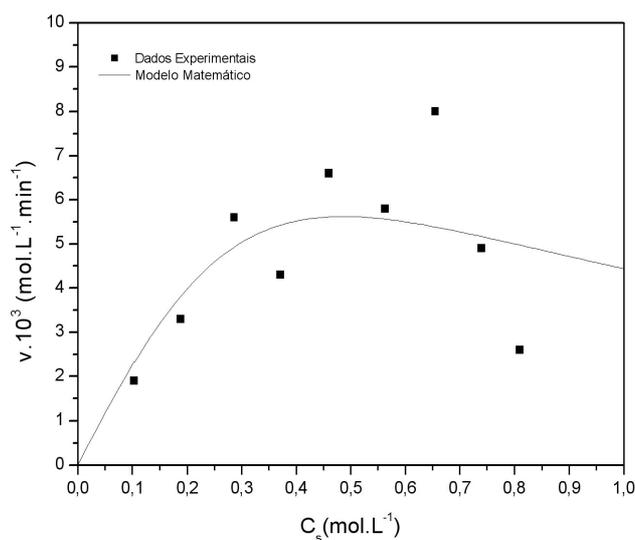


Figura 5.7 – Ajuste do modelo matemático clássico de inibição aos dados experimentais obtidos a partir das reações realizadas na temperatura de 50°C.

Os parâmetros dos modelos e os respectivos coeficientes de correlação entre os dados obtidos experimentalmente e os gerados pelo modelo matemático encontram-se na Tabela 5.6 a seguir.

Tabela 5.6 – Parâmetros obtidos para os modelos matemáticos.

$T(^{\circ}\text{C})$	Parâmetro			
	$V_{max}(\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1})$	$K_s(\text{mol.L}^{-1})$	$K_i(\text{mol}^2.\text{L}^{-2})$	R^2
30	0,218	9,416	0,0144	0,571
40	0,348	13,418	0,0197	0,604
50	0,254	10,738	0,0222	0,557

Através dos resultados obtidos podemos perceber que o modelo matemático utilizado não apresentou uma boa correlação com os resultados experimentais, justificados pelos baixos coeficientes de correlação. O aspecto da curva apresentada pelo modelo matemático nos leva a pensar que essa equação descreve melhor, processos onde a velocidade da reação é reduzida de maneira suave devido ao aumento da concentração inicial de substrato.

Além disso, pela má adequação demonstrada pelo modelo matemático nada podemos concluir com relação à influência exercida pela temperatura sobre os parâmetros determinados.

Em função dos resultados obtidos, os dados experimentais obtidos foram também submetidos a ajustes pelo modelo proposto por Wu e colaboradores (Equação 3.14) discutido na seção 4.2.6. As Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 a seguir ilustram a adequação desse modelo aos dados experimentais.

$$v = V_m \frac{1}{1 + \frac{K_s}{C_s} + \left(\frac{C_s}{K_i}\right)^n} \quad (3.14)$$

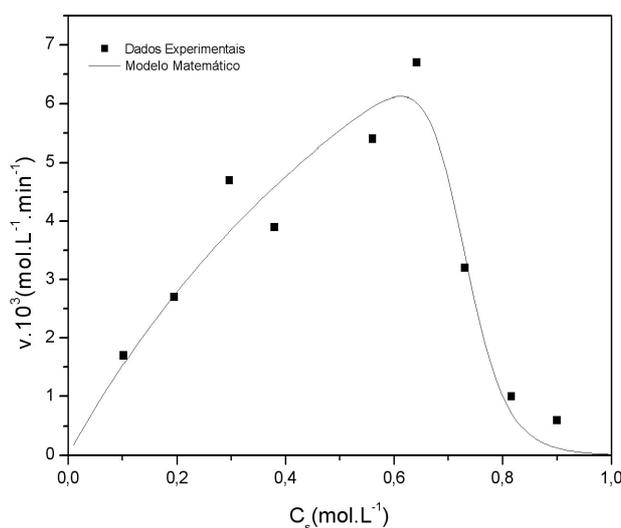


Figura 5.8 – Ajuste do modelo matemático proposto por Wu e colaboradores aos dados experimentais obtidos a partir das reações realizadas na temperatura de 30°C.

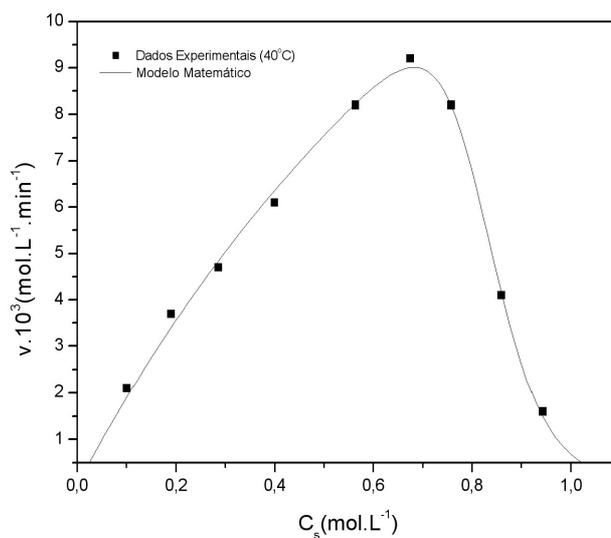


Figura 5.9 – Ajuste do modelo matemático proposto por Wu e colaboradores aos dados experimentais obtidos a partir das reações realizadas na temperatura de 40°C.

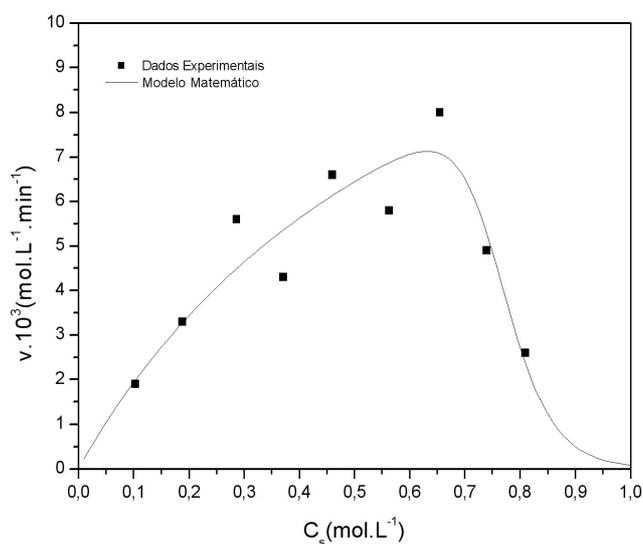


Figura 5.10 – Ajuste do modelo matemático proposto por Wu e colaboradores aos dados experimentais obtidos a partir das reações realizadas na temperatura de 50°C.

A Tabela 5.7 apresenta os parâmetros obtidos após o ajuste dos modelos matemáticos aos dados experimentais obtidos nas diversas temperaturas.

Tabela 5.7 – Parâmetros obtidos para o modelo matemático proposto por Wu e colaboradores para as temperaturas de realização das reações.

$T (^{\circ}\text{C})$	Parâmetro				n	R^2
	V_{max} (mol.L ⁻¹ .min ⁻¹)	K_s (mol.L ⁻¹)	K_i (mol.L ⁻¹)			
30	0,0163	0,969	0,698		19,24	0,963
40	0,0298	1,473	0,777		14,76	0,998
50	0,0155	0,702	0,741		17,34	0,919

Através dos resultados obtidos, observamos que os modelos modificados se adaptam com maior sucesso aos dados experimentais quando comparados com o modelo clássico de inibição, levando em conta os valores de coeficiente de correlação.

O parâmetro n aparentou um valor médio de $17,11 \pm 1,83$. Considerando o desvio do valor médio de aproximadamente 10% e levando em conta a existência de possíveis erros experimentais, podemos perceber que não ocorreu uma variação significativa desse parâmetro quando modificamos a temperatura da reação, o que nos leva a acreditar que n não possui relação direta com essa variável. A escassez de dados na literatura a respeito do significado físico desse parâmetro induz a realização de um maior número de experimentos de forma a gerar conclusões a respeito da sua relação com a reação.

Para V_m percebemos que ele tem relação direta com a influência da temperatura na velocidade da reação. Quando modificamos o valor da temperatura de 30 para 40 °C, aumentamos o valor do parâmetro de 0,0163 para 0,0298 mol.L⁻¹.min⁻¹, ou seja, aumentamos em quase duas vezes seu valor. Além disso, quando partimos para 50 °C, encontramos um valor de 0,0155 mol.L⁻¹.min⁻¹. Provavelmente, devido ao coeficiente de correlação para o ajuste dos dados a 50 °C não ter sido tão elevado, o valor encontrado para o

parâmetro pode ser um pouco diferente daquele que seria determinado com ajustes melhores. Esse comportamento é observado com relação a velocidade máxima alcançada pela reação, que possui valores de 0,0067, 0,0092 e 0,0080 mol.L⁻¹.min⁻¹ para as temperaturas de 30, 40 e 50 °C respectivamente. Dessa forma, o parâmetro em questão provavelmente acompanha a influência que a temperatura causa na velocidade máxima da reação, mas não representa numericamente seu valor.

Com relação à K_s , podemos observar que ele possui relação direta com o parâmetro V_{max} , ou seja, quando aumentamos o valor da velocidade máxima atingida pela reação, o valor de K_s acompanha esse aumento.

Para K_i encontramos um valor médio de $0,738 \pm 0,032$ mol.L⁻¹. Como o desvio se encontra por volta de apenas 4 % podemos afirmar que ele assume um valor constante para todos os valores de temperatura. Matematicamente é próximo dos valores de concentração inicial de substrato a partir do qual se observa uma queda na velocidade inicial da reação devido à inibição pelo substrato.

5.4 - Acompanhamento da reação através de espectroscopia de infravermelho

O acompanhamento da reação de forma qualitativa através de espectros de infravermelho foi discutida na seção 4.2.3. Os gráficos das figuras a seguir demonstram o avanço da reação em diferentes instantes da reação.

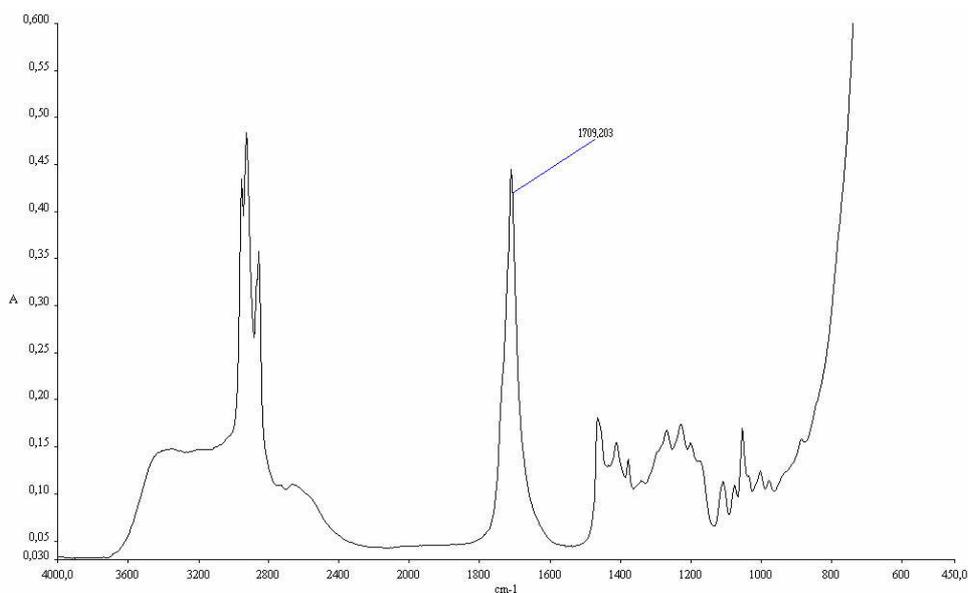


Figura 5.11 – Espectro de infravermelho para o instante inicial da reação.

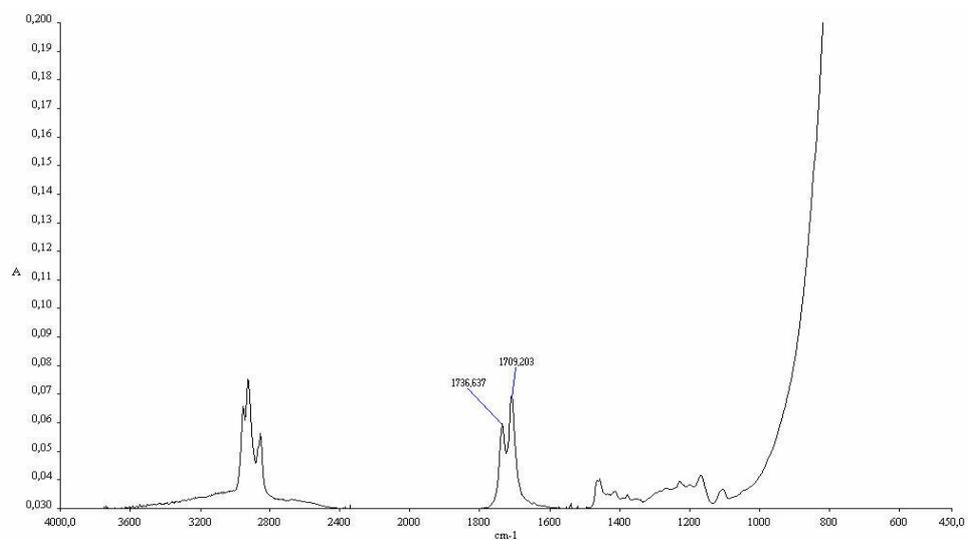


Figura 5.12 – Espectro de infravermelho para amostra removida durante o andamento da reação.

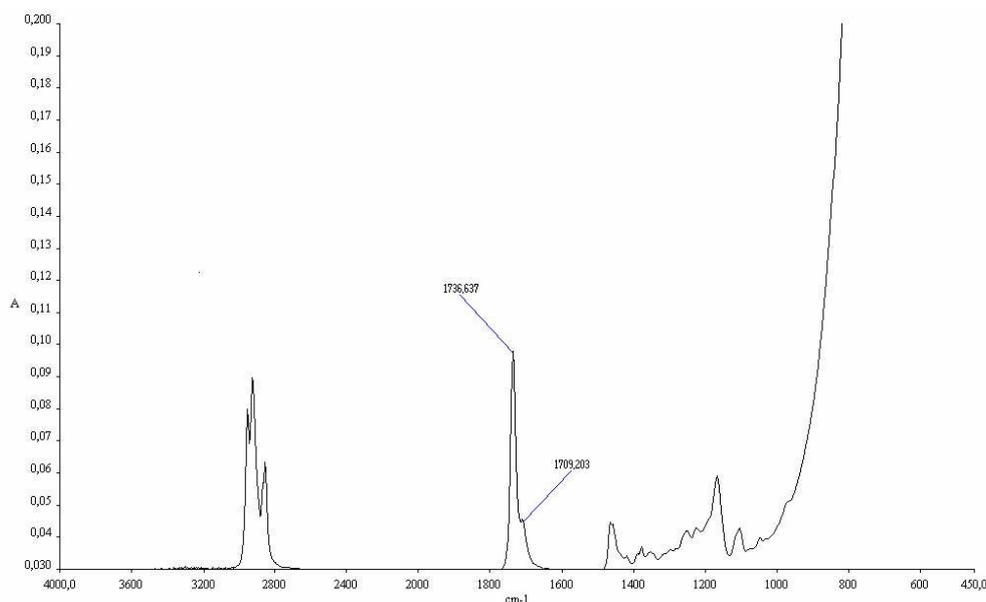


Figura 5.13 – Espectro de infravermelho para amostra removida próxima ao final da reação.

Através dos espectros ilustrados nas Figuras 5.11 a 5.13 podemos observar que a reação se processa através do consumo de ácido octanóico, representado pelo pico por volta de 1710 cm^{-1} e o surgimento do octanoato de *n*-pentila representado pelo pico na região de 1736 cm^{-1} . Isso demonstra que a variação do consumo de base durante a titulação volumétrica é causada devido a conversão do ácido em éster, e não a qualquer outro fator como adsorção do ácido pela enzima por exemplo.

5.5 - Avaliação da capacidade de reutilização do catalisador

Conforma foi descrito na seção 4.2.3. para a avaliação da reutilização do catalisador, trabalhou-se com as variáveis experimentais que proporcionassem a velocidade máxima para a reação em questão. Dessa forma, a concentração inicial dos reagentes adotada foi de $0,65\text{ mol.L}^{-1}$.

Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 5.14. Tal avaliação é de extrema importância para um processo que utilize a enzima em questão, uma vez que a mesma por ser imobilizada e insolúvel no meio

reacional, pode ser facilmente separada ao final da reação por simples filtração e reutilizada até o momento que ainda apresente atividade catalítica. Dessa forma, procurou-se verificar qual a influência da temperatura na atividade residual da enzima, após a realização de várias bateladas de reação.

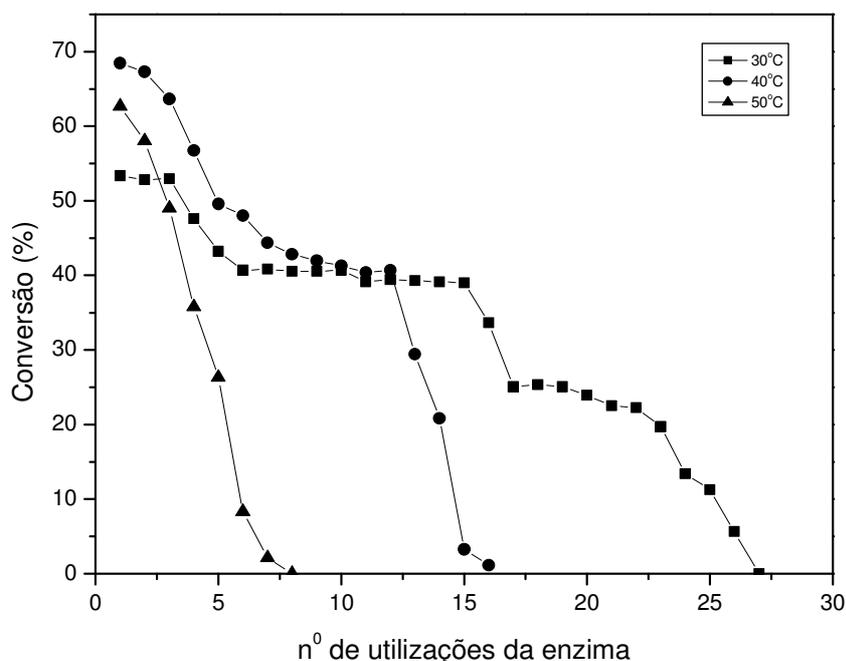


Figura 5.14 – Conversões obtidas pela esterificação do ácido octanóico pelo *n*-pentanol, em *n*-hexano, catalisada pela enzima Lipozyme TL IM em 60 min de reação, após várias utilizações da enzima, em função da temperatura do sistema. A concentração adotada foi de $0,65 \text{ mol.L}^{-1}$, com razão molar de substratos de 1:1, agitados em banho-maria tipo DUB-NOFF sendo o volume de cada batelada igual a 10mL.

Através dos resultados obtidos observa-se que a temperatura age de maneira direta no tempo de desnaturação da enzima, sendo que para 50°C a enzima praticamente não possui atividade catalítica por volta da sétima utilização.

Por outro lado, quando conduzimos a reação a 30°C , a enzima pode ser utilizada em aproximadamente 25 bateladas. Além disso, embora nessa

temperatura, a reação apresenta menor conversão frente os outros dois valores maiores de temperatura, a quantidade de éster formada após as várias bateladas é maior, sendo igual a 0,0577 mol de éster, enquanto que para 40 e 50°C, as quantidades produzidas foram 0,0442 e 0,0157 mol.L⁻¹, respectivamente.

Os resultados aqui apresentados não envolvem aspectos econômicos pertinentes a esse processo. Variáveis como preço de venda dos ésteres, custo dos reagentes e enzima, custo de carga, descarga, limpeza dos reatores, processos de operações unitárias para a purificação dos ésteres e tempo de produção, poderiam ser considerados para determinarmos a temperatura ótima para operação do sistema.

Dessa forma, embora na temperatura de 40 °C encontramos um valor menor para a quantidade de éster formado para a mesma quantidade de enzima, poderíamos ter uma produção maior do que aquela observada a 30 °C se fosse utilizado uma maior quantidade de enzima e obter maior lucratividade se o preço do catalisador fosse consideravelmente menor que o custo das outras operações.

Além disso, é possível realizar a síntese do éster em duas temperaturas diferentes. Até a 12ª utilização podemos conduzir a síntese a 40 °C pelo fato de termos bons rendimentos e a partir disso descer a temperatura para 30 °C uma vez que a enzima sofre grande desativação a partir da 13ª utilização. Isso somente é realizável se a enzima não possuir problemas relacionados a memória.

6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 - Conclusões

Tendo em vista os resultados discutidos nas seções anteriores e os aspectos levantados na revisão teórica, podemos levantar as seguintes conclusões:

- A velocidade da reação de esterificação direta do ácido octanóico com *n*-pentanol pode ser acompanhada quantitativamente por titulação ácido-base, tomando-se os cuidados referentes a adição de fenolfataleína e diluição da amostra.
- O comportamento cinético das reações pode de forma geral ser descrito por uma lei de ordem zero durante o seu início, facilitando a determinação da velocidade inicial da reação pela determinação da tangente nos pontos iniciais da síntese.
- A enzima Lipozyme TL IM apresenta inibição pelos substratos a partir de concentrações por volta de $0,65\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, de forma independente com a temperatura, e inativação térmica por volta de 50°C corroborando com alguns trabalhos discutidos na seção 3.2.3.
- O modelo matemático clássico de inibição não é eficiente para descrever o comportamento da reação tratada nesse trabalho, uma vez que a perda de atividade da enzima é muito acentuada a partir da concentração inicial de substratos ao qual observamos a inibição.
- O modelo de Wu e colaboradores adaptou-se bem aos dados experimentais, gerando coeficientes de correlação R^2 acima de 0,900. Os parâmetros n e K_i determinados mostraram-se não ser afetados pela

temperatura de operação da reação, enquanto V_{max} depende diretamente dessa variável termodinâmica.

- Para o parâmetro K_s mostrou-se dependente com o parâmetro V_{max} , ou seja, seu valor aumenta e diminui com o aumento e diminuição de V_{max} , respectivamente.
- Com relação à capacidade de reutilização da enzima, quando o sistema é operado a 30°C, podemos utilizar a enzima por um número maior de bateladas do que quando operada em temperaturas maiores. Embora a enzima proporcione nessa temperatura rendimentos menores para a síntese devido à sua alta estabilidade, apresenta uma maior produção de ésteres do que em temperaturas mais elevadas, se considerarmos a execução de várias bateladas até a perda total de atividade.

6.2 - Sugestões

Com a realização desse trabalho, novos tópicos podem ser explorados para a geração de novos trabalhos ou até mesmo confirmação dos dados apresentados até o momento. Dessa forma podemos sugerir:

- O desenvolvimento de técnicas analíticas instrumentais para a análise de ésteres que sejam menos ociosas permitindo a execução de um maior número de experimentos em um menor tempo, gerando também melhores resultados.
- A realização desse mesmo estudo com outros ésteres alifáticos de forma a observar a influência do tipo de substrato nos diversos parâmetros cinéticos avaliados nesse trabalho.
- A variação da razão estequiométrica dos substratos e também a utilização de modelos cinéticos com dois substratos, visando avaliar a influência individual de cada reagente na velocidade da reação.
- Alterar parâmetros experimentais como concentração de enzima, quantidade de água adicionada no meio e também explorar outros tipos

de lipases comerciais que sejam capazes de promover a síntese em questão e comparar os parâmetros experimentais obtidos.

- Realizar um estudo mais detalhado com relação à avaliação financeira da melhor temperatura a operar o sistema para a síntese conduzida em regime batelada como descrito ao longo do trabalho.
- Utilizar a equação obtida para a modelagem e projeto de reatores de leito fixo, operando em fluxo contínuo. Com o reator dimensionado, avaliar a quantidade de éster formado ao longo do tempo de operação em diversas temperaturas.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma Synthesis by Immobilized Lípase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**. n.32, 2003.

AMARAL, L. **Química Orgânica**. São Paulo: Editora Moderna, 1981.

BORZANI, W; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A. L.; AQUARONE, E.; **Fundamentos**: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Química Nova**. n.1, v.27, 2004.

CASTRO, H. F.; PAULA, A. V.; BARBOZA, J. S.; Estudo da Influência do Solvente, Carboidrato e Ácido Graxo na Síntese Enzimática de Ésteres de Açúcares. **Química Nova**. v.8, n.5, 2005.

CHANG, S. W.; SHAW, J. F.; SHIEH, C. J. Optimization of Enzymatically Prepared Hexyl Butyrate by Lipozyme IM-77. **Food Technology Biotechnology**. n.41, 2003.

CONNORS, K. A. **Chemical Kinetics**: The Study of Reactions Rates in Solution. New York: VCH, 1990.

COSTA NETO, P. R. Universidade Federal de Santa Catarina. Obtenção de ésteres alquílicos (**Biodiesel**) por via enzimática a partir do óleo de soja. (Doutorado) Florianópolis, 2002.

COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELLOS, M. **Substâncias Carboniladas e Derivados**. Porto Alegre: Bookman, 2003.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. **Química Nova**. v.27, n.4, 2004.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 2000.

FLATH, R. A.; FORREY, R. R.; TERANISHI, R. High resolution vapor analysis for fruit variety and fruit product comparisons. **Journal Food Science**. n.34., 1969.

GABELAN, A. **Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredientes**. New York: Wiley, 1994.

GANDHI, N. Applications of Lipase. **Jornal of American Organic Chemical Society**. n.6, v.74, 1997.

GANDHI, N. N.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B.; MUKESH, D. Lipozyme Deactivation by Butanol and Temperature. **Enzyme and Microbial Technology**. n.17, 1995.

JESUS, P. C.; SILVA, J. E. S.; Evaluation of the Catalytic Activity of Lípases Immobilized on Chrysotile for Esterification. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. n. 75, 2003.

JOÃO, J. J.; ZANELLA, C. R.; Utilização de Enzimas em Meio Orgânico. **BIOTECNOLOGIA**. n.16, 2000.

LEHNINGER, A. **Fundamentos de Bioquímica**. São Paulo: SARVIER, 1977.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000.

MACIEL, M. I.; HANSEN T. J.; ALDINGER S. B.; LABOWS J.N. Flavor chemistry of cashew apple juice. **Journal Agricultural Food chemistry** n.34, 1986.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 13ed, 1996.

MOSER, Anton. **Bioprocess Technology: Kinetics and Reactors**. New York: Spinger-Verlag, 1988.

O'DONNELL, C.D. Science, not magic, drives flavor trends. **Prepared Foods** n.163, 1994.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; FACCIIO, C.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C. Influência das Variáveis de Processo na Alcoólise Enzimática de Óleo de Mamona. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. n.24, 2004.

REHM, H.; REED, G.; PÜHLER, A.; STADLER, P. **Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed**. New York: VCH, 1995.

SANZ, C.; PEREZ, A. G.; RICHARDSON, D. G. Simultaneous HPLC determination of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 (2H)-furanone and related flavor compounds in strawberries. **Journal of Food Science** n.59, 1994.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A. L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SCHMID, R.; VERGER, R. Lípases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angew. Chemical International**. n.37, 1998.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, 1985.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering**. New Jersey: Prentice Hall, 1992.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 6ed. New York: John Wiley, 1997.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: LTC, v2, 2002.

TUCKER, G. A. WOODS, L. F. J. **Enzymes in Food Processing**. 2 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995.

UHLIG, H. **Industrial Enzymes and their Applications**. New York: John Wiley, 1998.

WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. West Sussex: Ellis Horwood, 1985.