



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
ESTÁGIO SUPERVISIONADO II (QMC 5512)



**Preparação de ésteres de aroma catalisada por lipases  
imobilizadas em filmes de amido/PVA**

**Daiane Gris**

Florianópolis, dezembro de 2010.

Daiane Gris

**Preparação de ésteres de aroma catalisada por lipases  
imobilizadas em filmes de amido/PVA**

Projeto de estágio supervisionado II (QMC 5512)

Apresentado ao Departamento de Química da

Universidade Federal de Santa Catarina

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento

Florianópolis, dezembro de 2010

**Daiane Gris**

**Preparação de ésteres de aroma catalisada por lipases  
imobilizadas em filmes de amido/PVA**

---

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente  
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

---

Prof. Dra. Maria da Graça Nascimento  
Orientadora

---

Prof. Dr. Antônio Carlos Joussef

---

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado

Florianópolis  
dezembro/2010

“...Se queremos alcançar a natureza, teremos que usar os mesmos métodos que ela faz, e prevejo uma época em que a química fisiológica, não só fará um maior uso de enzimas naturais, bem como recorrerá pela criação das sintéticas.”

*Emil Fischer, 1902*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar este trabalho a todos que de alguma forma contribuíram para o desfecho de mais esta etapa da minha vida.

Primeiramente a Deus;

Aos meus pais, pela paciência, apoio e confiança depositados em mim, só foi possível graças a vocês;

À Universidade Federal de Santa Catarina, pelo apoio institucional e pelo ensino de qualidade;

Ao CNPq e CAPES pelo suporte e apoio financeiro;

À Amano pela doação das lipases;

À Central de análises, pelas análises realizadas;

À minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento, pela dedicação e zelo pelo ensino de química, pela paciência que teve comigo, e pela confiança depositada para que este trabalho fosse realizado;

Aos professores da UFSC que contribuíram para essa conquista, ensinando não só conteúdos, mas sobre a vida;

Ao meu namorado Guaruja, pelo amor e companheirismo, por me dar força sempre, nos momentos mais difíceis, e me fazer acreditar mais em mim;

Ao meu irmão Vinícius, pela alegria;

A todos os meus amigos, principalmente a Dessa, Franzinha, Re, Carol, e Lacuca (grande herói!) pela parceria nos estudos e nas festas, pelas inúmeras conversas no sol, regadas a boas risadas;

Aos meus colegas de laboratório, Cesar, Cris, Damis, Fabíola, Geovanni, Jaque em especial a Vanessa, pela prontidão em ajudar sempre que precisei, pela amizade, pelas novas idéias;

Ao Barbosa do RU e ao segurança do estacionamento, Aurélio, por sempre nos receber com um sorriso no rosto e um super “bom dia” animado, todos os dias!

## ÍNDICE

<b>1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>1</b>
<b>2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
2.1- Enzimas.....	2
2.2- Lipases.....	4
2.3- Imobilização de enzimas.....	7
2.4- Amido.....	9
2.5- Poli-álcool vinílico.....	10
2.6- Ésteres de aroma.....	11
<b>3- OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
3.1- Objetivo geral.....	12
3.2- Objetivos específicos.....	12
<b>4- METODOLOGIA.....</b>	<b>13</b>
4.1- Reagentes, solventes e enzimas.....	13
4.2- Equipamentos.....	14
4.3- Extração do amido de mandioca.....	14
4.4- Preparação dos filmes e imobilização das lipases.....	15
4.5- Preparação do meio reacional para as reações de transesterificação e esterificação e purificação do produto.....	16
<b>5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>19</b>
5.1- Preparação e caracterização dos filmes.....	19
5.2- Determinação do teor de água.....	20
5.3- Efeito do solvente orgânico nos filmes.....	20
5.4- Estabilidade dos filmes com as lipases.....	21
5.5- Reação de esterificação e transesterificação.....	22
5.6- Preparação do acetato de <i>n</i> -butila (11).....	23
5.6.1- Avaliação da influência de diferentes lipases.....	23

5.6.2- Efeito da massa de lipase .....	25
5.6.3- Reutilização dos sistemas biocatalíticos.....	26
5.6.4- Efeito da influência do solvente .....	27
5.6.5- Obtenção do acetato de butila com a LBC não immobilizada.....	28
5.6.6- Preparação dos ésteres de aroma 12, 13, 14 e 15.....	29
6- CONCLUSÕES.....	31
7- PERSPECTIVAS .....	32
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
9- ANEXOS .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do modelo chave-fechadura .....	2
Figura 2 - Energia de ativação de uma reação na presença e ausência de catalisador .....	4
Figura 3- Sítio ativo da lipase de <i>B.subtilis</i> .....	5
Figura 4 - Resolução cinética dos álcoois 1,2 e 3 catalisada por LBC .....	6
Figura 5 - Principais métodos de imobilização de enzimas .....	8
Figura 6 - Estruturas da amilose (7) e amilopectina (8) .....	9
Figura 7 - Tubérculos e grãos, ricos em amido .....	10
Figura 8 – Estrutura do monômero do poli-álcool vinílico .....	10
Figura 9 – Exemplos de ésteres de aroma obtidos por catálise enzimática.....	11
Figura 10 – Fluxograma para extração do amido de mandioca. ....	14
Figura 11 - Preparação do filme e blendas poliméricas. ....	16
Figura 12 – Preparação do acetato de butila (11) por catálise enzimática. ....	16
Figura 13 - Preparação do meio reacional e análise do produto (acetato de butila)..	17
<b>Figura 14</b> – Placa cromatográfica mostrando mistura de álcool e éster (esquerda) e do éster puro (direita).....	18
Figura 15 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da reação do acetato de vinila com <i>n</i> -butanol ...	24
<b>Figura 16</b> – Espectro de IV do acetato de <i>n</i> -butila purificado (pastilha de KBr).....	25
Figura 17 - Comparação do re-uso da LBC imobilizada com a não imobilizada (26 °C, 24h). ....	29



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das enzimas de acordo com o tipo de reação.....	3
Tabela 2 - Vantagens e limitações da imobilização de biocatalisadores .....	7
Tabela 3 – Aspecto macroscópico dos filmes de amido/PVA.....	19
Tabela 4 - Teor de água encontrado nos filmes de amido/PVA .....	20
Tabela 5 - Aspecto macroscópico dos filmes com as lipases .....	21
Tabela 6 - Conversão em acetato de butila.....	23
Tabela 7 – Conversão do acetato de butila em função da quantidade de lipase.....	26
Tabela 8 - Conversões do éster (11) em sucessivas reutilizações .....	26
Tabela 9 - Efeito do solvente orgânico na conversão do acetato de butila.....	27
Tabela 10 – Conversões dos ésteres 12,13,14 e 15 .....	30

## RESUMO

Neste trabalho, foi efetuada a imobilização de lipases de diversas procedências em filmes de amido de mandioca e de amido/PVA (poli-álcool vinílico) usando como plastificante o sorbitol. Estes sistemas biocatalíticos foram usados para catalisar reações de esterificação e transesterificação para obtenção de ésteres de aroma.

Primeiramente foi testado o sistema amido/PVA/lipases para obtenção do acetato de *n*-butila em diversas condições. Foram utilizadas as lipases de *Burkholderia cepacia* (LBC), de *Pseudomonas fluorescens* (AK-20), de *Rhizopus oryzae* (F-AP15), de *Aspergillus niger* (A-12), de *Candida rugosa* (AY-30) e a de *Mucor javanicus* (M-10) (50 mg de cada).

O acetato de butila foi obtido com 93,7% de conversão usando o sistema amido/PVA/sorbitol/LBC e hexano como solvente, a 26 °C por 24h.

Para o mesmo éster, foi avaliada a influência de solventes orgânicos com diferentes polaridades. As maiores conversões foram obtidas na presença dos solventes mais apolares (por ex. hexano, heptano), sendo de 39-97,3 %.

O sistema 0,8 g amido/0,2 g PVA/LBC foi estocado em solvente orgânico por 208 dias, e reutilizado por até quatro vezes. O acetato de butila foi obtido com conversão de 58,3-91 %.

Depois de otimizado o processo, o mesmo foi utilizado para a obtenção de outros ésteres de aroma tais como o acetato de *isoamila* (banana), acetato de *octila* (laranja), butanoato de *etila* (morango) e acetato de *benzila* (pêssego). Os ésteres foram obtidos com conversões de 62,6, 81,0, 80 e 60 %, respectivamente.

O método foi bastante eficiente nas condições testadas, mostrando a importância da imobilização de enzimas para a manutenção da atividade catalítica e reutilização do biocatalisador.

*Palavras chaves: transesterificação, esterificação, lipases, imobilização, amido.*

## 1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A atividade microbiana das enzimas vem sendo usada, com sucesso, para catalisar reações em diversas sínteses. A alta régio e estereosseletividade das bioconversões simplificam os processos industriais, aumentam o rendimento e diminuem a formação de subprodutos indesejáveis.

Em sua grande maioria, as enzimas são proteínas que atuam como catalisadores, e podem alterar a velocidade de uma reação química em até  $10^{20}$  vezes, comparado às não catalisadas. Elas têm a função de induzir, direcionar e melhorar os rendimentos de reações. Um exemplo de aplicação de enzimas livres ou imobilizadas é na obtenção de ésteres de aroma derivados de ácidos carboxílicos de cadeias carbônicas relativamente pequenas. A preparação desses compostos através da catálise enzimática, principalmente por lipases vem adquirindo grande importância para a obtenção de produtos industrializados, como alimentos e cosméticos.

Porém, esses biocatalisadores podem ser afetados por diversos fatores (temperatura e solvente orgânico, entre outros), podendo desnaturar e perder assim o poder catalítico. Tais problemas podem ser amenizados ou solucionados com métodos de imobilização, como por exemplo em quitosana, amido, alginato de cálcio e PVA. Quando imobilizadas, as enzimas podem ser usadas em reações orgânicas sem perder ou diminuir o poder catalítico devido à desnaturação. Além disso, podem ser reutilizadas em novas reações.

A partir dessas considerações, neste trabalho lipases de diferentes procedências foram imobilizadas em filme de amido de mandioca e em blendas poliméricas de amido/PVA (poli-álcool vinílico). Estes sistemas biocatalíticos foram usados na síntese de alguns ésteres de aroma em meio orgânico.

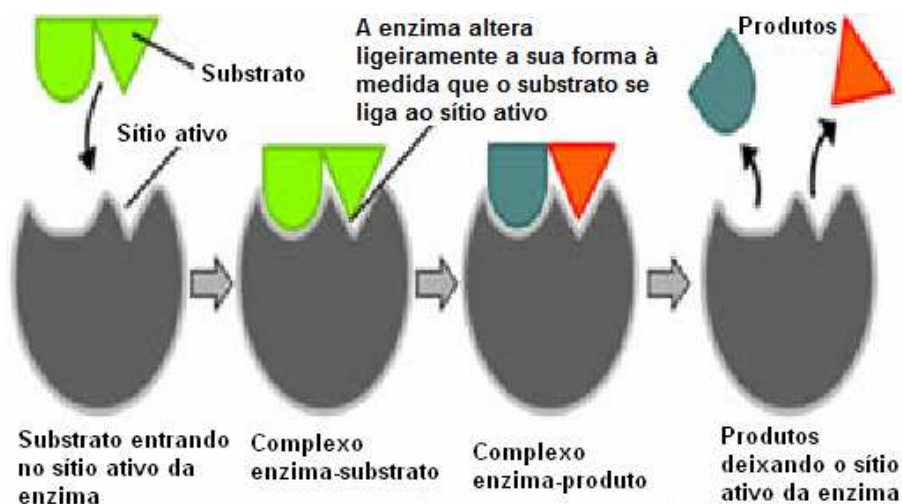
## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1- Enzimas

Enzimas, na sua grande maioria, são proteínas que atuam como catalisadores, e são polipeptídios constituídos de resíduos de aminoácidos. São substâncias que alteram a velocidade de uma reação química em até  $10^{20}$  vezes, comparado às não catalisadas. Os catalisadores não-enzimáticos, em contraste, aumentam a velocidade das reações por fatores de  $10^2$  a  $10^4$ . As enzimas têm a função de induzir, direcionar e melhorar os rendimentos de reações, e são biomoléculas notáveis pela sua especificidade e poder catalítico, as quais são muito superiores que os produzidos pelo homem.<sup>1-3</sup>

As enzimas são altamente específicas, tanto na reação catalisada bem como na escolha de reagentes, denominados de substratos. Em 1894, Emil Fischer formulou uma hipótese de chave-fechadura para a especificidade da enzima. Isso vem de acordo com suas formas geometricamente complementares. Uma enzima, em geral, catalisa somente uma reação química ou um conjunto de reações que estejam intimamente relacionadas.<sup>2,3</sup>

Na **Figura 1**, observa-se a representação esquemática da ação enzimática.<sup>4</sup>



**Figura 1** - Representação esquemática do modelo chave-fechadura.<sup>4</sup>

A região que se liga aos substratos e contém os resíduos de aminoácidos que participam diretamente da formação e ruptura de ligações, é chamada de sítio ativo, ocupa uma parte relativamente pequena da estrutura da enzima e é tridimensional. As forças não-covalentes que ligam o substrato ao sítio ativo são as mesmas forças que formam as conformações das proteínas. São elas eletrostáticas, de van der Waals e as ligações de hidrogênio. Os aminoácidos localizados no sítio ativo se arranjam de tal forma que possam interagir especificamente com os substratos.<sup>1-3,5</sup>

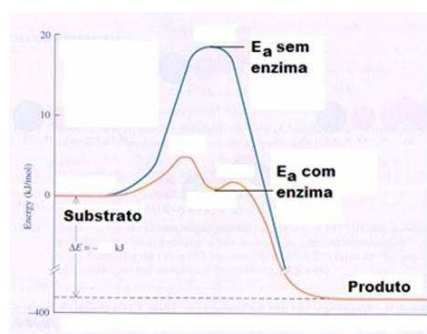
A UIBBM - União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular classifica as enzimas em seis grupos, as quais dividem-se em sub-grupos de acordo com o tipo de reação catalisada. Estas são classificadas de acordo com um número de código e atribuiu-se um nome dependendo do tipo de reação catalisada, do grupo doador e aceptor.<sup>1,5,6</sup> (**Tabela 1**)

**Tabela 1-** Classificação das enzimas de acordo com o tipo de reação.<sup>1,5,6</sup>

Nº	Classe	Tipo de reação catalisada	Exemplos
1	oxidoredutases	transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de H)	lactato desidrogenase
2	transferases	reações de transferência de grupos.	alanina aminotransferase
3	hidrolases	reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)	quimiotripsina, lipases
4	liases	adição de grupos às duplas ligações ou formação de duplas ligações por meio de remoção e grupos.	piruvato descarboxilase
5	isomerases	transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros.	alanina racemase
6	ligases	formação de ligações do tipo C-C, C-S, C-O e C-N por meio de reações de condensação, acopladas a quebra do ATP.	glutamina sintetase

Uma reação química está obrigatoriamente relacionada com o contato entre as moléculas dos reagentes, e é necessária uma energia mínima. Essa energia mínima para que ocorra a reação é chamada de energia de ativação. As enzimas são muito eficientes como catalisadores, e podem aumentar a velocidade das reações, diminuindo a energia de ativação,  $E_a$ , entre os reagentes e produtos. Isto ocorre devido à capacidade que elas têm de aproximar os substratos em uma orientação que favorece a formação do complexo enzima-substrato, para posteriormente formar os produtos.<sup>2,3</sup>

Na **Figura 2**, observa-se a diferença de  $E_a$  entre uma reação catalisada com uma não-catalisada.<sup>7</sup>



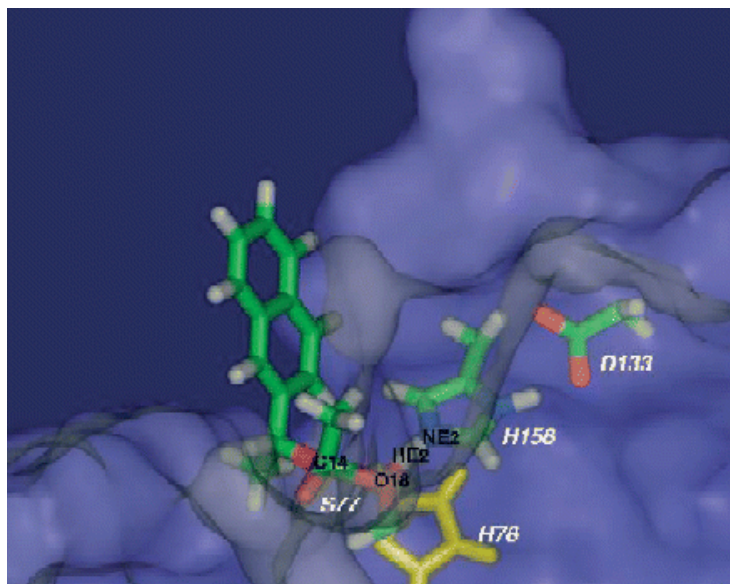
**Figura 2** - Energia de ativação de uma reação na presença e ausência de catalisador.<sup>7</sup>

Neste trabalho, serão utilizadas as lipases que são enzimas da família das hidrolases e hidrolisam trigliceróis a seus respectivos ácidos carboxílicos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis.<sup>1,6</sup> A seguir, serão descritas mais detalhadamente, algumas aplicações e fontes dessa enzima.

## 2.2- Lipases

Conforme citado, as lipases são classificadas como hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis. São muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores e atuam em uma ampla faixa de pH. São muito estáveis nesse meio, apresentando especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade.<sup>5,8,9,10</sup>

Na **Figura 3**, está apresentado o sítio ativo da lipase de *B.subtilis*, composto pelos resíduos de aminoácidos, histidina, serina e aspartato.<sup>11</sup>

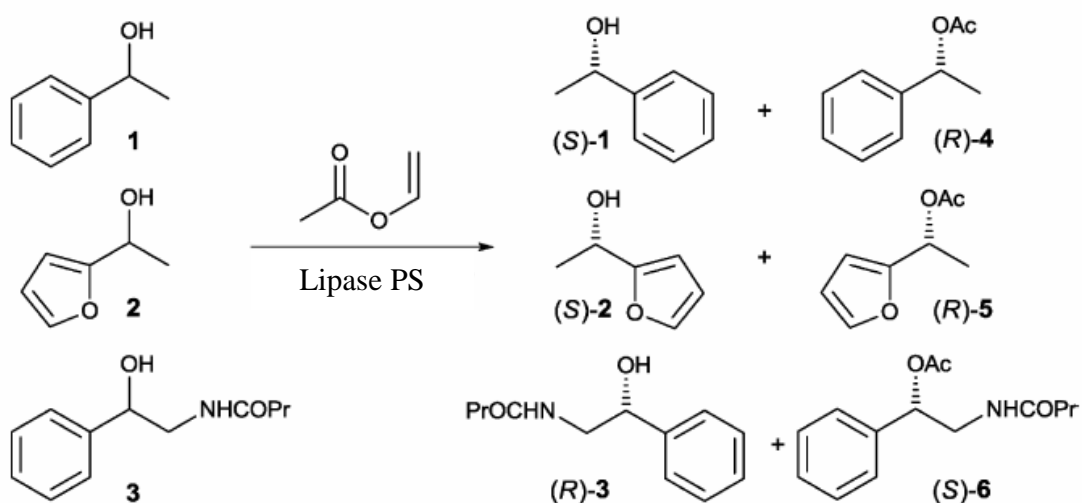


**Figura 3-** Sítio ativo da lipase de *B.subtilis*.<sup>11</sup>

As lipases estão presentes em diversos tipos de animais, plantas e microorganismos. Numerosas espécies de bactérias, bolores e leveduras produzem estas enzimas tais como os microrganismos de *Penicillium cyclopium*, *Cândida rugosa*, *Trichosporon asteróides*, *Trichosporon laibacchi*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinérea*, *Acinetobacter sp.* e *Pichia burtonii*.<sup>8,12-14</sup>

Estas enzimas também catalisam diversas reações tais como as de esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade. São muito importantes na indústria, como as usadas em detergentes ou na síntese fármacos como o ácido (*RS*)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanóico (Ibuprofeno, antiinflamatório). As lipases têm sido muito estudadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas.<sup>5,8,12</sup>

A **Figura 4** mostra a resolução cinética da acilação dos alcoóis **1-3** catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS) imobilizada em Kynol™ ACC 507-15, com e sem líquido iônico.<sup>9</sup>



**Figura 4** - Resolução cinética dos álcoois **1-3** catalisada por LBC.<sup>9</sup>

Este sistema, lipase/suporte, foi muito eficaz na resolução dos racematos **1-3**, e os correspondentes acetatos foram obtidos com conversões de 32-51%. O suporte pode ser reutilizado por oito vezes nas temperaturas de 25-60°C.

Mesmo sendo um excelente catalisador, as lipases apresentam algumas desvantagens para aplicações sintéticas, principalmente em solventes orgânicos:<sup>5,6</sup>

- Não mostram atividade quando a concentração do substrato é muito baixa;
- Podem sofrer inibição por agentes químicos e/ou físicos (pH extremos, solventes orgânicos, sais);
- Dependendo das condições reacionais, não apresentam boa estabilidade, podendo assim perder sua atividade catalítica em altas temperaturas, além da auto-oxidação, autodigestão e até desnaturação pelo solvente orgânico.

Por estes e outros fatores, nos últimos anos vem sendo desenvolvidas técnicas para aprimorar o uso de lipases como biocatalisadores e/ou através da modificação genética, visando a manutenção da atividade catalítica. A imobilização das mesmas pode influenciar na estabilidade e, em geral, permite a reutilização.<sup>8,13-</sup>



## 2.3- Imobilização de enzimas



Em 1916, Nelson e Griffin observaram que a invertase adsorvida em carvão, catalisava a hidrólise da sacarose. Porém, a imobilização de enzimas só foi utilizada na prática em 1930, e vem sendo aprimorada nos últimos 40 anos. A primeira aplicação industrial foi em 1969, onde a enzima de fungos aminoacilase, foi imobilizada em DEAE-Sefadex através de ligação iônica e usada para hidrolisar estereosseletivamente *N*-acil-*D,L*-aminoácidos para a obtenção de *L*-aminoácidos e *N*-acil-*D*-aminoácidos.<sup>17</sup>

A imobilização de biocatalisadores consiste no confinamento em uma região restrita (biorreator), garantindo a retenção da atividade catalítica e assegurando a possibilidade de reutilização. Esta técnica promove a fácil separação e reutilização do biocatalisador, recuperação do produto e é capaz de aumentar a resistência em relação diferentes agentes desnaturantes.<sup>5,6,15</sup>

A **Tabela 2** apresenta as principais vantagens e desvantagens do uso de biocatalisadores imobilizados.

**Tabela 2** - Vantagens e limitações da imobilização de biocatalisadores.<sup>5</sup>

---

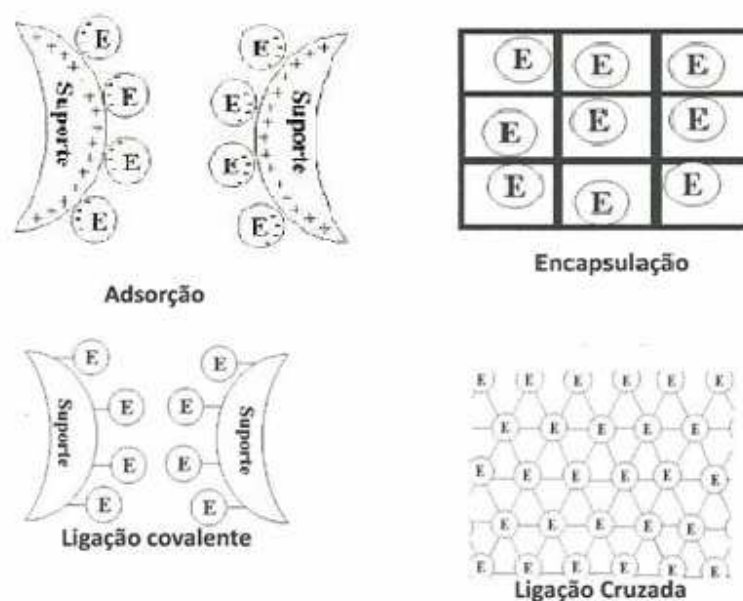
	<ul style="list-style-type: none"><li>-possível reutilização do biocatalisador</li><li>-minimiza a contaminação do produto</li><li>-bioconversão mais rápida (essencial na presença de substratos instáveis)</li><li>-fácil separação entre produto e biocatalisador</li><li>-controle do tempo da bioconversão.</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>-perda de atividade catalítica durante a imobilização (pH, temperatura..)</li><li>-perda de atividade catalítica devido à matriz de imobilização (exclusão de macromoléculas, restrições estereoquímicas de acesso ao sítio ativo)</li><li>-perda de atividade biocatalítica durante a bioconversão (susceptibilidade química e/ou mecânica da matriz, poros com diâmetros variados, acúmulo de contaminantes, etc).</li></ul>

---

A imobilização pode ocorrer por diferentes métodos tais como adsorção em materiais insolúveis, confinamento em géis poliméricos, encapsulamento em

membranas, ligação cruzada e ligação a um suporte insolúvel.<sup>6,18,19</sup> O suporte onde será imobilizado a enzima, deve conter características desejáveis para uma boa atuação do sistema/enzima. Deve ter área superficial grande, boa permeabilidade, características hidrofílicas, estabilidade química, mecânica e térmica, alta rigidez, resistência ao ataque de microorganismos e capacidade de ser reutilizado.<sup>5</sup>

Na **Figura 5**, são apresentados os métodos mais usuais para imobilizar enzimas.<sup>20</sup>



**Figura 5** - Principais métodos de imobilização de enzimas.<sup>20</sup>

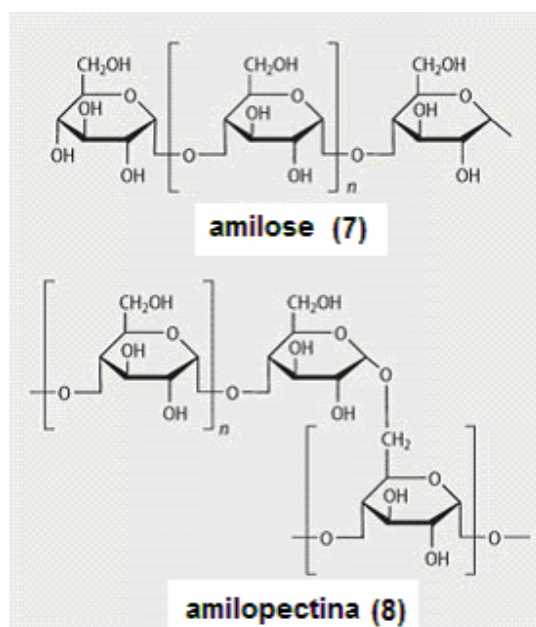
Em alguns estudos foram utilizados misturas de polímeros para imobilizar as enzimas, denominado de blendas poliméricas. Essas modificações podem fazer com que estes materiais adquiram propriedades específicas com menor custo do que a síntese de um novo polímero. Como exemplos, citam-se o filme de Eupergit C<sup>21</sup> e as blendas de quitosana/poli-álcool vinílico (PVA)<sup>22</sup>, amido-agarose<sup>23</sup>, carboximetilcelulose/PVA<sup>18</sup>, PVA com adição de ácidos graxos<sup>19</sup> e alginato de cálcio/amido.<sup>24</sup> As propriedades destes materiais podem fornecer condições mais adequadas para adsorção de lipases e de outros biocatalisadores.

Neste trabalho serão utilizados o amido e PVA para a preparação de filmes e posterior imobilização de lipases.

## 2.4- Amido

O amido é constituído por amilose, cadeia linear de moléculas de glucose, e amilopectina que é uma molécula semelhante à amilose, mas de cadeia ramificada. A relação entre esses dois polissacarídeos varia de acordo com a origem botânica do amido. Está presente na maioria dos vegetais com a função de armazenar energia coletada pela fotossíntese. O amido aparece como grânulos microscópicos nas raízes e sementes dos vegetais. Por ser facilmente hidrolisado, é um dos principais alimentos do homem e animais.<sup>2,3,25,26</sup>

Na **Figura 6**, são apresentadas as estruturas da amilose (**7**) e da amilopectina (**8**).<sup>2,27</sup>

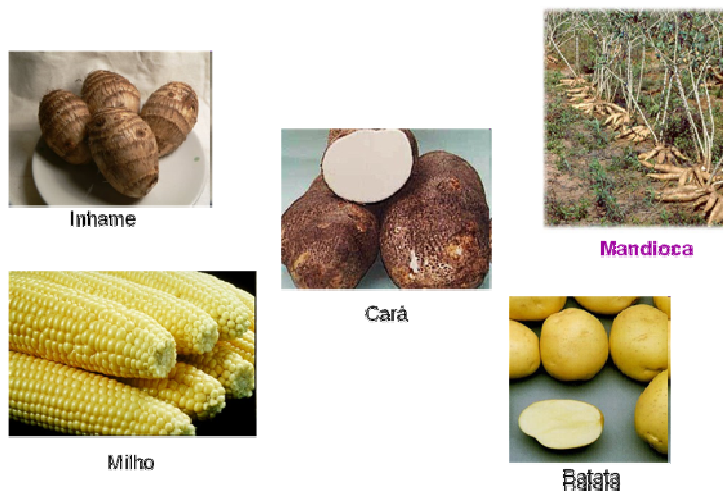


**Figura 6** - Estruturas da amilose (**7**) e amilopectina (**8**).<sup>2,27</sup>

Amidos de diferentes fontes de vegetais tais como trigo, arroz, milho e batata, vêm sendo bastante explorados em relação à sua estrutura e propriedades físico-químicas.<sup>25,28,29</sup>

No Brasil, as indústrias vêm utilizando os benefícios do amido para desenvolver produtos biodegradáveis, com produção limpa e fonte renovável de matéria prima, produzindo, por exemplo, embalagens que possam substituir o plástico e o isopor.<sup>29</sup>

A **Figura 7** mostra diferentes fontes de amido. <sup>29</sup>



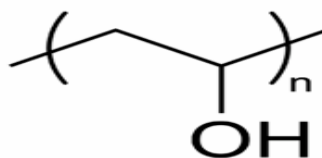
**Figura 7** - Tubérculos e grãos, ricos em amido. <sup>29</sup>

Filmes de amido são totalmente biodegradáveis, e podem ser elaborados misturando-o com polióis (glicerol e/ou sorbitol) resultando em uma massa amorfa, sem a utilização de componentes sintéticos em sua fabricação. <sup>19,30</sup>

## 2.5- Poli-álcool vinílico

Um outro polímero que foi usado neste trabalho é o poli-álcool vinílico (PVA). O PVA é um polímero sintético biodegradável solúvel em água obtido pela hidrólise do acetato de poli-vinila (PVAc) de baixo custo e não-tóxico para microorganismos. Por isso vem sendo bastante empregado da indústria têxtil, como lubrificante oftálmico, em adesivos e mais recentemente para a imobilização de células e enzimas. <sup>31,32</sup>

Na **Figura 8** é mostrada a estrutura do monômero do PVA. <sup>33</sup>



**Figura 8** – Estrutura do monômero do poli-álcool vinílico. <sup>33</sup>

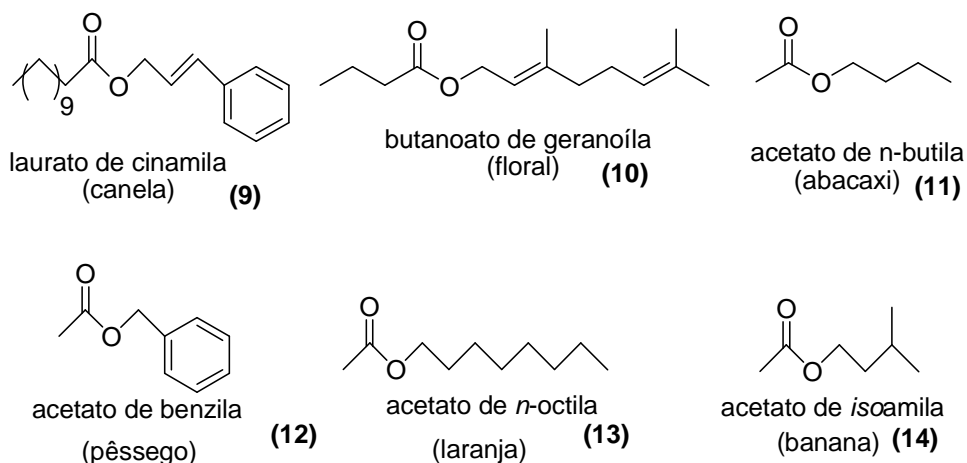
Como já citado, neste trabalho foram usados filmes de amido de mandioca e blendas poliméricas de amido/PVA como suportes para diversas lipases. Estes sistemas serão empregados como catalisadores na obtenção de ésteres de aroma.

## 2.6- Ésteres de aroma

Os ésteres de aroma têm grande importância para vários produtos finais na indústria de alimentos. Os ésteres podem ser obtidos por três técnicas; extração de fontes naturais, síntese químicas e enzimáticas. A extração desses sabores e aromas a partir de frutos, às vezes, se torna muito caro, e por isso há um grande interesse em sintetizá-los, buscando métodos mais barato e rentáveis.<sup>34</sup>

Na última década, a biotecnologia vem sendo considerada para a produção de ésteres, uma vez que o aroma obtido pode ser considerado como "natural". Os processos biotecnológicos oferecem diversas vantagens e se mostram como uma alternativa competitiva aos métodos químicos devido à alta eficiência catalítica, condições operacionais brandas e à seletividade dos catalisadores naturais. Uma das maneiras é através da catálise enzimática utilizando lipases em solvente orgânico, como será efetuada nestes estudos.<sup>31,34</sup>

Na **Figura 9**, encontram-se alguns exemplos de ésteres de aroma, obtidos através da catálise enzimática.<sup>34</sup>



**Figura 9** – Exemplos de ésteres de aroma obtidos por catálise enzimática.<sup>34</sup>

### 3- OBJETIVOS

#### 3.1- Objetivo geral

Imobilizar lipases de diversas procedências em filmes de amido e amido/PVA e utilizar estes suportes como catalisadores em reações de esterificação ou transesterificação para a obtenção de ésteres de aroma, em meio orgânico.

#### 3.2- Objetivos específicos

- Extrair o amido de mandioca;
- Avaliar a influência de diferentes proporções de amido e de PVA, bem como dos plastificantes (glicerol e sorbitol) na preparação dos filmes;
- Verificar a estabilidade dos mesmos em relação a diversos solventes orgânicos (por ex. hexano, diclorometano, clorofórmio);
- Determinar o teor de água nos filmes pelo método de titulação de Karl-Fischer;
- Imobilizar lipases de diversas procedências, tais como as de *Burkholderia cepacia*, de *Pseudomonas fluorescens*, de *Rhizopus oryzae*, de *Aspergillus niger*, de *Candida rugosa* e de *Mucor javanicus* nestes suportes;
- Preparar o acetato de *n*-butila (abacaxi), na presença e ausência das lipases livres e/ou imobilizadas, bem como os acetato de *iso*-amila de *n*-octila de benzila e o butanoato de etila;
- Analisar a eficiência do suporte (filmes/lipase) para a obtenção do acetato de *n*-butila em diferentes solventes orgânicos (*n*-hexano, ciclohexano, clorofórmio, diclorometano, éter etílico, acetonitrila, éter metílico *t*-butílico (MTBE) e acetona.
- Avaliar a reutilização das lipases imobilizadas, após armazenamento em solvente orgânico a temp. ambiente na obtenção do acetato de *n*-butila;
- Determinar a conversão por RMN-<sup>1</sup>H e a pureza por cromatografia de camada delgada (ccd, hexano: acet. de etila);
- Caracterizar os ésteres por infravermelho (IV) e RMN-<sup>1</sup>H;
- Comparar esses dados obtidos com os publicados na literatura;
- Apresentar todos os resultados obtidos em Congressos específicos da área.

## 4- METODOLOGIA

### 4.1- Reagentes, solventes e enzimas

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:

- Enzimas:
  - LBC-** lipase de *Burkholderia cepacia*, atividade > 30,000 U/g.\*
  - AK-20-** lipase de *Pseudomonas fluorescens*, atividade >20,000 U/g. \*
  - F-AP15-** lipase de *Rhizopus oryzae*, atividade > 150,000 U/g. \*
  - A-12-** lipase de *Aspergillus niger*, atividade >120,000 U/g. \*
  - AY-30-** lipase de *Candida rugosa*, atividade>30,000 U/g. \*
  - M-10-** lipase de *Mucor javanicus*, atividade>10,000 U/g. \*
- Amido de mandioca (extraído de fonte vegetal);
- Álcoois: butanol (Vetec, 99%), álcool isoamílico, octanol (GPH), etanol (Merck, 95%) e álcool benzílico (Backer, 99,8%);
- PVA (Vetec, 99%),
- Acetato de vinila, (Fluka, 99%);
- Glicerol (Vetec 99,5%) e sorbitol, (Vetec, 99,0%);
- Solventes: hexano (Synth 99,5%); acetonitrila (Vetec 99%); diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (Nuclear); éter *tert*-butilmetílico (MTBE) (Tedia); clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) (Vetec); clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) (Aldrich 99,8%); acetona (Merck, 99,5%); éter etílico (CRQ, 98%); cicloexano (Reagen, 99,5%);
- Sílica gel Vetec 230-400 mesh para cromatografia em coluna;
- Sílica gel Carvalhaes para cromatografia em camada fina.

\* Uma unidade de atividade lipolítica esta definida como a quantidade de enzima que libera um mol de ácidos graxos por minuto. Como substrato foi usado o óleo de oliva.<sup>35</sup>

## 4.2- Equipamentos

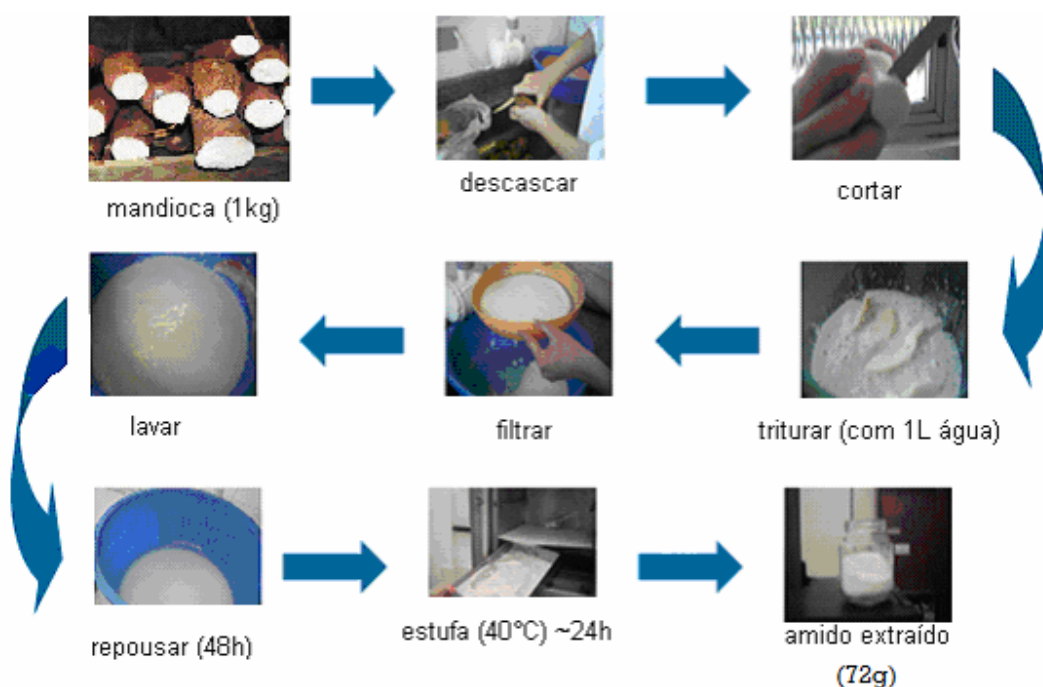
Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: espectrômetro de RMN de  $^1\text{H}$  (Varian AC 400F, 400 MHz); espectrofotômetro de infravermelho (ABB Bomen FLTA 2000-100); titulador 633 Automatic Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau. Esses equipamentos estão localizados na Central de Análises.

A seguir, serão mencionados os disponíveis nos laboratórios 301/306, ambos do DQ – UFSC:

-agitador com banho termostatizado Technal TE-0532;

## 4.3- Extração do amido de mandioca

A extração do amido foi realizada com a colaboração da Profa. Dra. Elisa H. Moecke, do Laboratório de Microscopia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFSC, e foi efetuado conforme mostra a **Figura 10**:



**Figura 10** – Fluxograma para extração do amido de mandioca.



O amido extraído foi utilizado para a preparação dos filmes sem e com PVA e usado como suporte para imobilização de lipases. Foram obtidas 72 g de amido de mandioca.

#### **4.4- Preparação dos filmes e imobilização das lipases**

Os filmes de amido e de amido/PVA (blendas poliméricas) foram preparados conforme a metodologia apresentada a seguir.

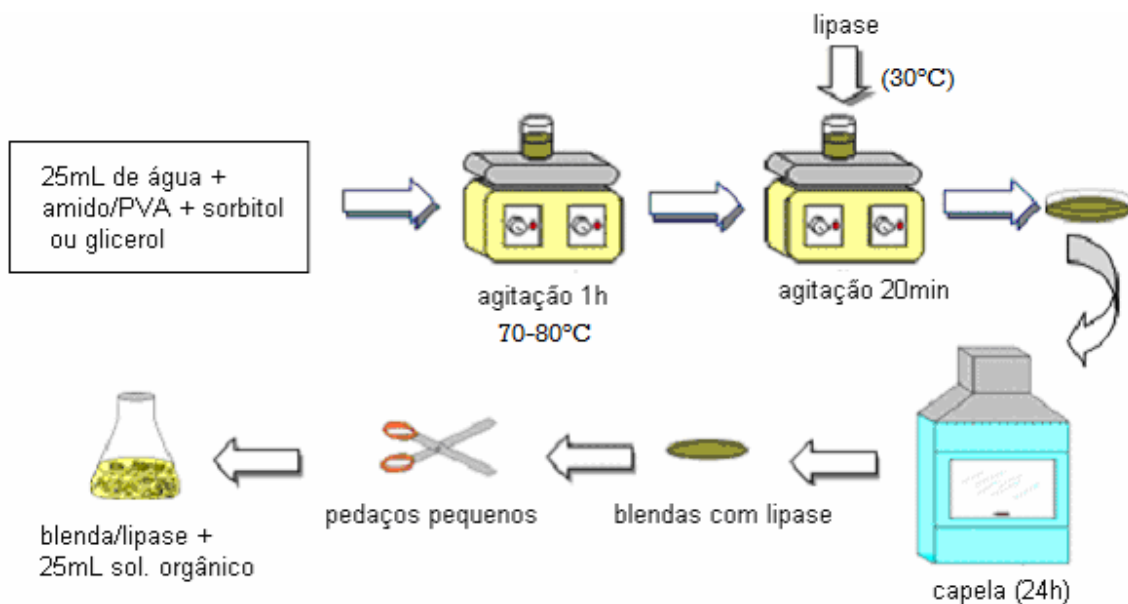
Em um béquer de 50 mL foram adicionados amido (0-1,0 g) e PVA (0-1,0 g) com diferentes proporções. A mistura foi dissolvida em 25 mL de água destilada com a adição de 0,2-0,5 mL de glicerol e/ou 0,2-0,3 g de sorbitol. A solução foi mantida sob agitação magnética e com aquecimento brando por ~1h.

Após esse tempo, e a temperatura atingir ~30 °C foram adicionados de 0-50 mg das diferentes lipases, e o sistema agitado por mais 20 min. A seguir, a solução foi transferida para uma placa de Petri e colocada na capela ou aquecida em um banho de areia a ~40 °C para evaporação da água.

Os filmes (blendas poliméricas) com as enzimas imobilizadas foram cortados em pequenos pedaços e transferidos para um erlenmeyer de 250 mL contendo o solvente orgânico, para posteriormente serem usados nas reações de transesterificação e esterificação.

Foram preparados filmes na ausência de lipases, e estes foram usados para determinar a estabilidade em diversos solventes orgânicos.

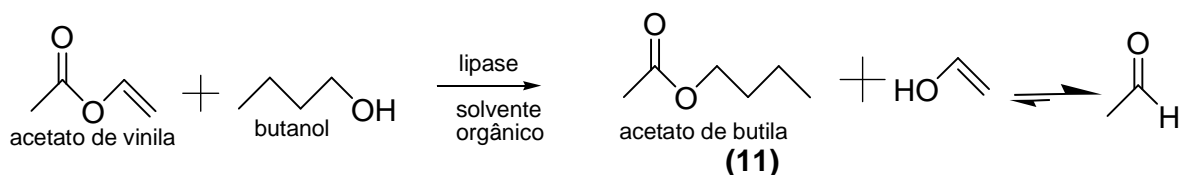
A **Figura 11** mostra a preparação dos filmes poliméricos, até serem cortados e estocados em solvente orgânico.



**Figura 11** - Preparação do filme e blendas poliméricas.

#### 4.5- Preparação do meio reacional para as reações de transesterificação e esterificação e purificação do produto

Para a reação de transesterificação do acetato de vinila com butanol, foram adicionado em um erlenmeyer de 250 mL, 25 mL do solvente orgânico, acetato de vinila (1 mmol, 0,86 mL), butanol (1 mmol 0,75 mL) e o filme previamente cortado, conforme descrito na **Figura 12**.



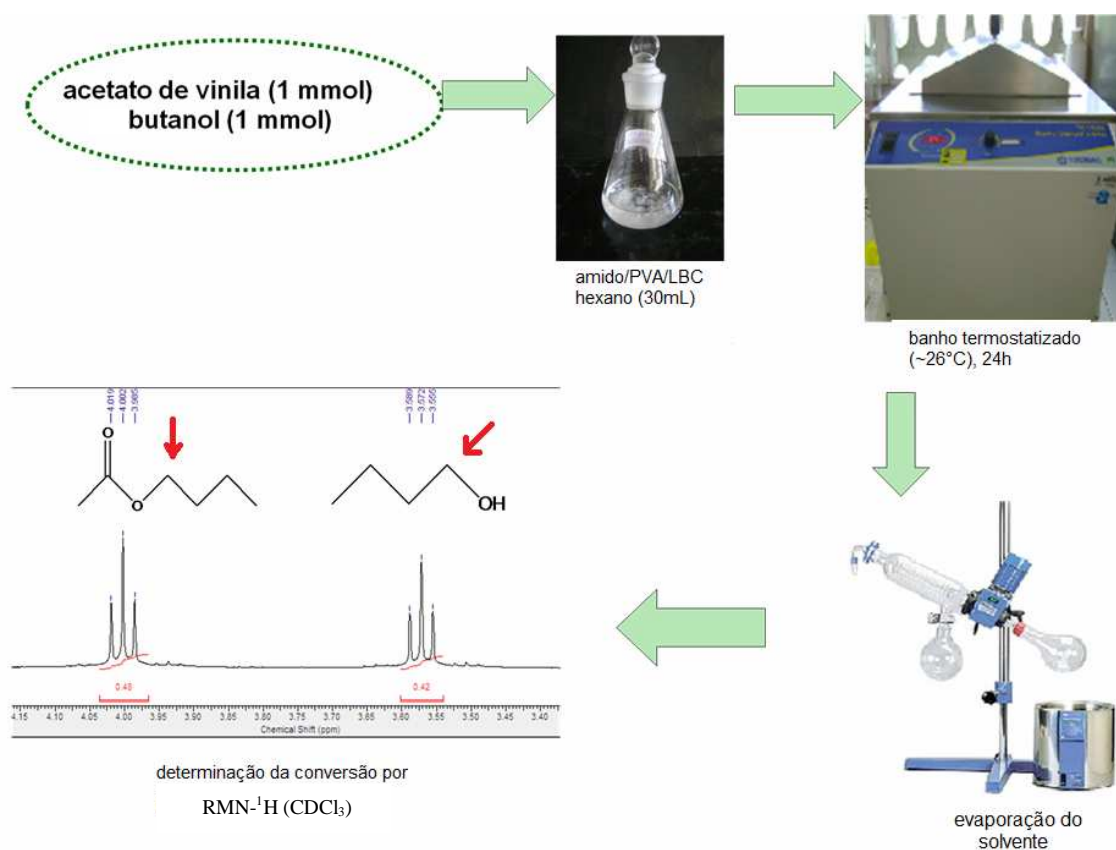
**Figura 12** – Preparação do acetato de butila (11) por catálise enzimática.

Para a preparação dos acetatos de *isoamila* (banana), de *octila* (laranja), de *benzila* (pêssego) e do *butanoato de etila* (morango), foram usados: acetato de vinila, álcool *isoamílico*, *octanol*, álcool *benzílico*, ácido *butanóico* e *etanol*, em quantidades equimolares.

A mistura reacional foi mantida em banho termostaticado com agitação orbital (Technal TE-0532) a temperatura de 26 °C por um período de até 24 h. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (ccd), usando como eluente hexano:acetato de etila (7:3 v/v).

Após o término da reação, a mistura reacional foi transferida para um balão de fundo redondo e o filme foi lavado com solvente orgânico por 2-3 vezes para que todos os reagentes e os produtos fossem removidos (acompanhando-se também por ccd). Posteriormente, o solvente foi evaporado no rota-evaporador, obtendo-se o produto desejado, ainda sem purificação.

A **Figura 13** mostra o procedimento usado para a preparação do acetato de butila.



**Figura 13** - Preparação do meio reacional e análise do produto (acetato de butila).

Após a evaporação do solvente, a formação do produto pôde ser quantificada por análise de RMN de <sup>1</sup>H. (**Figura 13**).

O acetato de *n*-butila foi purificado por cromatografia de coluna (sílica gel 200 mesh), utilizado como eluente hexano:acetato de etila (7:3 v/v). Coletaram-se alíquotas de ~10 mL, e estas foram analisadas por cromatografia de camada delgada (ccd), com o mesmo eluente para observar a separação e pureza do éster. Foram reunidas as amostras cujos valores de R<sub>f</sub> foram iguais a 0,8 e que demonstravam ter somente o éster e não uma mistura com o álcool. Posteriormente, foi feita a evaporação do eluente, apenas das alíquotas que continham o éster puro (**Figura 14**).

O produto puro foi analisado por espectroscopia de IV, e este será apresentado e discutido nos resultados. (**Figura 16**, pág 25)



**Figura 14** – Placa cromatográfica mostrando mistura de álcool e éster (esquerda) e do éster puro (direita).

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram imobilizadas lipases de diversas procedências em filmes de amido/PVA. Estes sistemas biocatalíticos foram usados em reações de esterificação e transesterificação para a obtenção de ésteres de aroma. O amido foi extraído da mandioca. A seguir, os resultados obtidos são apresentados e discutidos.

### 5.1- Preparação e caracterização dos filmes

Para obter uma composição adequada para a preparação dos suportes, variou-se a massa de amido, PVA e do plastificante sorbitol ou glicerol. O aspecto macroscópico observado encontra-se descrito na **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Aspecto macroscópico dos filmes de amido/PVA.

Entrada	Amido(g)	PVA (g)	Aspecto (sorbitol) <sup>(a)</sup>	Aspecto (glicerol) <sup>(b)</sup>
1	1,0	0,0	maleável, resistente	pouco resistente, pegajoso
2	0,8	0,2	maleável, resistente	não-maleável, pegajoso, pouco resistente
3	0,6	0,4	maleável, resistente	resistente, pegajoso
4	0,4	0,6	maleável, pegajoso	resistente, pegajoso
5	0,2	0,8	maleável, pegajoso	muito pegajoso, pouco resistente
6	0,0	1,0	maleável, muito pegajoso	muito pegajoso

(a) 0,2 g sorbitol, (b) 0,2 g glicerol, t=90 °C

Foram testadas proporções diferentes de sorbitol ou glicerol, obtendo-se um melhor resultado com 0,2 g de ambos. O filme de PVA foi também preparado na ausência do plastificante, e este apresentou boa resistência e maleabilidade. Ao aumentar a massa de PVA obteve-se um filme mais resistente, mas com um certo aspecto pegajoso, não sendo possível cortá-lo em pedaços regulares. Pelos resultados obtidos, pode-se verificar que os filmes feitos com sorbitol são mais resistentes e de fácil manuseio.

A partir desses resultados, os filmes mais estáveis e maleáveis foram selecionados e usados como suportes para as lipases.

## 5.2- Determinação do teor de água

O teor de água nos filmes de amido/PVA foi determinado pelo método de titulação Karl-Fischer. Esse método consiste em dissolver 8,5g de iodo em solução mista de 66,7 mL de metanol puro e 26,9 mL de piridina desidratada, adicionar vagarosamente 6,4 g de ácido sulfuroso líquido, para o uso em refrigerador, esfriando-se com água corrente. Se a amostra contiver acetona ou cetona, usa-se solução mista de 86 mL de piridina e 9 mL de metanol, substituindo-se a solução mista ácida descrita. Usa-se esta solução após a decantação de 1 a 2 dias.<sup>36</sup>

A **Tabela 4** mostra o teor de água dos filmes de amido/PVA, determinado por titulação de Karl-Fischer.

**Tabela 4** - Teor de água encontrado nos filmes de amido/PVA.<sup>(a)</sup>

Entrada	Amido (g)	PVA (g)	H <sub>2</sub> O (%)
1	1,0	0,0	2,33
2	0,8	0,2	2,52
3	0,6	0,4	4,70
4	0,4	0,6	5,76
5	0,2	0,8	7,74
6	0,0	1,0	10

<sup>(a)</sup> 0,2 g de sorbitol

Essa análise é de extrema importância, pois para manutenção e atividade catalítica da enzima após a imobilização, é necessário que haja uma quantidade mínima de água para a manutenção da estrutura quaternária da enzima e assim sua atividade catalítica. Os filmes apresentaram teor de água de 2,33-10,05%, o que assegura a estabilidade das lipases nestes suportes. Esses dados estão de acordo com alguns reportados na literatura.<sup>18</sup>

## 5.3- Efeito do solvente orgânico nos filmes

Com os filmes de amido/PVA/sorbitol, foram feitos testes de estabilidade em diversos solventes orgânicos. Para este teste, pedaços pequenos do filme foram

colocados em tubos de ensaio com aproximadamente 1 mL do solvente e deixados em repouso por ~24 h à temperatura ambiente. Os solventes utilizados foram: *n*-hexano, ciclohexano, clorofórmio, diclorometano, éter etílico, acetonitrila, éter metílico *tert*-butílico (MTBE) e acetona.

Após o tempo pré-estabelecido, os filmes não apresentaram alterações macroscópicas, e portanto puderam ser usados nesses meios em estudos posteriores nas reações de esterificação e transesterificação.

#### 5.4- Estabilidade dos filmes com as lipases

Foram realizados experimentos com algumas lipases de diferentes procedências, tais como a LBC, AK-20, F-AP15, A-12, AY-30 e M-10, todas da marca AMANO. As atividades já foram descritas na metodologia (item 4, pág. 13).

A **Tabela 5** mostra o aspecto macroscópico dos filmes com a lipase LBC nas diferentes proporções de amido/PVA. Os filmes com as características apresentadas nas entradas 2 e 5 apresentaram melhores resultados e foram usados para testes com as lipases AK-20, F-AP15, A-12, AY-30 e M-10.

**Tabela 5** - Aspecto macroscópico dos filmes com as lipases. <sup>(a)</sup>

Entrada	Amido (g)	PVA (g)	LBC	AK-20	F-AP15	A-12	AY-30	M-10
1	1,0	0,0	resistente maleável					
2	0,8	0,2	resistente maleável	resistente maleável	aspecto grudento	aspecto grudento	resistente, seco	resistente, maleável
3	0,6	0,4	resistente maleável					
4	0,4	0,6	maleável					
5	0,2	0,8	maleável	resistente maleável	resistente maleável	resistente maleável	resistente, seco, quebradiço	resistente, maleável, grudento
6	0,0	1,0	aspecto grudento					

<sup>(a)</sup> 0,2 g de sorbitol, 50 mg de cada lipase

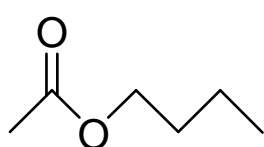
Esses sistemas biocatalíticos (suporte/lipase foram usados na reação de transesterificação do acetato de vinila com butanol, para se obter o acetato de butila. Foram avaliadas diversas condições experimentais, tais como a proporção

amido/PVA, solvente orgânico e reutilização. As melhores condições foram usadas para a obtenção dos outros ésteres de aroma **12**, **13**, **14** e **15**.

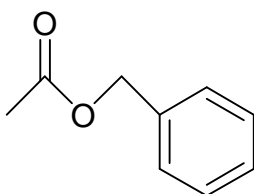
Os filmes com as lipases AY-30 e M-10 com as características da entrada 5, não foram usados, por terem aspecto muito grudento e de difícil manuseio.

### 5.5- Reação de esterificação e transesterificação

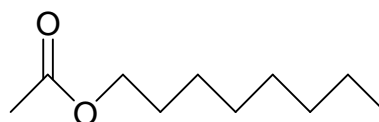
Neste trabalho, e conforme já mencionado foram estudadas reações de esterificação e transesterificação para a obtenção do acetatos de *n*-butila (aroma de abacaxi) (**11**), de benzila (aroma de pêssego) (**12**), de *n*-octila (aroma de laranja) (**13**), de *iso*amila (aroma de banana) (**14**) e o butanoato de etila (aroma de morango) (**15**).



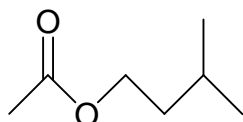
**11**



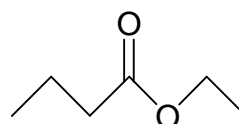
**12**



**13**



**14**



**15**

A seguir será descrita a preparação do acetato *n*-butila.



## 5.6- Preparação do acetato de *n*-butila (11)

### 5.6.1- Avaliação da influência de diferentes lipases

No primeiro estudo feito para a obtenção do acetato de *n*-butila, avaliou-se a influência de lipases de diversas procedências. Utilizou-se *n*-hexano como solvente.

Pelas análises de espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , foi possível determinar a porcentagem de conversão do éster com cada lipase testada. A conversão foi obtida comparando-se as áreas dos picos dos hidrogênios metilênicos do butanol com as do produto formado, acetato de butila.

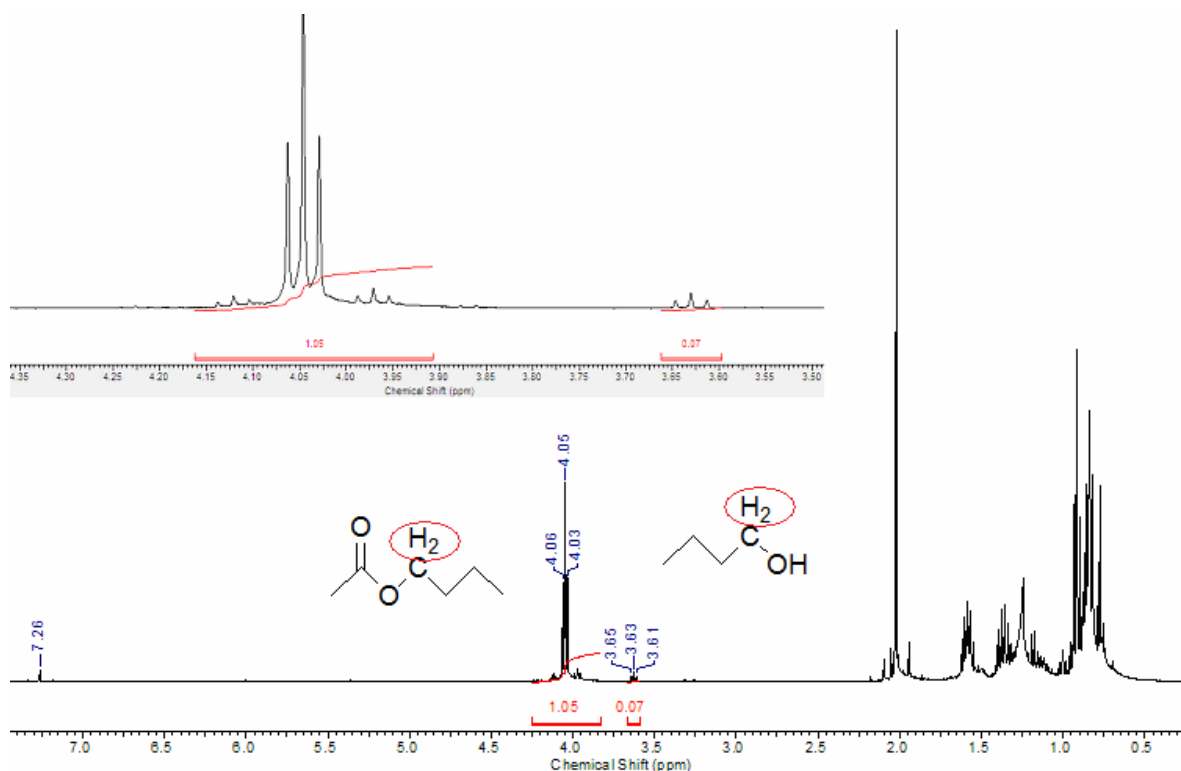
Os dados de conversão estão apresentados **Tabela 6**.

**Tabela 6** - Conversão em acetato de butila com diferente lipases.<sup>(a)</sup>

Entrada <sup>b</sup>	Amido (g)	PVA (g)	LBC (%)	AK-20 (%)	F-AP15 (%)	A-12 (%)	AY-30 (%)	M-10 (%)
1	1,0	0,0	93,7					
2	0,8	0,2	91,6	31,9	21,3	16,1	3,8	5,5
3	0,6	0,4	91,8					
4	0,4	0,6	89,2					
5	0,2	0,8	88,3	42,0	28,9	25,0	----	-----
6	0,0	1,0	91,0					

<sup>(a)</sup>determinado por RMN de  $^1\text{H}$ ; <sup>(b)</sup> 0,2 g de sorbitol, 50 mg de cada lipase, 24h, 26 °C.

A **Figura 15** mostra o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de uma alíquota da reação de transesterificação do acetato de vinila com o butanol, catalisada pelo sistema suporte/ LBC, com as características descritas para a entrada 2 (24 h). Destacam-se as áreas dos sinais dos prótons metilênicos do éster (triplete centrado em 4,05 ppm) e a do álcool (triplete centrado em 3,65 ppm). A conversão foi de 93,7%.

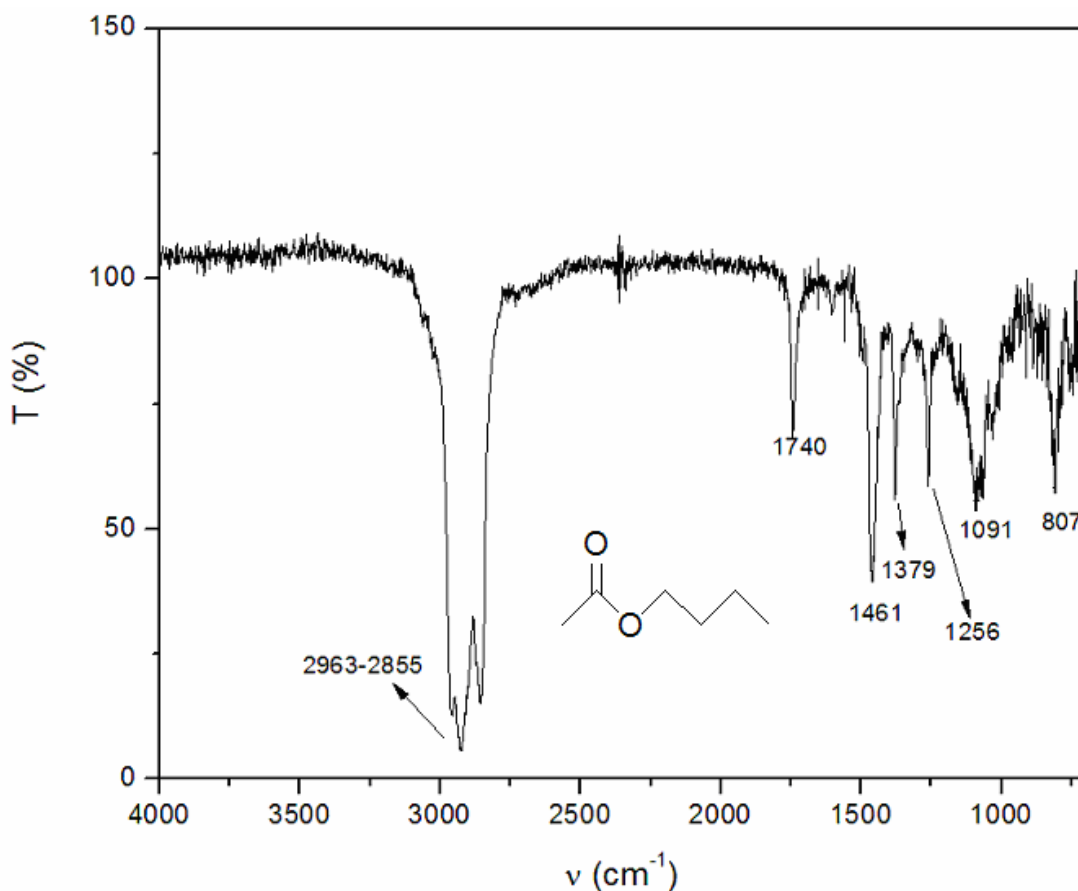


**Figura 15** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da reação do acetato de vinila com butanol [(amido (0,8 g)/PVA (0,2 g)/ LBC (50 mg), 26 °C, *n*-hexano, conv. 93,7%) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Na reação com a LBC imobilizada no filme formado por 0,8 g amido/0,2 g PVA/0,2 g sorbitol, obteve-se o éster com 91,6 %. Ao utilizar os filmes com as outras proporções de amido e de PVA, as conversões em éster também foram boas e variaram de 88,3-91,8 %. Em geral, verificou-se que os resultados não foram influenciados pela composição do suporte.

Utilizando-se as lipases AK-20, F-AP15, AY-30 e M-10 imobilizadas nos filmes com as características das entradas 2 e 5, as conversões em éster (**11**) foram menores. Os melhores resultados foram obtidos com a lipase AK-20, formando o produto com conversões de 31,9 e 42 %. Ao se utilizar as demais lipases imobilizadas, as conversões variam de 28,9-3,8 %. Estes dados mostram que a procedência e pureza do biocatalisador são importantes para se obter o produto em alta conversão. Resultados similares foram obtidos na preparação de diferentes ésteres alquílicos, com lipases imobilizadas em filmes de carboximetilcelulose e PVA.<sup>18</sup>

Conforme descrito no item 4.5, o éster 11 foi purificado e analisado por espectroscopia de IV, como mostra a **Figura 16**.



**Figura 16** – Espectro de IV do acetato de *n*-butila purificado (pastilha de KBr).

Analisando a Figura 16, pode-se observar bandas características do acetato de *n*-butila. Na região de 1740 cm<sup>-1</sup> observa-se uma banda correspondente à carbonila de éster (C=O), em 1256 cm<sup>-1</sup>, a de estiramento da ligação C-O, também de um éster. Em 2963-2855 cm<sup>-1</sup>, observam-se as bandas características de estiramento de C-H alifático.

### 5.6.2- Efeito da massa de lipase

Para avaliar a influência da massa da LBC, foram preparados filmes de amido/PVA com as proporções descritas nas entradas 2 e 5 com a lipase LBC. Os suportes foram preparados com 20, 30 e 50 mg. Os resultados de conversão em éster estão apresentados na **Tabela 7**.

**Tabela 7** - Conversão<sup>(a)</sup> do acetato de *n*-butila em função da quantidade de lipase

Entrada	Amido (g)	PVA (g)	20 mg (%)	30 mg (%)	50 mg (%)
2	0,8	0,2	83,3	89,0	91,6
5	0,2	0,8	85,0	78,1	88,3

(a) determinada por RMN de <sup>1</sup>H, sorbitol (0,2 g), t=26 °C, hexano

Observa-se que o éster foi obtido com boas conversões mesmo quando foram utilizados apenas 20 mg de LBC (83,3-85,0 %). Para fins comparativos, foram usados 50 mg em outros estudos.

### 5.6.3- Reutilização dos sistemas biocatalíticos

Para avaliar a eficiência da reutilização da lipase imobilizada, os filmes preparados com as condições descritas nas entradas 2 e 5, foram reutilizados depois que os suportes ficaram estocados por determinado período em solvente orgânico.

A **Tabela 8** mostra os resultados da reutilização dos suportes para a obtenção do acetato de butila.

**Tabela 8** - Conversões do éster (11) em sucessivas reutilizações<sup>(a)</sup>

Entrada	Amido (g)	PVA (g)	1° uso (%)	2° uso <sup>(a)</sup> (%)	3° uso <sup>(b)</sup> (%)	4° uso <sup>(c)</sup> (%)	5° uso <sup>(d)</sup> (%)
2	0,8	0,2	91,6	85,6	91,9	58,4	58,3
5	0,2	0,8	88,3	78,5	92,0		

(a) determinadas por RMN de <sup>1</sup>H, 0,2 g sorbitol, t=26 °C, (a) 42 dias, (b) 150 dias, (c) 208 dias, (d) 230 dias, em hexano.

Este estudo mostra o quanto é eficaz a imobilização da lipase LBC, considerando que mesmo estocada por 230 dias em solvente orgânico, a conversão em éster foi de 58,3 %, sendo portanto uma das vantagens deste método.

As conversões obtidas no terceiro uso foram maiores que as anteriores (91,9 e 92,0 %). Esse resultado pode ser explicado considerando-se que os filmes não foram lavados adequadamente, e que ainda continham os reagentes e o produto.

#### 5.6.4- Efeito da influência do solvente

Foram usados solventes de diferentes polaridades para avaliar a influência destes na obtenção do acetato de *n*-butila, utilizando como catalisadores as lipases LBC e AK-20 imobilizadas em filme de amido/PVA com as proporções de 0,8/0,2g. Os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 9**.

**Tabela 9** - Efeito do solvente orgânico na conversão do acetato de *n*-butila.<sup>(a)</sup>

Solvente	Log <i>P</i> <sup>(b)</sup>	Conv. LBC (%)	Conv. AK-20 (%)
hexano	3,5	91,6	39,0
ciclohexano	3,2	97,3	76,7
clorofórmio	2,0	55,2	32,1
MTBE	1,43	76,7	47,7
diclorometano	0,93	50,0	44,9
éter etílico	0,83	38,1	13,7
acetona	-0,23	60,4	25,0
acetonitrila	-0,33	51,1	17,7

<sup>(a)</sup> 25 mL de solvente; 26 °C; 50 mg de lipase; <sup>(b)</sup> logaritmo do coeficiente de partição octanol/água.<sup>37</sup>

Os resultados obtidos mostraram que utilizando-se solventes menos polares ( $\log P > 3$ ) tais como hexano e ciclohexano, foram obtidas as maiores conversões sendo de 32,1 a 97,3%. Quando foram utilizados os solventes mais polares ( $\log P < 3$ ), o éster **11** foi obtido com conversões menores, variando de 13,7 a 76%.

Quando se empregou o MTBE ( $\log P$  1,43), as conversões em acetato de butila foram de 47,7 e 76,7 %, que são maiores do que ao usar o clorofórmio, um solvente menos polar. Assim, o MTBE também pode ser usado para a obtenção do éster.

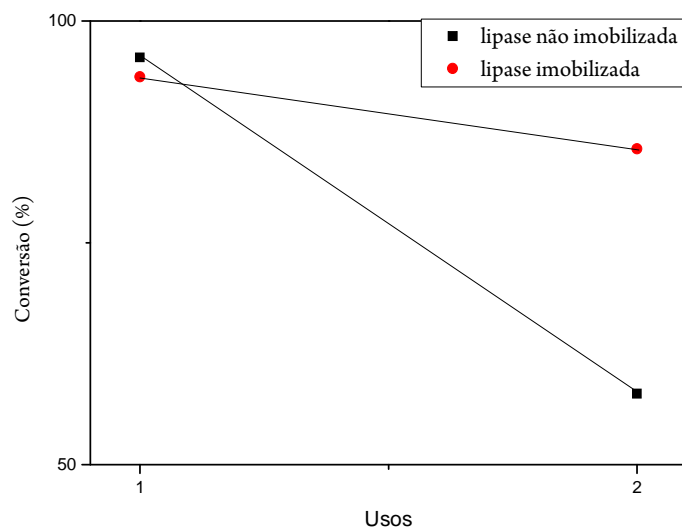
Esses resultados estão de acordo com dados obtidos em outros trabalhos, que descrevem que a atividade da enzima é menor em solventes polares. Já está bem estabelecido que é necessária uma quantidade mínima de água em torno da enzima imobilizada ou não, para a manutenção da atividade catalítica. Postula-se que os solventes mais polares, por serem hidrofílicos, podem retirar a camada de água essencial ao redor da enzima, causando uma certa distorção na conformação natural e alterando a atividade catalítica do biocatalisador. Portanto, os solventes apolares (hidrofóbicos) são os mais adequados para serem usados em reações catalisadas por enzimas.<sup>30,37,38</sup>

#### **5.6.5- Obtenção do acetato de butila com a LBC não imobilizada**

Foi realizada a reação de transesterificação do acetato de vinila com butanol catalisada por LBC não imobilizada, em solvente orgânico. Foram usadas quantidades equimolares (2 mmol) dos reagentes, 50 mg de LBC em 30 mL de *n*-hexano. A reação foi mantida em agitação orbital por 24 h a 26 °C, e o éster foi obtido com conversão de 95,9 %.

Depois de filtrar e lavar a LBC, recuperaram-se 26 mg da lipase. Esta foi reutilizada na mesma reação, e sob as mesmas condições experimentais. A conversão em produto foi de 58,0 %.

Na **Figura 17**, está apresentado um gráfico comparando o segundo uso da lipase LBC imobilizada (condições da entrada 2, Tabela 8) com o da LBC não imobilizada.



**Figura 17** - Comparação do reutilização da LBC imobilizada com a não imobilizada (26 °C, 24 h).

Foi observado um decréscimo acentuado da conversão em **11** ao utilizar a LBC não imobilizada. Sabe-se que a atividade catalítica pode ser afetada pelo solvente orgânico, e que este que pode desnaturar a enzima alterando a estrutura nativa. Após imobilização, em geral, as enzimas mantêm a estrutura tridimensional praticamente inalterada.<sup>6,20</sup>

Por esses e outros motivos (incluindo o custo), constata-se a importância da imobilização para utilização em reações orgânicas, podendo ser reutilizada por várias vezes sem perda significativa do seu poder catalítico.

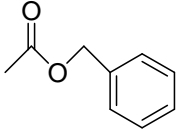
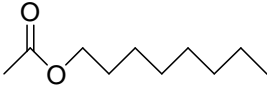
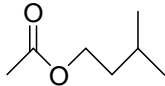
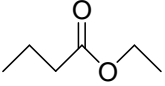
#### **5.6.6- Preparação dos ésteres de aroma 12, 13, 14 e 15**

Com as melhores condições obtidas na conversão do acetato de butila, foram preparados os ésteres **12** (acetato de benzila), **13** (acetato de octila), **14** (acetato de isoamila) e **15** (butanoato de etila).

Foi selecionada a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) imobilizada no filme de amido (0,8 g)/PVA (0,2 g)/sorbitol (0,2 g). As reações foram feitas em n-hexano.

Os resultados das conversões em éster estão apresentados na **Tabela 10**.

**Tabela 10** – Conversão dos ésteres **12,13,14** e **15**<sup>(a)</sup>

	<b>Éster</b>	<b>Conversão(%)</b>
<b>12</b>		60,0
<b>13</b>		81,0
<b>14</b>		62,6
<b>15</b>		80,0

(a)26 °C; agitação orbital; 24 h; em hexano

O sistema amido/PVA/LBC foi muito eficaz como catalisador e os ésteres foram obtidos com conversões de 60% (**12**) a 81% (**13**).

Esses resultados mostram que a LBC imobilizada e filme de amido/PVA podem ser aplicados para a obtenção de diversos ésteres de cadeias relativamente pequenas.



## 6- CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas neste trabalho são:

- ✓ A extração do amido da mandioca mostrou-se viável, obtendo-se, 72 g de amido após a secagem;
- ✓ Os filmes feitos com amido/PVA usando como plastificante o sorbitol, são consistentes e maleáveis conservando uma porcentagem de água de 2,33-10,05 %.
- ✓ Os suportes mostraram-se estáveis nos diversos solventes orgânicos testados;
- ✓ Utilizando a LBC imobilizada em filmes de amido/PVA, o acetato de butila (**11**) foi obtido com conversões de 88,3-93,7 %;
- ✓ Com as lipases AK-20, F-AP15, A-12, AY-30 e M-10 imobilizadas, as conversões em (**11**) foram moderadas, sendo de 42 % (AK-20) a 5,5 % (M-10);
- ✓ A reutilização dos suportes foi eficiente, obtendo-se (**11**), com conversão de 58,3-91,6 %;
- ✓ As maiores conversões em éster, foram obtidas ao utilizar os solventes menos polares ( $\log P > 3$ ), sendo de 32,1 a 97,3%;
- ✓ Ao utilizar a LBC não imobilizada, o éster (**11**) foi obtido com 95,9 %,mas na segunda reutilização a conversão foi apenas de 50 %.
- ✓ Os ésteres **12**, **13**, **14** e **15** foram obtidos com conversões de 60-81 %, ao utilizar a LBC imobilizada em filme de amido/PVA.

Portanto, a utilização de filmes de amido/PVA como suportes para imobilização de lipases mostrou-se extremamente vantajosa. O amido pode ser extraído de diversos grãos e tubérculos que são abundantes na natureza, tornando o processo barato, além de ser biodegradável. Salienta-se também a vantagem da reutilização.

## 7- PERSPECTIVAS

- Utilizar amidos e lipases de outras fontes naturais;
- Avaliar a influência da temperatura nas reações de esterificação e transesterificação;
- Imobilizar simultaneamente duas ou mais lipases no mesmo suporte, o que é chamado de “coquetel enzimático”;
- Sintetizar outros ésteres de aroma, com as melhores condições obtidas para este sistema.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Lehninger, A. L.; Principles of Biochemistry, 3<sup>a</sup> ed., cap. 8, Worth Publishers, NY, **2000**.
- 2- Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B.; Química Orgânica, vol. 2, 8<sup>a</sup> Ed., cap. 24, LTC Editora, RJ, **2006**.
- 3- Campbell, M. K.; Farrell, S. O.; Bioquímica, 5<sup>a</sup> Ed., cap. 6, Thomson, SP, **2006**.
- 4- <http://pt.wikipedia.org/wiki/Enzima>, acessado em 22 de novembro de **2010**.
- 5- Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R.; Gama, M.; Engenharia Enzimática, cap. 1, 2 e 5 Lidel, Lisboa, **2003**.
- 6- Faber, K.; Biotransformations in Organic Chemistry, 3<sup>a</sup> ed., cap. 3, Springer, Berlin, **1997**.
- 7- <http://www.daanvanalten.nl/quimica/module12/cap0512enzimas.html>, acessado em 22 de novembro de 2010.
- 8- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A.; Industrial applications of microbial lipases, *Enzym. Microb. Technol.*, 39 (**2006**) 235–251.
- 9- Hara, P.; *et al*; Supported ionic liquids in *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed asymmetric acylation, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 67 (**2010**) 129-134.
- 10- Cabrera, Z.; *et al*; Highly enantioselective biocatalysts by coating immobilized lipases with polyethyleneimine, *Catal. Commun.* 11 (**2010**) 964-967.
- 11- <http://peds.oxfordjournals.org/content/18/11.cover-expansion>, acessado em 23 de novembro de **2010**.
- 12- Sharma, R.; Chisti, Y.; Benerjee, C.; Production, purification, characterization, and applications of lipase, *Biotechnol. Adv.* 19 (**2001**) 627-662.
- 13- Cheirsilp, B.; Jeamjounkhaw, P.; H-Kittikun, A.; Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 59 (**2009**) 206–211.

- 14-Paula, A. V. *et al*; Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-poli-álcoolvinílico empregando diferentes metodologias, *Quim. Nova*, 31(1), (2008) 35-40.
- 15-Mateo, C., *et al*; Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.*, 40 (2007) 1451-1463.
- 16-Shu, Z-Y., *et al*; Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases *J.Mol.Catal: Enzym.* 62, 1-8, 2010.
- 17-Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry – Editado por Gerhartz, W.; vol. A9, 5<sup>a</sup> ed., VHC Verlagsgesellschaft, Alemanha, 1987.
- 18-Dalla-Vechia, R.; *et al*; Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipase immobilization, *Process Biochem.* 40 (2005) 2677–2682.
- 19-Ozturk, T. K.; Kilinc, A.; Immobilization of lipase in organic solvent in the presence of fatty acid additives, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 67 (2010) 214–218.
- 20-Marsaioli, A.; Porto, A., L., M.; Biocatálise e Biotransformações – Fundamentos e aplicações; Vol. 1, pág. 286; Schoba, São Paulo, 2010.
- 21-Martin, M. T.; Plou, F. J.; Alcalde, M.; Ballesteros, A.; Immobilization on eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 21 (2003) 299–308.
- 22-Tan, T.; Wang, F.; Zhang, H.; Preparation of PVA/chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 18 (2002) 325-331.
- 23-Mohammed, Z. H.; *et al*; Application of polymer blending laws to composite gels of agarose and crosslinked waxy maize starch, *Carbohydr. Polym.* 36 (1998) 27-36.
- 24-Haider, T.; Husain, Q.; Immobilization of  $\beta$ -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk, *Int. Dairy J.* 19 (2009) 172-177.
- 25-<http://www.abam.com.br/revista/revista7/riquezas.php>, acessado em 22 de novembro de 2010.
- 26-Tester, R. F.; Karkalas, J.; Qi, X.; Starch—composition, fine structure and architecture, *J. Cereal Sci.* 39, 151–165, 2004.

- 27-Corradini, E.; *et al*; Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose, *Polímeros*, 15(4), (2005) 268-273.
- 28-Singh, J.; Kaur, L.; McCarthy, O. J.; Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food, *Food Hydrocolloids* 21 (2007) 1–22.
- 29-<http://www.cbpak.com.br/>, acessado em 22 de novembro de 2010.
- 30-Sebrão, D.; *et al*; Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. *Quim. Nova*, 30 (5), (2007) 1182-1187.
- 31-Dave, R.; Madamwar, D.; Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA-alginate-boric acid, *Process Biochem.* 41 (2006) 951-955.
- 32-Chou, W.-L.; Removal and adsorption characteristics of polyvinyl alcohol from aqueous solutions using electrocoagulation, *J. Hazard. Mater.* 177, 842-850, 2010.
- 33-[http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81lcool\\_polivin%C3%ADlico](http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81lcool_polivin%C3%ADlico), acessado em 22 de novembro de 2010.
- 34-Bezbradica, D.; *et al*; The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 45 (2007) 97-101.
- 35-<http://www.amano-enzyme.co.jp/>, fichas técnicas-acessado em 22 de novembro de 2010.
- 36-Morita, T.; Assumpção, R. M. V.; Manual de soluções, reagentes e solventes, 2ª Ed., pág. 316, Editora Edgar Blucher LTDA, São Paulo, 1995.
- 37-Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents; *Biotechnol. Bioeng.*; 1987, 30,31.
- 38-Tamalampudi, S.; *et al*; Immobilized recombinant *Aspergillus oryzae* expressing heterologous lipase: An efficient whole-cell biocatalyst for enantioselective transesterification in non-aqueous medium, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 48 (2007) 33-37.

## **9- ANEXOS**

Com os resultados obtidos até esta data, foi apresentado um trabalho na XVIII SBQ-Sul, (11 a 13 de novembro de 2010 – Curitiba – PR).

A cópia do mesmo está anexada a seguir.



***“QUÍMICA: CONTRIBUIÇÕES PARA O FUTURO”***