

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES AROMATIZANTES
A PARTIR DE DIFERENTES SUBSTRATOS
EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO

NATÁLIA PAROUL

Caxias do Sul, RS

2011

NATÁLIA PAROUL

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES AROMATIZANTES
A PARTIR DE DIFERENTES SUBSTRATOS
EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Débora de Oliveira

Caxias do Sul, RS

2011

Natalia Paroul

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES AROMATIZANTES
A PARTIR DE DIFERENTES SUBSTRATOS
EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Débora de Oliveira

Tese defendida em 28 de novembro de 2011

Orientadora:

Prof. Dr. Débora de Oliveira



Membros da banca:

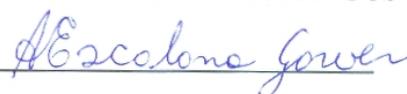
Prof. Dr. Marco Di Luccio - UFSC



Prof. Dr. Rogério M. Dallago - URI



Prof. Dr. Adriana E. Gower - UCS



Caxias do Sul, RS, 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

P257s Paroul, Natália
Síntese enzimática de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico / Natália Paroul. 2011.
114 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.
“Orientação: Prof^o. Dr^a. Débora de Oliveira”

1. Enzimas - Síntese 2. Compostos orgânicos. 3. Ésteres. 4. Alcoóis. I. Título.

CDU : 2.ed. 577.15-044.962

Índice para catálogo sistemático:

1. Enzimas – Síntese	577.15-044.962
2. Compostos orgânicos	547.1
3. Ésteres	547.26'11
4. Alcoóis	547.26

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Kátia Stefani – CRB 10/1683

*Pedras no caminho? Guardo todas, um
dia vou construir um castelo...*

Fernando Pessoa

*Ao meu marido Rogério pelo amor,
dedicação e companherismo em todos os
momentos da minha vida. A construção
desta obra não seria possível sem o teu
apoio.*

*A minha querida e amada filha, Nicole.
pelo simples fato de existir.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha família, por estar sempre presente em minha vida e ter me dado força em todos os momentos de dificuldade.

À minha orientadora, Débora de Oliveira, pela confiança e dedicação que depositou em mim, oportunizando o desenvolvimento desse trabalho; e pela ajuda, amizade e paciência.

À Profa. Helen Trechel pela orientação durante as etapas de planejamento de experimentos e tratamento de dados.

Ao Prof. J. Vladimir de Oliveira pela ajuda, discussões e, principalmente, pelo conhecimento repassado.

Ao Prof. Rogério Dallago por toda a contribuição dada para a realização deste trabalho.

Aos meus alunos e bolsistas Viviane, Maike e Luana, do Curso de Química Industrial da URI-Campus de Erechim, pela valiosa contribuição em desenvolvimento prático deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Departamento de Química da URI: Daniel, Fábio e Luciana, pela amizade, auxílio, companheirismo e risadas.

À Universidade Regional Integrada de Alto Uruguai e das Missões pela oportunidade e infra-estrutura oferecida.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Aromas	4
2.2 Definição e Aplicação	5
2.2.1 Aromatizantes/Aromas naturais -----	5
2.2.2 Aromatizantes/Aromas artificiais -----	6
2.3 Aromas e Fragrâncias Terpênicos	7
2.4 Bioaromas	8
2.5 Formas de Obtenção de Aromas	9
2.6 Enzimas	14
2.7 Produção Enzimática de Bioaromas em Solventes Orgânicos	16
2.8 Produção Enzimática de Aromas em Sistemas Livres de Solventes	20
2.9 Produção de Aromas a Partir de Álcoois Monoterpênicos	21
2.10 Mecanismo Cinético de Esterificação Enzimática	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Materiais	30
3.1.1 Substratos para a reação enzimática -----	30
3.1.2 Enzima para a reação enzimática -----	30
3.2 Métodos	31
3.2.1 Método para determinação da atividade de esterificação da lipase -----	31
3.2.2 Avaliação da solubilidade dos alcoóis em diferentes substratos -----	32

3.2.3 Procedimento experimental para a reação de esterificação enzimática-----	32
3.2.4 Determinação da conversão da reação -----	33
3.2.5. Estratégia de utilização de planejamentos de experimentos sequenciais -----	33
3.2.6 Otimização da produção enzimática de ésteres a partir de alcoóis primários e secundários-----	35
3.2.7 Otimização da produção enzimática de ésteres terciários -----	36
3.2.8 Estudo cinético da produção enzimática de geranil oleato e geranil propionato-----	38
3.2.9 Estudo cinético da produção enzimática de mentil acetato -----	40
3.2.10 Avaliação da taxa inicial de reação -----	40
3.2.11 Ciclos de reuso da enzima -----	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Produção Enzimática de Ésteres a Partir do Geraniol	42
4.1.1 Produção enzimática de geranil oleato -----	43
4.1.1.1 Otimização de produção de geranil oleato	43
4.1.1.2 Cinética da produção enzimática de geranil oleato	50
4.1.2 Produção enzimática de geranil propionato -----	55
4.1.2.1 Otimização de produção de geranil propionato.....	55
4.1.2.2 Cinética da produção enzimática de geranil propionato.....	60
4.1.3 Ciclos de utilização da lipase para a produção de geranil oleato e geranil propionato -----	64
4.2 Produção Enzimática de Ésteres a Partir do (±) Mentol	65
4.2.1 Otimização de produção de ésteres de mentol -----	65
4.2.2 Cinética da produção enzimática de mentil acetato -----	70
4.3 Produção Enzimática de Ésteres a Partir do (±) Linalol	73
4.3.1 Otimização de produção de ésteres de linalol-----	73
4.4 Produção Enzimática de Ésteres a Partir do Óleo Essencial de citronela	83
4.4.1 Composição química do óleo essencial de citronela (<i>Cymbopogon winterianus</i>) ----	83
4.4.2 Otimização de produção de citronelil e geranil oleato-----	84
4.4.3 Otimização de produção de citronelil e geranil propionato -----	91
4.5 Considerações Finais	95
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	97

5.1. Conclusões	97
5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros.....	98
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXO.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados no primeiro planejamento fatorial completo 2^3 para produção enzimática de ésteres de geraniol, mentol e óleo essencial de citronela.	35
Tabela 2. Variáveis e níveis estudados no segundo planejamento fatorial completo 2^2 para produção enzimática de geraniol oleato.	36
Tabela 3. Variáveis e níveis estudados no terceiro planejamento DCCR 2^2 para otimização das condições para produção enzimática de geraniol propionato.....	36
Tabela 4. Variáveis e níveis no planejamento experimental 2^3 completo para produção de linalil ésteres.	37
Tabela 5. Variáveis e níveis no planejamento experimental 2^3 completo para produção de linalil acetato.....	37
Tabela 6. Variáveis e níveis no planejamento experimental 2^2 completo para produção de linalil acetato.....	38
Tabela 7. Efeito da razão molar entre os substratos na produção enzimática de geraniol oleato.	38
Tabela 8. Efeito da concentração de enzima na produção enzimática de geraniol oleato....	38
Tabela 9. Efeito da temperatura na produção enzimática de geraniol oleato.	39
Tabela 10. Efeito da razão molar entre os substratos na produção enzimática de geraniol propionato.....	39
Tabela 11. Efeito da concentração de enzima na produção enzimática de geraniol propionato.....	39
Tabela 12. Efeito da temperatura na produção enzimática de geraniol propionato.	39
Tabela 13. Efeito da razão molar entre os substratos na produção enzimática de mentil acetato.....	40
Tabela 14. Matriz do primeiro planejamento experimental 2^3 (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em geraniol oleato e geraniol propionato em 6 horas de reação.	44

Tabela 15. Matriz do segundo planejamento experimental 2 ² realizado (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em geranil oleato conduzidas em 40°C, agitação de 150rpm e tempo de reação de 6 horas.	47
Tabela 16. Análise de variância para produção de geranil oleato no segundo planejamento experimental.	48
Tabela 17. Matriz do terceiro planejamento experimental (valores codificados e reais) com respostas em conversão em geranil propionato nas reações conduzidas em 40°C, agitação de 150rpm e tempo de reação de 6 horas.....	56
Tabela 18. Análise de variância para produção de geranil propionato no terceiro planejamento experimental.....	56
Tabela 19. Matriz do primeiro planejamento experimental completo com as respostas em termos de conversão em mentil acetato.....	66
Tabela 20. Análise de variância para produção de mentil acetato.....	68
Tabela 21. Matriz do primeiro planejamento experimental completo com as respostas em termos de conversão em linalil acetato.....	74
Tabela 22 - Matriz do segundo planejamento experimental completo com as respostas em termos de conversão em linalil acetato.....	76
Tabela 23. Coeficientes de regressão das variáveis na produção enzimática de linalil acetato.	77
Tabela 24. Matriz do terceiro planejamento experimental com as respostas em termos de conversão em linalil acetato.	78
Tabela 25. Coeficientes de regressão para a produção de linalil acetato.	79
Tabela 26. Análise de variância para a produção de linalil acetato.....	79
Tabela 27. Composição química do óleo essencial de citronela (<i>Cymbopogon winterianus</i>).	84
Tabela 28. Matriz do planejamento experimental 2 ³ completo com as respostas em termos de área de citronelil oleato e geranil oleato.	85
Tabela 29. Coeficientes de Regressão das variáveis na produção de citronelil oleato.....	86
Tabela 30. Análise de variância para produção de citronelil oleato.....	87
Tabela 31. Coeficientes de Regressão das variáveis na produção de geranil oleato.	89

Tabela 32. Análise de variância para produção de geranyl oleato.	90
Tabela 33. Matriz do planejamento experimental 2^3 completo com as respostas em termos de área de citronelil propionato e geranyl propionato.	92
Tabela 34. Análise de variância para produção de citronelil propionato.	94
Tabela 35. Análise de variância para produção de geranyl propionato.	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do mecanismo Ping-Pong Bi-Bi. A e B são substratos, P e Q são produtos, E e F são diferentes configurações da enzima livre, EA-FP e FB-EQ são complexos de transição transição.	26
Figura 2. Reação de esterificação de geraniol e ácido oleico (Esquema 1) e Reação de esterificação de geraniol e ácido propiônico (Esquema 2).	43
Figura 3. Gráfico de Pareto da produção de geranil oleato (6 horas de reação).....	45
Figura 4. Gráfico de Pareto da produção de geranil propionato (6 horas de reação).	46
Figura 5. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de geranil oleato em função da concentração de enzima e razão molar.	49
Figura 6. Efeito da razão molar sobre a conversão de geranil oleato à temperatura de 50°C, concentração de enzima de 5,5% (m/m substratos) e agitação de 150 rpm.	51
Figura 7. Efeito da concentração de enzima sobre a conversão de geranil oleato à temperatura de 50°C, razão molar geraniol: ácido oleico de 3:1 e agitação 150rpm.....	53
Figura 8. Efeito da temperatura sobre a conversão de geranil oleato à razão molar ácido oleico:geraniol de 3:1, concentração de enzima de 5,5% e agitação de 150rpm.	54
Figura 9. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de geranil propionato em função da concentração de enzima e razão molar.	58
Figura 10. Efeito da razão molar sobre a conversão de geranil propionato à temperatura de 50°C, concentração de enzima de 10% (m/m substratos) e agitação de 150rpm.	61
Figura 11. Efeito da concentração de enzima sobre a conversão de geranil propionato à temperatura de 50°C, razão molar geraniol : ácido propiônico de 3:1 e agitação de 150rpm.	62

Figura 12. Efeito da temperatura sobre a conversão de geranil propionato à razão molar geraniol : ácido propiônico de 3:1, concentração de enzima de 10% e agitação de 150rpm.	63
Figura 13. Gráfico de Pareto da produção de mentil acetato (6 horas de reação).	67
Figura 14. Superfícies de resposta e curvas de contorno para produção de mentil acetato (a) em função da concentração de enzima e temperatura, (b) em função da temperatura e razão molar, (c) em função da concentração de enzima e razão molar.....	69
Figura 15. Efeito da razão molar sobre a conversão de mentol e anidrido acetico à temperatura 50°C, concentração de enzima de 5,5% (m/m substratos) e agitação 150 rpm.	70
Figura 16. Gráfico de Pareto da produção de linalil acetato (6 horas de reação).	75
Figura 17. Superfície de resposta ilustrando o efeito da temperatura e da concentração de enzima na produção de linalil ésteres.	80
Figura 18. Cromatograma do óleo essencial de citronela.....	83
Figura 19. Superfícies de resposta e curvas de contorno para produção de citronelil oleato (a) em função da concentração de enzima e razão molar, (b) em função da temperatura e razão molar, (c) em função da concentração de enzima e temperatura.	88
Figura 20. Superfícies de resposta e curvas de contorno para produção de geranil oleato (a) em função da concentração de enzima e razão molar, (b) em função da temperatura e razão molar, (c) em função da concentração de enzima e temperatura.....	91

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a otimização dos parâmetros das reações para a síntese de ésteres a partir dos alcoóis monoterpênicos (geraniol, mentol e linalol) e ácidos propiônico, oleico e anidrido acético catalisadas pelas lipase Novozym 435. A condição ótima para conversão do geraniol e ácido oleico (94%) foi razão molar (ácido oleico: geraniol) 5:1, agitação de 150 rpm, 40°C, concentração de enzima de 10% em massa. A condição otimizada para produção de geranil propionato (95%) foi razão molar (ácido propiônico:geraniol) 3:1, agitação de 150 rpm, 40°C, concentração de enzima de 10% em massa em relação aos substratos com mesmo tempo de reação. O tempo de reação de produção de ésteres foi fixado em 6 horas. O estudo cinético realizado avaliou os efeitos da razão molar ácido: álcool, concentração de enzima (%) (m/m substratos) e temperatura. Conversões superiores a 90% em 1 hora de reação puderam ser observadas com geraniol e os dois ácidos testados. A atividade residual da enzima Novozym 435 foi de aproximadamente 98% após 10 ciclos consecutivos de reutilização na produção de geranil propionato e geranil oleato. Na produção de mentil acetato, melhores conversões (49,68%) foram atingidas em temperatura de 60°C, razão molar 5:1 e concentração de enzima (m/m substrato) 10% com 6 horas de reação. O estudo do efeito da razão molar mentol:anidrido acético na cinética da produção demonstrou que conversões acima de 45% podem ser obtidas usando razão molar (mentol:anidrido acético) 1:1, temperatura 50°C, concentração de enzima 5,5% (m/m substrato) em 6 horas de reação. Na produção enzimática de ésteres de linalol utilizando como substratos linalol e anidrido acético, a maior conversão (5,4%) foi obtida em condições de maior temperatura (70°C), razão molar anidrido:álcool 9:1, concentração de enzima 5% (m/m substrato) em 6 horas de reação. A esterificação de óleo essencial bruto da citronela demonstrou que altas conversões em ésteres de ácidos oleico e propiônico podem ser obtidas em condições semelhantes: temperatura 60°C, razão molar óleo essencial:anidrido 1:1, concentração de enzima 10% (m/m substrato), atingindo 98,9% de citronelil e 82,5% de geranil oleatos para ácido oleico e 92,95% e 96,5% de citronelil e geranil propionatos para o ácido propiônico, respectivamente.

Palavras-chave: Síntese enzimática, ésteres aromatizantes, alcoóis monoterpênicos, Novozym 435.

ABSTRACT

The main objective of this work was to optimize the reaction parameters for synthesis of esters from terpenic alcohols (geraniol, mentol and linalool) and propionic and oleic acids and acetic anhydride, catalyzed by the commercial immobilized lipase Novozym 435. The optimum condition for the conversion of geraniol and oleic acid (94%) was substrates molar ratio of 5:1, 150 rpm, 40°C and enzyme concentration of 10wt%. The optimized condition for the production of geranyl propionate (95%) was substrates molar ratio of 3:1, 150 rpm, 40°C and enzyme concentration of 10wt%. The reaction time for esters production was fixed at 6 hours. The kinetic study evaluated the effects of substrates molar ratio, enzyme concentration and temperature on the reaction conversion. Conversions higher than 90% were achieved after 1 hour of reaction, using geraniol and propionic and oleic acids as substrates. The residual activity of Novozym 435 was about 98% after 10 cycles of use for the production of geranyl oleate and geranyl propionate. For the production of menthyl acetate, higher conversions (49.68%) were obtained at 60°C, substrates molar ratio of 5:1 and enzyme concentration of 10wt%, after 6 hours of reaction. The effect of the substrates molar ratio on the kinetics demonstrated that conversions higher than 45% could be achieved at substrates molar ratio of 1:1, 50°C and enzyme concentration of 5.5wt%, after 6 hours of reaction. The enzymatic production of linalool esters using linalool and acetic anhydride as substrates, led to higher conversions (5.4%) at higher temperatures (70°C), anhydride to alcohol molar ratio of 9:1 and enzyme concentration of 5wt% after 6 hours of reaction. The esterification of the citronella crude essential oil demonstrated that high conversions in esters of propionic and oleic acids could be obtained in similar experimental conditions: 60°C, oil to anhydride molar ratio of 1:1 and enzyme concentration of 10wt%, reaching 98.9% of citronellyl oleate and 82.5% of geranyl oleate and 92.95% and 96.5% of citronellyl propionate and geranyl propionate, respectively.

Keywords: Enzymatic synthesis, flavoring esters, monoterpene alcohols, Novozym 435.

1. INTRODUÇÃO

Aromas e aromatizantes são compostos extremamente importantes para as indústrias de alimentos, bebidas, química, cosméticos e farmacêutica. Atualmente, observa-se a preferência de consumo de alimentos que contêm em sua formulação ingredientes naturais, em substituição aos aditivos químicos, o que faz com que esses produtos tenham apelo de mercado diferenciado. Compostos obtidos por catálise enzimática ou por ação microbiana podem ser considerados “naturais”, fato que promove grande aceitação por parte do consumidor, agregando, dessa forma, maior valor aos produtos que utilizam esses aromatizantes produzidos biotecnologicamente. Neste sentido, os ésteres são uma das importantes classes de compostos orgânicos com propriedades aromáticas, podendo ser sintetizados por vários mecanismos. Ésteres obtidos por via enzimática têm sido muito valorizados devido à sua obtenção em condições brandas, podendo ser considerados produtos naturais quando os substratos têm esta origem.

As propriedades biológicas dos ésteres dependem da natureza química dos reagentes de partida. Assim, ésteres produzidos a partir de ácidos alifáticos têm larga escala de aplicações devido a suas propriedades aromatizantes, surfactantes e de biodegradabilidade. Alguns ésteres também demonstram propriedades antibióticas e inseticidas e não são tóxicos para humanos. Por essa razão estão sendo usados como aditivos na indústria de alimentos, cosméticos, suplementos médicos e produtos de higiene bucal.

Os alcoóis terpênicos de origem natural podem ser interessantes substratos para esterificação enzimática visando à obtenção de aromas naturais. Uma fonte que poderia atender essa demanda são os óleos essenciais. Os óleos essenciais são constituídos por uma mistura complexa de hidrocarbonetos (terpenos, sesquiterpenos, etc.), compostos

oxigenados (alcoóis, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, ésteres fenólicos, etc.), e uma pequena quantidade de resíduos viscosos ou sólidos não voláteis (parafinas, ceras, etc.). Os compostos oxigenados carregam consigo o odor principal do óleo. Entre eles destacam-se alcoóis mono e sesquiterpênicos tais como geraniol, linalol, citronelol, elemol, eugenol, mentol, entre outros.

O geraniol, mentol e linalol ocorrem em vários óleos essenciais. Geraniol e linalol são encontrados em essências das rosas, da palmarosa, do pau-rosa e de citronela, estando presentes também, em pequenas quantidades, no gerânio, limão e várias outras essências. O mentol é o componente majoritário dos óleos essenciais obtidos da menta.

Em geral, métodos biocatalíticos de síntese de ésteres são preferíveis quando comparados com métodos químicos convencionais. A síntese enzimática envolvendo lipases apresenta diversas vantagens, pois pode garantir maiores rendimentos em reações com temperaturas próximas da ambiente, dependendo da metodologia e da enzima aplicadas, o que proporciona produtos de qualidade, com economia de energia e reduzida ocorrência de subprodutos.

O uso de lipases nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos eficientes processos executados pela natureza. A economia de energia e minimização da degradação térmica são provavelmente as maiores vantagens na substituição de tecnologias químicas convencionais pelas biológicas.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver um processo biotecnológico para produção de ésteres a partir de álcool primário (geraniol), álcool secundário (mentol), álcool terciário (linalol), óleo essencial bruto de citronela (*Cymbopogon winterianus*) e diferentes ácidos, via esterificação enzimática em sistema livre de solvente orgânico. Para atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- avaliar o efeito das variáveis do processo (razão molar, concentração de enzima e temperatura) empregando técnicas de planejamento experimental visando determinar as condições de processo que maximizem a conversão do mesmo;

- avaliar a cinética reacional em cada um dos sistemas estudados nas condições experimentais maximizadas, determinadas na etapa anterior;

- avaliar a influência do tamanho da cadeia alifática do ácido carboxílico e estrutura do álcool terpênico na produção de ésteres.

Neste sentido, a presente proposta reflete estudo de viabilidade técnica de produção de ésteres através de aplicação de tecnologias limpas, sistemas enzimáticos livres de solvente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, é apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte no que concerne à esterificação enzimática para produção de bioaromas na presença e ausência de solventes orgânicos. Com base no exposto anteriormente, levando em consideração os objetivos delineados para este trabalho, ênfase especial será dada ao sistema reacional contendo alcoóis primários, secundários e terciários.

2.1 Aromas

O aroma é um dos mais importantes atributos de alimentos, bebidas e cosméticos. Estima-se que aproximadamente 6400 voláteis naturais e 10000 compostos de fragrância sintéticos sejam conhecidos, sendo poucas centenas regularmente utilizadas em aromas e fragrâncias e cerca de 400 aromas químicos manufaturados em escala maior que uma tonelada por ano. Líderes no mercado de fragrâncias movimentam mais de US\$ 6 bilhões. A concorrência no mercado global e nacional acontece, principalmente, entre International Flavors & Fragrances (IFF), Givaudan, Firmenich e Symrise. No Brasil, as indústrias que produzem aromas e sabores chegaram a faturar mais de R\$1,5 bilhões em 2009, incluindo as pequenas unidades, que criam seus produtos de forma artesanal. As estimativas são da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Essenciais, Produtos Químicos Aromáticos, Fragrâncias, Aromas e Afins (ABIFRA), que aposta no crescimento do setor nos próximos anos (<http://www.freedom.inf.br>, 2010). Os aromas naturais são mais caros, em razão dos métodos de produção, que são mais lentos e muitas vezes de baixo rendimento, no entanto são preferidos pelas empresas em função da “quimiofobia” que existe entre os consumidores (Gerhard, 2004).

2.2 Definição e Aplicação

O consumo de alimentos e bebidas está inseparavelmente ligado à estimulação dos sentidos humanos. O aroma está intimamente relacionado à aceitação de alimentos por parte dos consumidores (Tan *et al.*, 1998; Maróstica, 2006).

A sensação de odor (cheiro) de um alimento é formada por misturas complexas de moléculas pequenas, geralmente hidrofóbicas, de muitas classes químicas que ocorrem em concentrações traços e são detectadas por células do epitélio do olfato da cavidade nasal.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), aromas e aromatizantes são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos, podendo ser classificados como naturais ou sintéticos.

2.2.1 Aromatizantes/Aromas naturais

São obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias primas naturais. Entende-se por matérias primas naturais os produtos de origem animal ou vegetal, normalmente utilizados na alimentação humana, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado (torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, enzimático, etc.).

De acordo com a legislação brasileira os aromatizantes/aromas naturais compreendem:

- ✓ Óleos essenciais

Mistura de compostos voláteis de origem vegetal, obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado).

✓ Extratos

Produtos obtidos por esgotamento a frio ou a quente de plantas ou animais com solventes permitidos, que posteriormente possam ser eliminados ou não. Os extratos devem conter os princípios sápidos aromáticos voláteis e fixos correspondentes ao respectivo produto natural.

✓ Bálsamos, oleoresinas e oleogomaresinas

Produtos obtidos mediante a exsudação livre ou provocada de determinadas espécies vegetais.

✓ Substâncias aromatizantes/aromas isolados

Substâncias quimicamente definidas, obtidas por processos físicos, microbiológicos ou enzimáticos adequados, a partir de matérias primas aromatizantes naturais ou de aromatizantes/aromas naturais (Risch & Ho, 2000).

2.2.2 Aromatizantes/Aromas artificiais

Um rápido progresso na produção de aromas teve início com o desenvolvimento da síntese orgânica. Mais de um século atrás a obtenção de cumarina (1868) e vanilina (1874) forneceram os primeiros aromatizantes artificiais, disponíveis por síntese. A partir destes compostos sintéticos, um número expressivo de aromas foi obtido por esta via em escala industrial (Serra *et al.*, 2005).

Segundo a ANVISA os aromatizantes sintéticos podem ser divididos em dois grupos: aromatizantes idênticos aos naturais e aromatizantes artificiais.

✓ Aromatizantes/aromas idênticos aos naturais:

Substâncias quimicamente definidas obtidas por síntese ou isoladas por processos químicos a partir de matérias primas de origem animal ou vegetal, que apresentam uma estrutura química idêntica à das substâncias presentes nas referidas matérias primas naturais (processadas ou não).

✓ Aromatizantes/aromas artificiais:

Compostos químicos obtidos por síntese, que ainda não tenham sido identificados em produtos de origem animal ou vegetal, utilizados por suas propriedades aromáticas, em seu estado primário ou preparados para o consumo humano (Risch & Ho, 2000).

2.3 Aromas e Fragrâncias Terpênicos

Hidrocarbonetos terpênicos e seus derivados oxifuncionalizados (terpenoides) constituem a classe de substâncias mais diversas na natureza (Hill, 1993). Os terpenos são responsáveis pelo aroma dos óleos essenciais, além de ser ótimos substratos para conversões estereoespecíficas.

Vários alcoóis e aldeídos terpênicos assim como seus derivados são utilizados como aromatizantes e são produtos de diversas biotransformações conhecidas (Demyttenaere *et al.*, 2001; Shimoni *et al.*, 2002; Duetz *et al.*, 2003; Kashi *et al.*, 2007). Álcoois terpênicos possuem aroma floral ou cítrico, quando diluídos. A concentração destes compostos no meio é fator determinante na percepção final do aroma, muitas vezes compostos com aromas fortes e desagradáveis quando concentrados; ao serem diluídos apresentam características suaves e agradáveis. Diferentes propriedades organolépticas podem, desta forma, ser atribuídas ao mesmo composto (Fenaroli, 1975). Alguns compostos monoterpênicos utilizados na indústria de aromas e fragrâncias, encontram-se relacionados no Quadro 1.

Quadro 1. Compostos monoterpênicos e suas propriedades organolépticas.

Composto	Estrutura	Propriedades organolépticas
Citronelol		Refrescante, suave, aroma de rosa, sabor amargo.
Geraniol		Aroma de rosa, doce, quente, seco.
Nerol		Refrescante, doce, aroma de rosas.
Linalol		Suave, doce, frutas cítricas, suave, floral.
Mentol+		Refrescante, menta.
Isopulegol		Menta suave, sabor amargo, aroma de ervas.
Álcool perfílico		Fragrância de lavanda.
α -terpineol		Docemente floral, fragrância de violeta, aroma de frutas quando diluído.
Citral		Aroma marcante, limão, amargo doce.
Carvona		R-carvona: cominho ou erva doce. S-carvona: hortelã.
Isopulegona		Menta, notas amadeiradas.
Mentona		Refrescante, menta, notas amadeiradas.

Fonte: Heath, 1978 e Janssens *et al.*, 1992.

2.4 Bioaromas

O termo bioaromas é utilizado para designar aromas de origem enzimática ou fermentativa. Avanços recentes na biotecnologia de plantas, na tecnologia enzimática, na engenharia genética, no monitoramento de bioprocessos e nas técnicas de recuperação de

produtos proporcionam novas oportunidades em potencial para a biotecnologia de produção de aromas. Além de serem menos agressivos ao meio ambiente, os processos biotecnológicos produzem aromas considerados naturais. Os bioaromas são comparados a substâncias químicas de aromas geradas biologicamente, derivados de fermentação microbiana, pela ação endógena ou processamento de enzimas, e através do metabolismo das plantas (Janssens *et al.*, 1992).

2.5 Formas de Obtenção de Aromas

Compostos de aroma são obtidos atualmente por dois processos principais, a síntese química e extração de fontes naturais. As sínteses químicas geralmente estão vinculadas a altos impactos ambientais por emitirem certa carga de resíduos não biodegradáveis. O processo clássico para produção de ésteres, por exemplo, ocorre através da catálise ácida, na qual normalmente utiliza-se um ácido de Bronsted como catalisador (ex. ácido clorídrico, sulfúrico ou p-toluenosulfônico). No caso dos alcoóis com baixo ponto de ebulição, ocorre a dissolução de parte da água produzida no meio reacional, sendo necessária a remoção desta e a realização de uma segunda adição de álcool, pois a reação entrará em equilíbrio. O resíduo de ácido graxo e do catalisador pode ser removido através de um tratamento alcalino.

Para síntese de aromas naturais geralmente estão sendo empregadas técnicas de biotransformação. São tecnologias relativamente recentes e aparecem como uma alternativa para os casos onde as reações químicas são de difícil realização. Em muitos casos é muito trabalhoso funcionalizar certas posições de moléculas via rota sintética. Em certas posições da molécula, a funcionalização requer várias etapas, resultando em baixos rendimentos, inviabilizando economicamente o processo. Em outros casos, as transformações químicas geram muitos subprodutos. A biotransformação é uma reação

mais específica, o que traz muitas vantagens para síntese de compostos orgânicos. Pode-se dizer que a biotransformação é um processo onde um composto orgânico é modificado em um produto estruturalmente similar através de reações específicas catalisadas por um pequeno número de enzimas (Schrader *et al.*, 2004; Giri *et al.*, 2001). Simplificando, define-se biotransformação como uma reação química realizada por células de plantas ou animais, enzimas isoladas ou microorganismos íntegros (Giri *et al.*, 2001). Como diferencial das reações químicas, a biotransformação apresenta grande poder catalítico (sub-estequiométrico) e excepcional estereo e regioespecificidade (ou seletividade), características típicas das enzimas, reais responsáveis por este tipo de transformações (Serra *et al.*, 2005; Berger, 2009). Ainda podem ser citados como diferenciais as condições reacionais brandas de pH, temperatura e pressão nas quais a biotransformação é realizada, o que pode resultar em uma redução no custo energético e de equipamentos em relação às transformações por via unicamente química.

Nas biotransformações utiliza-se o biocatalisador para realizar uma reação não natural. Na natureza cada enzima catalisa uma reação atuando sobre um substrato natural. No caso das células íntegras, várias enzimas estão presentes. Em geral, os substratos naturais são totalmente degradados durante o metabolismo das células para gerar energia e/ou material celular. Os substratos “não-naturais” nem sempre são totalmente degradados por não serem compatíveis com todas as enzimas das vias metabólicas envolvidas. Isso gera acúmulo de novos produtos industrialmente interessantes (Serra *et al.*, 2005).

As características típicas da atividade enzimática são os principais fatores que tornam a biotransformação atrativa para síntese de compostos orgânicos. Devido a essas características, reações que são de difícil e complexa execução por síntese química podem ser realizadas enzimaticamente com relativa facilidade e simplicidade. Utilizando os biocatalisadores pode-se realizar reações altamente específicas e seletivas em condições

brandas, obtendo-se intermediários (Parmar *et al.*, 1998; Barghini *et al.*, 1998; Lynch *et al.*, 1997) ou produtos finais (Tachihara *et al.*, 2006; Leak *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2008) com um número bem menor de etapas em relação à síntese química. Além disso, ao contrário dos biocatalisadores, os reagentes, solventes e catalisadores químicos em geral são poluentes ou tóxicos (Tramper, 1996). As características particulares dos processos de biotransformação, responsáveis por estas vantagens, são resumidas a seguir.

- ✓ Especificidade (ou seletividade) de reação: as reações de biotransformação são altamente específicas.

A atividade enzimática é normalmente restrita a um único tipo de reação, sem reações laterais. A biotransformação pode ainda diferenciar entre grupos funcionais de reatividade semelhante na mesma molécula. Pode-se dizer que é possível atacar qualquer grupo funcional de uma estrutura desde que o biocatalisador apropriado seja selecionado. Enzimas similares podem apresentar diferentes seletividades para a mesma molécula. Em alguns casos e geralmente quando são utilizadas células íntegras, as reações podem parecer não específicas pela geração de mais de um produto, devido à presença de mais de uma enzima no biocatalisador. O problema pode ser contornado de diversas formas; com a otimização das condições de cultivo, a modificação da estrutura do substrato ou a mutação genética do microorganismo (Toniazzi, 2005).

- ✓ Regioespecificidade (regiosseletividade): o ataque químico a posições específicas ou não ativadas na molécula é difícil de ser conseguido.

Na biotransformação, o ataque é realizado regioespecificamente. A regioespecificidade (ou seletividade) pode depender do substrato utilizado (Leak *et al.*, 2009).

- ✓ Estereoespecificidade (estereoseletividade): as enzimas são formadas por L-aminoácidos e por isso são catalisadores quirais; como consequência, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula do substrato é reconhecida durante a formação do complexo enzima-substrato.

Apenas um dos estereoisômeros é atacado ou formado na maioria das reações de biotransformação. Misturas racêmicas podem ser resolvidas (Brunella *et al.*, 1997; Mei-Xiang *et al.*, 2001; Mirata *et al.*, 2008), ou molécula quiral pode ser formada a partir de um composto pró-quiral (Pereira, 1998; Pereira, 1995). O ataque ou formação de diferentes estereoisômeros pode ser obtido selecionando-se o biocatalisador apropriado (Kato *et al.*, 1999; Viazzo & Furstoss, 1996), obtendo-se um excesso enantiomérico de até 99,9% (Zmijewski *et al.*, 1997; Zhong-Liu & Zu-Yi, 2003). Essa característica da biotransformação é muito importante, uma vez que diferentes estereoisômeros podem apresentar propriedades diferentes. No caso de medicamentos, enquanto um isômero apresenta atividade, o outro pode ser tóxico, menos ativo ou inativo (Pereira, 1995; Pereira, 1998; Viazzo *et al.*, 1996; Roure *et al.*, 1997; Chartain *et al.*, 1999).

- ✓ Condução do processo sob condições brandas e biotecnologicamente limpos (Serra *et al.*, 2005): muitas reações químicas são realizadas em condições extremas de temperatura e pressão, além de necessitarem de solventes poluentes ou tóxicos.

Todo esse potencial da biotransformação vem sendo traduzido em aplicações industriais nos últimos anos. Alguns fatores que contribuíam contra a utilização industrial de biocatalisadores, como o alto custo de produção, purificação de enzimas e o baixo rendimento dos processos de biotransformação, já estão se tornando facilmente transponíveis mediante o emprego de modernas tecnologias. A própria demanda por novos biocatalisadores e desenvolvimento de processos para uso industrial tem impulsionado esse

avanço. Muitos são os processos em desenvolvimento em escala de laboratório. Outros já estão em fases avançadas. Alguns outros já são utilizados industrialmente, muitos em substituição a processos químicos, por apresentarem maiores vantagens (Antunes, 1999; Oliveira *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2005; Berger, 2009). Além disso, produtos obtidos biotecnologicamente têm a possibilidade de obtenção do "status natural", uma vez que todos os passos são efetuados por organismos vivos (Risch & Ho, 2000; Schrader *et al.*, 2004).

As biotransformações permitem também a inserção de grupos funcionais em posições tais na molécula que seria muito difícil fazê-lo com reagentes químicos. Em um esqueleto de esteroide, por exemplo, com a escolha de micro-organismo adequado, praticamente qualquer átomo de carbono pode ser hidroxilado. A introdução regioespecífica de dupla ligação também é possível, além de outras modificações no esqueleto esteroide (Maróstica, 2006).

Devido à alta regioespecificidade das reações enzimáticas em relação às reações químicas, é possível diferenciar entre diversos grupos funcionais de reatividade semelhante. As biotransformações levam, portanto, a um melhor aproveitamento da matéria-prima, evitando a formação de substratos indesejáveis, o que pode acarretar em maior custo com etapas subsequentes de separação e purificação (Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

A biotransformação pode ocorrer em apenas um dos enantiômeros do racemato, muitas vezes levando à resolução. Muitas hidrolases são enantioespecíficas e em substrato meso, pode-se induzir assimetria (ou dissimetria) (Oliveira *et al.*, 2005).

2.6 Enzimas

Apesar da ação das enzimas ter sido reconhecida e os biocatalisadores terem sido empiricamente utilizados pelo homem há milênios, o interesse científico que conduz à sua identificação é relativamente recente, tendo se iniciado em meados do século passado. No mesmo período, aprofundaram-se os conhecimentos sobre o metabolismo, a química orgânica e a química das proteínas, que contribuíram para o desenvolvimento da enzimologia e da tecnologia enzimática (Castro *et al.*, 1997; Olsen *et al.*, 2006).

As enzimas são proteínas com massa molecular elevada, entre 15.000 e 20.000.000g/mol. Elas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem as funções vitais de controle de processos de transformação dos nutrientes em energia e em material celular.

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (Dalla-Vechia *et al.*, 2004). A seletividade é decorrência da interação da enzima com substrato. Esta interação é explicada através do método chave-fechadura. Neste modelo, a ligação do substrato ao centro ativo da enzima se dá preferencialmente por uma das faces do substrato, o que explica a alta seletividade da catálise enzimática (Mamuro *et al.*, 2001).

Lipases (triacilglicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de gorduras e óleos, liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Estas enzimas são encontradas em tecidos animais, vegetais e em micro-organismos, tendo papel fundamental no metabolismo de lipídios destes seres vivos: como enzimas digestivas, na deposição e mobilização dos tecidos de reservas energéticas e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares (Villeneuve *et al.*, 2000).

As lipases são originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência (Saxena *et al.*, 2003). Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas, e na sua grande maioria, não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como “Generally Regarded As Safe” (GRAS) (Janssens *et al.*, 1992).

A função das lipases é catalisar a hidrólise de glicerídeos e outros ésteres graxos. Contudo, essas reações são facilmente reversíveis. Conseqüentemente, as lipases são excelentes catalisadores para um amplo espectro de reações de esterificação e transesterificação (Noureddini *et al.*, 2005; Shimada *et al.*, 2002). Entretanto, para sua aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial, isto é, a enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato (Costa *et al.*, 1995; Serra *et al.*, 2005; Irimescu *et al.*, 2004).

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica principalmente por não requererem cofatores, atuarem em uma faixa de pH relativamente ampla, serem muito estáveis nesse meio, apresentarem especificidade, regioseletividade e enantioseletividade. As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, mais recentemente, para aplicações industriais (Pandey *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 2003, Hasan *et al.*, 2006).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, os quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação de enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesse pode-se citar as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídios por meio das lipases (Castro *et al.*, 2004).

O uso de lipases nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos eficientes processos executados na natureza, constituindo o mais importante grupo de enzimas com valor biotecnológico, devido à versatilidade de aplicações possíveis e facilidade de produção em larga escala. A economia de energia e minimização da degradação térmica são provavelmente as maiores vantagens na substituição de tecnologias químicas atuais pelas biológicas (Hasan *et al.*, 2006).

As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos, têxtil, de detergentes, farmacêuticas, agroquímica e oleoquímica (Paula *et al.*, 2005).

Embora atualmente as aplicações industriais das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes e de alimentos e ainda sejam, em sua maioria, baseadas nas reações de hidrólise, novas aplicações decorrentes das reações de síntese e transesterificação e das características enâncio e régio seletivas das lipases vêm se estabelecendo nos mais diversos campos: indústria farmacêutica, de química fina, de cosméticos, oleoquímica, de couros, de polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais (Castilho *et al.*, 2000; Berger, 2009).

A descoberta de que as lipases e outras enzimas podem ser utilizadas em meio orgânico (Quiroga *et al.*, 2005; Vidinha *et al.*, 2004, Oliveira *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2005) e, também, em catálise em fase sólida (Todd *et al.*, 2009) abriu uma gama enorme de novas aplicações para estes biocatalisadores.

2.7 Produção Enzimática de Bioaromas em Solventes Orgânicos

A linha de pesquisa relacionada à produção enzimática de ésteres terpênicos a partir de ácidos graxos tem gerado importantes resultados relativos, principalmente, à produção de aromatizantes, empregando preparações comerciais de lipases imobilizadas em meios

não convencionais (Castro *et al.*, 1996; Yadav & Lathi, 2004; Torres de Pinedo *et al.*, 2005; Stevenson *et al.*, 2007).

A catálise enzimática era considerada um processo viável somente em fase aquosa. No entanto, pesquisas demonstraram que as enzimas podem ser ativas em solventes orgânicos, solventes gasosos e fluidos supercríticos (Illanes *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2000; Peres *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005). Uma das principais vantagens da catálise enzimática em meio orgânico é a possibilidade de efetuar reações que utilizam substratos pouco solúveis em água. Além disso, é possível deslocar o equilíbrio termodinâmico de reações que não ocorreriam em meio aquoso, através da extração dos substratos e/ou produtos para a fase aquosa e/ou orgânica ou através da diminuição da quantidade de água do meio reacional.

Segundo Monot *et al.* (1994), a catálise enzimática em meio orgânico apresenta como principais vantagens:

- ✓ Aumento das disponibilidades de substratos pouco solúveis em água;
- ✓ Deslocamento do equilíbrio das reações;
- ✓ Diminuição do número de reações indesejáveis;
- ✓ Controle da estereoseletividade das reações enzimáticas;
- ✓ Diminuição do risco de contaminação microbiana;
- ✓ Redução de eventuais inibições por substratos e produtos;
- ✓ Aumento da estabilidade da enzima.

Sobre o uso de solventes em reações de esterificação enzimática, alguns trabalhos são encontrados na literatura. A atividade enzimática depende do tipo de fluido utilizado, provavelmente como resultado de diferentes interações proteína-solvente. As interações proteína-solvente que podem afetar a atividade enzimática incluem a partição do substrato, produto e enzima entre a água e o solvente, e interações diretas entre o fluido e a enzima,

as quais podem inibir ou inativar a enzima por quebra das ligações de hidrogênio e iônicas. Os solventes menos nocivos às enzimas são aqueles mais hidrofóbicos, pois interagem menos com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contêm maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar ligações de hidrogênio, tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática (Knez & Habulim, 2001; Du *et al.*, 2004).

O estudo comparativo da utilização de heptano, hexano, benzeno, tolueno e dimetil sulfóxido como solventes e a lipase *Pseudomonas aeruginosa* como catalisador na transesterificação de benzil álcool e vinil acetato para produção de agente flavorizante benzil acetato demonstrou que somente o emprego de n-heptano conduziu a conversões elevadas, atingindo 90% em 3 horas de reação e temperatura de 30°C (Singh *et al.*, 2008).

Por outro lado, estes sistemas apresentam algumas desvantagens, como desnaturação e/ou inibição do catalisador na presença do solvente orgânico e aumento da complexidade do sistema de reação e o aumento de custos adicionais com solventes, co-solventes ou surfactantes (Illanes *et al.*, 1994).

A imobilização da enzima geralmente aumenta a estabilidade térmica e química da lipase, podendo aumentar a resistência aos efeitos desnaturantes de vários solventes, permitindo um maior controle do processo e da qualidade do produto (Malcata *et al.*, 1990; Yadav & Lathi, 2004). A aplicação de enzimas imobilizadas como catalisadores de reações envolvendo terpenoides apresenta, desta forma, uma série de vantagens, tais como: maior estabilidade, necessidade de baixos teores de água e possibilidade de reutilização das enzimas em processos contínuos ou em batelada. Os estudos cinéticos de produção de citronelil laurato em meio orgânico usando diferentes lipases imobilizadas demonstraram que o uso da Novozym 435 levou aos maiores rendimentos, atingindo 53% de conversão

com 100% de seletividade em 2 horas de reação e temperatura de 30°C (Yadav & Lathi, 2004).

As enzimas imobilizadas suportam temperaturas mais elevadas. Segundo o fabricante (Novozymes Brasil/Araucária-PR), em relação à temperatura para as enzimas comerciais Lipozyme IM e Novozym 435, os valores ótimos de atividade e estabilidade, em geral, situam-se na faixa de 30-70°C (Novo Nordisk, 2001).

O uso de gases como solventes nas reações de esterificação enzimática também pode minimizar efeitos negativos relacionados ao uso dos solventes orgânicos convencionais. Os fluidos pressurizados (gases pressurizados em temperatura ambiente) possuem diversas vantagens sobre os solventes líquidos como a alta difusividade, que pode acelerar a transferência de massa em reações enzimáticas (Oliveira *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2005).

Olsen *et al.* (2006) otimizaram a conversão do álcool lavandulol em acetato de lavandulil através da catálise enzimática em dióxido de carbono supercrítico usando a enzima imobilizada *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). As melhores conversões foram de 86% com concentrações de substrato de 60mM, temperatura de 60°C e pressão de 10MPa.

Diversos trabalhos descrevem a produção de ésteres por via enzimática utilizando lipases comerciais como catalisadores. Em todos os casos conversões satisfatórias foram observadas quando a razão mássica de solvente:substrato situou-se em torno de 40:1, sendo esta uma das principais desvantagens do uso de enzimas como catalisadores nas reações de esterificação em meio não aquoso (Peres *et al.*, 2005; Yadav & Lathi, 2004; Widjaja *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008). Além disso, estes métodos de produção de aromatizantes não se enquadram dentro dos conceitos de química verde devido à alta toxicidade, inflamabilidade e custos adicionais gerados na recuperação e reciclagem dos solventes orgânicos. Por isso,

o desenvolvimento de um sistema reacional sem a adição de solvente orgânico, pode ser uma escolha benéfica contra algum possível efeito prejudicial na estabilidade da enzima ou no seu equilíbrio termodinâmico causado pelo solvente.

2.8 Produção Enzimática de Aromas em Sistemas Livres de Solventes

A maior vantagem de um sistema livre de solvente é que a ausência deste facilita os processos de purificação, uma vez que menos componentes podem estar presentes no meio reacional ao final da reação. Além disso, a eliminação de solventes na produção oferece significativa redução de custos e minimiza o impacto ambiental. Em adição, isto possibilita o uso de altas concentrações de substratos (Güvens *et al.*, 2002).

A síntese de ésteres naturais em sistemas livres de solventes pode ser definida como solvólise, ou seja, uma reação na qual o reagente por si próprio atua como solvente. Várias investigações estão focadas no estudo das reações de esterificação enzimática em sistemas livres de solventes orgânicos (Karra-Chaabouni *et al.*, 1996; Karra-Chaabouni *et al.*, 1998; Gryglewicz *et al.*, 2000; Converti *et al.*, 2002; Irimescu *et al.*, 2004; Ikeda & Kurokawa, 2001).

Biossíntese de fenil e terpenil valeratos, terpenil acetatos, hexil e benzil benzoatos via alcoólise conduzidos a temperatura 55°C em sistemas livres de solventes usando lipases de *Candida antarctica* e *Mucor miehei* foram testados por Gryglewicz *et al.* (2000). Altos rendimentos das reações (~90%) foram obtidos usando *Candida antarctica* depois de 6 horas de reação para geranil e citronelil acetatos, 10 horas de reação para fenil valerato, 3-metilbutil valerato e geranil e citronelil valeratos, 35 horas de reação para 2-metilbutil valerato e 75 horas de reação para hexil benzoatos.

Reações conduzidas sob essas condições podem ser consideradas como processos ambientalmente favoráveis, uma vez que vários solventes são agentes poluidores (Santos *et*

al., 2007). Sínteses de ésteres por via enzimática em sistemas livres de solventes podem apresentar diversas vantagens. São mais compactos, têm produtividade volumétrica mais elevada e exigem menores concentrações de catalisadores em relação aos reagentes (Karra-Chaabouni *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 1997; Chatterjee & Bhattacharyya, 1998; Irimescu *et al.*, 2004). A água gerada durante a reação de esterificação é considerada o principal parâmetro a ser controlado. Mesmo sob condições de baixa concentração de água, durante o curso da reação, 1mol de água é formado para cada mol de éster sintetizado. Remoção de água por diversas metodologias pode prevenir este fenômeno e auxiliar no deslocamento do equilíbrio para altas conversões (Irimescu *et al.*, 2004).

Outros fatores que também influenciam no rendimento das reações de esterificação são o efeito da estrutura do álcool (primários, secundários e terciários) e o tamanho da cadeia alifática do ácido graxo (Castro *et al.*, 1997).

2.9 Produção de Aromas a Partir de Álcoois Monoterpênicos

Vários trabalhos encontrados na literatura relatam a síntese de ésteres a partir de ácidos carboxílicos e alcoóis monoterpênicos via catálise enzimática em meio orgânico e em sistemas livres de solventes.

Castro *et al.* (1997) avaliaram a especificidade de uma preparação comercial de lipase imobilizada, com relação à molécula ácida e alcoólica do substrato, através da síntese de diversos ésteres terpênicos por via enzimática em n-heptano. Os autores demonstraram que, com exceção do ácido acético, o tamanho da cadeia influenciou de maneira pouco significativa no rendimento de esterificação. Ácidos de cadeias alifáticas contendo quatro ou mais carbonos foram considerados excelentes substratos no grupo acila, fornecendo conversões em geranyl butirato de 95% em 24 horas de reação à temperatura de 45°C e 100rpm. O baixo rendimento (14%) alcançado na síntese do acetato

de citronelila foi atribuído à atuação do ácido acético como inibidor da lipase. Neste caso verificou-se ainda que a lipase (Lipozyme IM) apresenta sérias limitações para a aplicação em reações de esterificação de alcoóis secundários e terciários como o linalol, sendo, portanto melhor empregados alcoóis primários como citronelol, geraniol e nerol.

A lipase imobilizada de *Pseudomonas* sp. foi avaliada na catálise de reações de transesterificação de citronelil butirato e geranil caproato em n-hexano. Parâmetros das reações tais como concentração de enzima, concentração dos substratos, adição de água, temperatura, tempo de reação e reutilização de enzima também foram testados por Yee *et al.* (1997). Os autores obtiveram altos rendimentos reacionais com 96 e 99% de conversão para citronelil butirato e geranil caproato, respectivamente, usando concentração de lipase Amano PS de 15%, temperatura entre 30 e 50°C, tempo de reação 24 horas e 2% de água adicional. Além disso, a lipase de *Pseudomonas* sp. permaneceu ativa após 12 ciclos reacionais.

A síntese de geranil acetato em n-hexano catalisado pela lipase comercial preparada a partir de *Candida antarctica* foi realizado por Bartling *et al.* (2001). A conversão de equilíbrio foi de 94%, razão molar dos substratos 1:1 e temperatura de 30°C. Para remoção seletiva da água formada durante o processo de esterificação foram testadas membranas com compósito cerâmico/acetato de celulose que permitiu deslocamento de reação para os produtos atingindo 100% de conversão.

Karra-Chaabouni *et al.* (1996) estudaram a produção enzimática de geranil butirato e geranil valerato em sistema livre de solvente. Utilizando a esterase produzida por *Mucor miehei*, em 75 horas de reação, razão molar ácido/álcool de 1:1, 37°C, 250rpm, com adição de 10% de enzima não imobilizada (g/g substratos), obtiveram 85% de conversão. Os efeitos da razão molar, da temperatura, da agitação e da adição inicial da água na produção de geranil butirato foram investigados pelo mesmo grupo de pesquisadores (Karra-

Chaabouni *et al.*, 1998). Os autores chegaram à conclusão de que a esterase perde sua atividade irreversivelmente a 60°C e que a adição de água diminui a taxa de conversão depois de 75 horas de reação. A atividade da enzima aumenta com aumento linear da cadeia do ácido e do álcool utilizado. Além disso, foi observado que a lipase de *Rhizopus javanicua* não possui nenhuma correlação entre atividade hidrolítica e sintética. Este exemplo mostra que a capacidade hidrolítica da lipase não pode ser utilizada para prever a capacidade da enzima em catalisar reações de esterificação.

Peres *et al.* (2003) estudaram os efeitos da atividade de água na reação de síntese de geranyl acetato catalisado pela enzima Novozym 435 em meio supercrítico de etano e dióxido de carbono. As enzimas foram mais bem ativadas em etano do que em dióxido de carbono supercrítico. Temperaturas entre 40 e 60°C não apresentaram um forte efeito na taxa de esterificação. Para uma mistura de 50mM de ácido acético com 200mM de geraniol, em 10 horas de reação a 40°C, a_w de 0,25 e 0,55mg/cm³ em etano supercrítico obteve-se uma conversão de 100%. Por outro lado, nas mesmas condições de sistema em dióxido de carbono supercrítico, obteve-se uma conversão de 50%. Usando uma mistura equimolar dos substratos obteve-se uma conversão de 98% em etano supercrítico e de 73% em dióxido de carbono supercrítico.

Chatterjee & Bhattacharyya (1998) otimizaram a conversão de ésteres de geraniol e citronelol através da catálise enzimática utilizando lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM) em meio livre de solvente. As melhores conversões foram de 96 e 99% com concentrações de substratos 0,1M e temperatura 60°C após de 6 horas de reação.

O linalol é um álcool terciário que possui uma larga aplicação em várias áreas do conhecimento humano, sendo necessária a sua produção em quantidades crescentes.

Castro *et al.* (1997) estudaram a síntese de ésteres terpenoides por via enzimática, tendo encontrado conversões de esterificação superiores a 95% para alguns alcoóis

primários, como citronelol, geraniol e nerol, mas ausência de formação de produtos a partir de alcoóis secundários (mentol) e terciários (linalol) nas condições testadas: uma preparação enzimática com a enzima Lipozyme IM na concentração fixa de 10% (m/m) em relação à massa total de reagentes, em batelada a 45°C, 150rpm, 24h de reação e tendo como solvente n-heptano.

A modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans (pau rosa) foi realizada por Chaar (2000). A reação de formação do éster acetato de linalila foi realizada pela rota do anidrido acético/acetato de sódio. A reação foi realizada com excesso de anidrido acético na razão molar de linalol, anidrido acético e acetato de sódio 1:9:1 sob temperatura de 120°C e pressão atmosférica. A variação da temperatura na reação foi estudada, fixando a relação molar 1:9:1 e variando a temperatura de 110 a 150°C com intervalos de 10°C, sob pressão atmosférica. Em tais condições, o autor relata o alcance de conversão de 54% em acetato de linalila para óleo com 10% de linalol. Chaar (2000), avaliando a influência da temperatura na produção de acetato de linalila, observou que o melhor rendimento da reação (61,8%) foi obtido na temperatura de 130°C considerando a relação molar de linalol, anidrido acético e acetato de sódio 1:9:1, e que acima de 130°C há um declínio no rendimento da reação. Embora a conversão obtida possa ser considerada interessante, a alta temperatura empregada pode implicar em inviabilidade econômica do processo.

Martín *et al.* (2007) realizaram um estudo termodinâmico da síntese de acetato de linalila a partir de linalol através de uma transesterificação catalítica em sistema com acetato de etila em meio de CO₂ supercrítico. O estudo compreendeu o cálculo da composição no equilíbrio da reação, e a relação com o equilíbrio de fases deste sistema, o que é importante para a determinação da concentração máxima de reagentes durante a reação, e para o estudo da fração dos produtos da reação.

Esterificação direta de álcool terciário (α -terpineol) com anidrido acético foi realizada por Kuan-Ju-Liu & Yu-Ru-Huang (2010) usando lipase imobilizada *Candida rugosa* como biocatalisador em CO₂ supercrítico e n-heptano como co-solvente. Altos rendimentos de terpenil acetato (95,1%) foram obtidas em 1,5 hora de reação à temperatura 50°C e pressão 10MPa. Dados obtidos a partir da análise de taxas iniciais das reações demonstraram que a biocatálise ocorre pelo mecanismo Ping-Pong Bi-Bi.

2.10 Mecanismo Cinético de Esterificação Enzimática

O modelo Ping-Pong Bi-Bi é usualmente o mais utilizado para o estudo da cinética das reações catalisadas por lipases por representar os efeitos da inibição da enzima por espécies presentes na reação (Varma *et al.*, 2010; Dossat *et al.*, 2002; Al-Zuhair *et al.*, 2006). As taxas de uma reação enzimática são fortemente influenciadas por fatores como: concentração de substrato, concentração de enzima, pH e temperatura (Dossat *et al.*, 2002; Al-Zuhair *et al.*, 2006). O modelo Bi Bi descreve a generalização da reação de dois substratos e dois produtos, onde a formação do produto ocorre somente após a formação do complexo substrato-enzima, descrevendo um mecanismo especializado em que a ligação de substrato e liberação dos produtos é ordenada.

No mecanismo sequencial, todos os substratos devem se combinar com a enzima antes da reação ocorrer. Além disso, o mecanismo sequencial pode ser caracterizado como ordenado ou aleatório; por outro lado, a ordem de combinação dos substratos e da liberação não é obrigatória. De forma geral, no mecanismo da reação de esterificação, cada etapa do processo deve ser observada separadamente como um mecanismo próprio.

Em se tratando de um processo biológico, é fundamental considerar um fator que pode influenciar o processo global, a presença de inibidores no meio reacional. Os mesmos afetam diretamente a velocidade da reação e podem vir a ser uma das substâncias que

participam da reação, quer como produto, quer como substrato. Portanto, no estudo da cinética de reações, o fator que se mostra essencial para fornecer dados sobre a influência das concentrações iniciais e a visualização da velocidade de consumo dos substratos é o cálculo da velocidade inicial da reação, pois este se constitui no único momento em que todas as condições experimentais são conhecidas (Borzani, 2001).

Neste tipo de mecanismo, conforme apresentado na Figura 1, o grupo a ser transferido é primeiro deslocado do substrato A pela enzima E para formar o produto P e uma forma modificada da enzima (F). Em seguida ocorre a transferência de F para o segundo substrato B, formando-se o produto Q e regenerando-se E (Murray *et al.*, 2003). O primeiro passo é o de acilação, o primeiro substrato a ligar-se à enzima será o que fornece o grupo acila (R-CO-) sendo designado por agente acilante (Warshel *et al.*, 1989; Daggett *et al.*, 1991; Hedstrom, 2002).

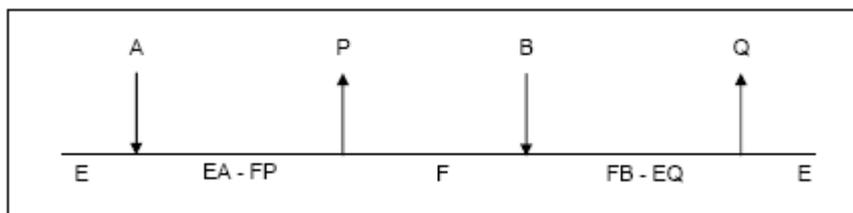


Figura 1. Representação do mecanismo Ping-Pong Bi-Bi. A e B são substratos, P e Q são produtos, E e F são diferentes configurações da enzima livre, EA-FP e FB-EQ são complexos de transição.

A taxa inicial de reação para este tipo de mecanismo, assumindo que não ocorra inibição pelos substratos ou produtos, pode ser representada como:

$$V = v_{\max} \frac{[A][B]}{k_m[A] + k_m[B] + [A][B]} \quad (1)$$

Onde:

V = taxa inicial de reação;

v_{\max} = máxima taxa de reação;

km_A e km_B = constante de Michaelis-Menten para os substratos A e B, respectivamente.

Nos casos onde ocorre inibição por um dos substratos, a equação se torna mais complexa, sendo necessário incluir novos parâmetros referentes às constantes de inibição.

Visando determinar os parâmetros cinéticos, uma série de experimentos são conduzidos fixando a concentração de um determinado substrato (B) e variando a concentração do outro (A). O inverso das taxas iniciais (v^{-1}) é plotado em função do inverso da concentração do substrato A (Lineweaver-Burk) a uma determinada concentração fixa do substrato B. Uma vez confirmado o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi, os parâmetros cinéticos da Equação 1 podem ser calculados por regressão dos dados experimentais. Tal mecanismo, com base na literatura, serve como base para modelagem dos dados experimentais cinéticos obtidos ao longo do desenvolvimento do presente trabalho, constituindo-se esta, uma proposta imediata para continuidade dos trabalhos experimentais desenvolvidos ao longo da presente tese, como será explicitado no decorrer do mesmo. A inclusão deste assunto no presente capítulo visa embasar o leitor do ponto de vista fundamental para a consecução da possível modelagem cinética dos dados obtidos.

2.11 Considerações Finais

A revisão bibliográfica forneceu dados interessantes quanto ao estado da arte da temática considerada, tanto na academia quanto no setor industrial, dando indícios de um grande potencial para o desenvolvimento sustentável e sem danos ao meio ambiente.

Conforme a literatura, esse crescimento do interesse pelas enzimas nas últimas décadas, tem como causa principal o seu largo potencial em aplicações industriais. Cada aplicação requer uma propriedade única da enzima com respeito à especificidade, estabilidade, dependência de temperatura e pH.

Numa síntese geral da revisão bibliográfica, pode-se considerar que a busca por processos alternativos para a síntese de produtos de interesse para a indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, que não causem ou reduzam os danos ao ambiente despertou grande interesse dos pesquisadores em todo o mundo, nos últimos anos. Uma alternativa é a síntese enzimática que apresenta muitas vantagens em relação à síntese química. Como exposto ao longo deste capítulo, esta síntese pode ser realizada utilizando várias tecnologias dentre elas a utilização de fluidos pressurizados, solventes orgânicos e ultrassom ou mesmo avaliar o processo de interesse em sistema livre de solvente, facilitando os processos de separação do produto desejado ao final do processo bem como reduzindo custos de processo. Ênfase especial será dada, no desenvolvimento do presente trabalho, na produção enzimática de aromas, a partir de diversos substratos, em sistema livre de solvente orgânico, configurando o desenvolvimento de um processo limpo, foco de interesse em diversos setores industriais atualmente.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo principal otimizar a produção enzimática de ésteres aromáticos em sistema livre de solvente orgânico. Álcoois primários, secundários, terciários bem como óleos essenciais brutos serão testados como agentes acilantes, visando verificar, também o potencial catalítico da lipase utilizada frente a diversos sistemas reacionais. Para atingir o objetivo geral estabelecido, a técnica do planejamento experimental será utilizada e o efeito de vários parâmetros na reação (razão molar entre os substratos, concentração de enzima e temperatura) bem como a cinética da reação em cada um dos sistemas abordados, em termos de conversão em ésteres

aromáticos, utilizando a lipase comercial immobilizada Novozym 435 será abordado nos capítulos posteriores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais adotados durante a fase experimental deste trabalho, relacionado à otimização da conversão de reação de esterificação enzimática para obtenção de bioaromas usando como substratos alcoóis primário, secundário e terciário (geraniol, mentol, linalol), óleo essencial de citronela, ácidos oleico, propiônico e anidrido acético em sistemas livres de solvente.

3.1 Materiais

3.1.1 Substratos

Foram utilizados neste trabalho como substratos: geraniol (97% de pureza) da VETEC, mentol (97% de pureza) SIGMA, linalol (97% de pureza) SIGMA-ALDRICH, ácido propiônico (97% de pureza) QUIMEX, ácido oleico (97% de pureza -SIGMA-ALDRICH), anidrido acético (97% de pureza) da VETEC, peneiras moleculares 4Å (SIGMA-ALDRICH). O óleo de citronela (*Cymbopogon winterianus*) utilizado foi adquirido da empresa UNIJUÍ Óleos essenciais, sendo este obtido por hidrodestilação.

3.1.2 Enzima

A lipase imobilizada comercial Novozym 435 utilizada para o desenvolvimento deste trabalho foi adquirida da Novozymes/Araucária-PR.

Esta lipase (*Candida antarctica*) é produzida por fermentação submersa e imobilizada em resina acrílica macroporosa. A lipase atua não especificamente nas 3 posições do triglicerídeo. Apresenta tamanho de partícula entre 0,3-0,9mm, densidade de

aproximadamente 430kg/m^3 e conteúdo de água entre 1-2%. É uma lipase termoestável com uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 40-80°C, apresentando atividade inicial de esterificação de aproximadamente 40U/g, utilizando ácido láurico e propanol como substratos.

3.2 Métodos

3.2.1 Método para determinação da atividade de esterificação da lipase

A atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação entre o ácido láurico e o propanol com razão molar ácido-álcool 3:1 à temperatura de 60°C, com enzima a 5% (m/m) mantida sob agitação por 40 minutos. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator de vidro aberto, de 20mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático. Alíquotas de 150 μ L, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e foram diluídas em 20mL de acetona-etanol (1:1) com a finalidade de cessar a reação e extrair os ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,01mol·L⁻¹ até pH 11. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 μ mol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas (Oliveira *et al.*, 2006). A atividade de esterificação foi calculada através da Equação 2.

$$Atividade(U / g) = \frac{[V^0 - V^{40}]}{t \times ma} \times M \times 10^3 \quad (2)$$

onde:

M = molaridade da solução de NaOH;

V⁰ = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (mL);

V^{40} = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos de reação (mL);

ma = massa de preparação enzimática utilizada na reação (g);

t = tempo de reação (min);

1U = 1 μ mol de ácido /min;

10^3 = fator de correção.

3.2.2 Avaliação da solubilidade dos alcoóis em diferentes substratos

Como etapas preliminares à consecução das reações enzimáticas foram avaliadas as solubilidades dos alcoóis e dos óleos essenciais brutos em diferentes ácidos: oleico e propiônico e anidrido acético.

A avaliação foi realizada submetendo a mistura reacional (álcool + ácido ou anidrido) a diferentes razões molares (1:1, 1:2, 1:3, 1:6 e 1:9) e verificação visual das misturas nas diversas condições testadas. Os testes foram realizados à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

Adotando este procedimento, pôde-se verificar que todos os alcoóis apresentaram solubilidade em ambos os ácidos e em anidrido acético, independente das razões molares avaliadas.

3.2.3 Procedimento experimental para a reação de esterificação enzimática

Esta etapa foi realizada preparando uma mistura reacional formada por álcool (geraniol, mentol, linalol ou óleo essencial de citronela) e ácido (propiônico, oleico) ou anidrido acético e peneiras moleculares (20mg x mL⁻¹ dos substratos). Os substratos foram adicionados em Erlenmeyers de 50mL com volume médio racional de 5 mL.

Após dissolução completa dos substratos, a enzima, previamente ativada durante 1 hora a 40°C em estufa, foi adicionada aos substratos, e o tempo reacional foi contado a partir da adição desta.

Todos os experimentos foram realizados em *shaker* com agitação constante de 150rpm. Após o término do tempo de reação (6 horas) o biocatalisador foi filtrado com papel filtro. Todas as amostras foram mantidas na geladeira, para posterior análise.

3.2.4 Determinação da conversão da reação

A quantificação dos ésteres foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de sílica fundida INOWAX (30m x 250µm i.d.), 0,25µm de espessura de filme, detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40-180°C (3°C/min), 180-230°C (20°C/min), 230°C (20min), temperatura do injetor 250°C, detector a 275°C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste H₂ (56kPa), volume injetado 0,4µL de amostra diluída em n-hexano (1:10). A determinação da conversão das reações foi feita acompanhando a redução da área do sinal do agente limitante.

A determinação do perfil químico do óleo essencial de citronela foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM, modelo QP5050 A, Shimadzu). Para análise foram utilizadas as mesmas condições utilizadas para o FID.

3.2.5. Estratégia de utilização de planejamentos de experimentos sequenciais

A técnica de planejamento de experimentos é uma ferramenta estatística que permite determinar as variáveis que exercem maior influência em um determinado processo, assim como avaliar possíveis inter-relações entre variáveis de um processo. Além disto, esta ferramenta também permite otimizar o sistema em estudo, com o objetivo

de minimizar ou maximizar uma resposta. A principal vantagem da utilização desta ferramenta é a redução do número de experimentos e a consequente redução de custos (Rodrigues e Iemma, 2005).

Com o objetivo de determinar as condições experimentais que correspondam à conversão máxima em ésteres, as seguintes variáveis foram analisadas: temperatura, razão molar e concentração de enzima. No total foram realizados dois planejamentos experimentais para síntese de ésteres a partir de geraniol, um planejamento experimental para produção de bioaromas a partir de mentol e do óleo essencial de citronela e três planejamentos experimentais para linalol. Todos os planejamentos foram executados com triplicata no ponto central para avaliar o erro associado ao processo.

Os níveis das variáveis investigadas no primeiro planejamento tiveram como base conhecimentos gerais sobre taxas ótimas de atuação das lipases e cinética das reações em equilíbrio. Em relação à temperatura, os valores utilizados (40 a 60°C) encontram-se dentro da faixa de atividade e estabilidade para a enzima comercial Novozym 435 (30 a 70°C) (Novo Nordisk, 2001). Devido ao fato que as reações de esterificação ocorrerem em equilíbrio, a influência do excesso de um dos substratos na produção de ésteres (razão molar 1:1, 3:1; 5:1) foi avaliada. Para avaliar a influência da concentração da enzima, a concentração máxima foi estabelecida em 10% (m/m substratos), tendo em vista o custo da enzima e buscando viabilizar economicamente o processo de produção de bioaromas. O segundo planejamento experimental foi realizado com o intuito de ajustar os níveis de concentração de enzima e razão molar, de acordo com resultados experimentais obtidos na consecução do primeiro planejamento experimental.

3.2.6 Otimização da produção enzimática de ésteres a partir de alcoóis primários e secundários

Inicialmente foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos para cada ácido (oleico e propiônico) ou anidrido acético (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados no primeiro planejamento fatorial completo 2^3 para produção enzimática de ésteres de geraniol, mentol e óleo essencial de citronela.

Variáveis/Níveis	Temperatura (°C)	Razão Molar (mol/mol) (álcool/ácido)	[E] (% m/m substratos)
-1	40	1:1	1
0	50	3:1	5,5
1	60	5:1	10

Após a análise estatística dos resultados obtidos no primeiro planejamento, foi realizado mais um planejamento fatorial completo 2^2 para otimização das condições de reação para produção de geraniol oleato, totalizando 7 experimentos e um delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR), para otimização de produção de geraniol propionato, com 11 experimentos no total. Os intervalos estudados para cada variável estão apresentados nas Tabelas 2 e 3 para produção de geraniol oleato e geraniol propionato, respectivamente. A temperatura da reação foi fixada em 50°C para ácido oleico, 40°C para ácido propiônico e tempo de reação em 6 horas para os dois ácidos.

Tabela 2. Variáveis e níveis estudados no segundo planejamento fatorial completo 2^2 para produção enzimática de geranil oleato.

Variáveis/Níveis	Razão Molar	[E]
	(mol/mol) (álcool/ácido)	(% m/m substratos)
-1	1:1	1
0	3:1	5,5
1	5:1	10

Tabela 3. Variáveis e níveis estudados no terceiro planejamento DCCR 2^2 para otimização das condições para produção enzimática de geranil propionato.

Variáveis/Níveis	Razão Molar	[E]
	(mol/mol) (álcool/ácido)	(% m/m substratos)
-1,41	0,18:1	3
-1	1:1	5
0	3:1	10
1	5:1	15
1,41	5,8:1	17

Os dados obtidos em todas as etapas do estudo de otimização foram calculados em termos de conversão do produto e foram tratados estatisticamente com auxílio do Software Statistica 6.0 (Statsoft, Inc, USA).

3.2.7 Otimização da produção enzimática de ésteres terciários

Numa primeira etapa do estudo, um planejamento experimental do tipo 2^3 completo foi realizado para que os principais efeitos fossem avaliados. Esse planejamento de experimentos foi realizado para cada um dos conjuntos de substratos testados: linalol - ácido oleico, linalol - ácido propiônico e linalol - anidrido acético. A Tabela 4 apresenta as variáveis e faixa de valores estudados neste planejamento.

Tabela 4. Variáveis e níveis no planejamento experimental 2^3 completo para produção de linalil ésteres.

Variáveis/Níveis	Temperatura (°C)	[E] (%m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (ácido ou anidrido/álcool)
-1	30	1	1:1
0	50	5,5	2:1
1	70	10	3:1

Avaliando os resultados obtidos nesta etapa, um segundo planejamento de experimentos foi realizado, utilizando anidrido acético e linalol como substratos. O intervalo de estudo de cada variável avaliada nesta etapa é apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Variáveis e níveis no planejamento experimental 2^3 completo para produção de linalil acetato.

Variáveis/Níveis	Temperatura (°C)	[E] (%m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (anidrido/álcool)
-1	50	5	3:1
0	60	10	6:1
1	70	15	9:1

Em uma última etapa, um planejamento experimental 2^2 completo foi realizado, avaliando o efeito da temperatura e concentração de enzima, fixando a razão molar anidrido:álcool em 1:1. O intervalo de estudo de cada variável é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Variáveis e níveis no planejamento experimental 2^2 completo para produção de linalil acetato.

Variáveis/Níveis	Temperatura (°C)	[E] (%m/m substratos)
-1	50	1
0	60	3
1	70	5

3.2.8 Estudo cinético da produção enzimática de geranil oleato e geranil propionato

Após otimizar as condições experimentais das variáveis estudadas no processo enzimático, os efeitos da razão molar (RM), da concentração da enzima [E] e da temperatura (T) na cinética da reação foram avaliados para cada sistema reacional. Alíquotas foram retiradas do meio reacional nos tempos 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 e 6 horas.

As razões molares, concentrações da enzima [E] (%) (m/m substratos) e temperaturas utilizadas no estudo para ácido oleico são apresentadas nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

Tabela 7. Efeito da razão molar entre os substratos na produção enzimática de geranil oleato.

Temperatura (°C)	[E] (% m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (álcool/ácido)
50	5,5	1:1; 3:1; 5:1

Tabela 8. Efeito da concentração de enzima na produção enzimática de geranil oleato.

Temperatura (°C)	[E] (% m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (álcool/ácido)
50	1; 2; 5,5; 10	3:1

Tabela 9. Efeito da temperatura na produção enzimática de geranil oleato.

Temperatura (°C)	[E] (% m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (álcool/ácido)
40; 50; 60	5,5	3:1

As razões molares, concentrações da enzima [E] (%) (m/m substratos) e temperaturas utilizadas no estudo para ácido propiônico são apresentadas nas Tabelas 10, 11 e 12, respectivamente.

Tabela 10. Efeito da razão molar entre os substratos na produção enzimática de geranil propionato.

Temperatura (°C)	[E] (% m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (álcool/ácido)
50	10%	1:1; 3:1; 5:1

Tabela 11. Efeito da concentração de enzima na produção enzimática de geranil propionato.

Temperatura (°C)	[E] (% m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (álcool/ácido)
50	1,2; 5,5; 10	3:1

Tabela 12. Efeito da temperatura na produção enzimática de geranil propionato.

Temperatura (°C)	[E] (%) m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (álcool/ácido)
40; 50; 60	10	3:1

3.2.9 Estudo cinético da produção enzimática de mentil acetato

O estudo cinético para produção de mentil acetato foi realizado levando em consideração apenas a variável que apresentou efeito significativo na etapa de otimização por planejamento de experimentos, ou seja, a razão molar entre os substratos. Alíquotas foram retiradas do meio reacional nos tempos 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 e 6 horas. As razões molares utilizadas nesta etapa do estudo são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13. Efeito da razão molar entre os substratos na produção enzimática de mentil acetato.

Temperatura (°C)	[E] (% m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (mentol/anidrido acético)
60	5,5%	1:1; 1:3; 1:5; 1:7

3.2.10 Avaliação da taxa inicial de reação

Em cada uma das etapas do estudo cinético onde foram avaliados os efeitos da razão molar entre os substratos, concentração da enzima e temperatura na conversão da reação, também foi avaliada a velocidade inicial de reação.

O cálculo da velocidade inicial de reação é de extrema importância pelo fato de poder-se saber se a reação ocorre instantaneamente, além de comparar as diferentes condições avaliadas no estudo cinético. É calculada dividindo-se a variação de conversão num determinado tempo pela variação do tempo na faixa linear da curva cinética (Equação 3).

A velocidade inicial de reação (r) foi calculada da seguinte forma:

$$r = \frac{dC}{dt}_{t=0} \quad (3)$$

onde:

r = taxa inicial de reação (min^{-1});

C = conversão de geranil oleato ou geranil propionato no tempo t (%);

C_0 = conversão de geranil oleato ou geranil propionato no tempo 0 (%);

t = tempo (min);

t_0 = tempo do início da reação (min).

3.2.11 Ciclos de reuso da enzima

Para a determinação de ciclos de reuso da lipase Novozym 435 na reação de produção de ésteres foram conduzidos experimentos em *shaker* com agitação constante de 150 rpm, temperatura de 60°C, razão molar de 3:1 e 5,5% (m/m) de enzima. Os experimentos foram conduzidos por 2 horas. Após o término da reação as enzimas foram recuperadas e mantidas em dessecador por no mínimo 24 horas, para serem reutilizadas em uma nova batelada. Realizou-se medida de atividade no início e no final das reações com a enzima recuperada, conforme descrito no ítem 3.2.1.

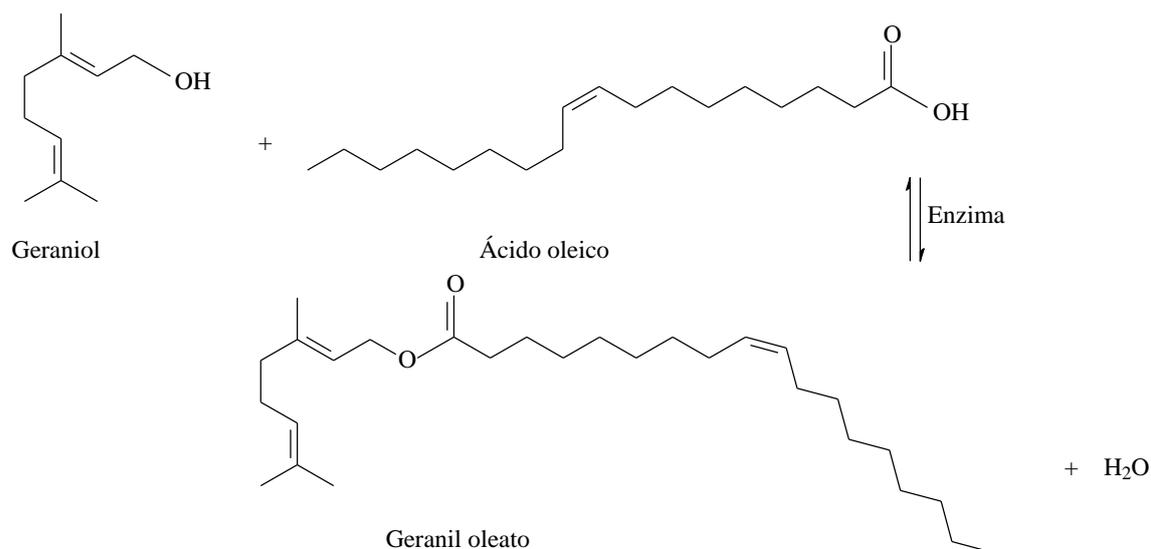
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo referente ao processo de produção enzimática de ésteres utilizando a lipase imobilizada comercial de *C. antarctica* (Novozym 435) como catalisador em sistema livre de solvente. Em função dos vários sistemas estudados ao longo do desenvolvimento do presente trabalho, os resultados serão apresentados em função do sistema reacional avaliado. Para cada sistema serão primeiramente apresentados os resultados obtidos e, em seguida, os resultados encontrados na literatura em assuntos correlatos. Tal forma de apresentação permitirá, ao final do presente documento, dispor as conclusões delineadas a partir do desenvolvimento do trabalho, embasadas pelos dados já apresentados na literatura disponível.

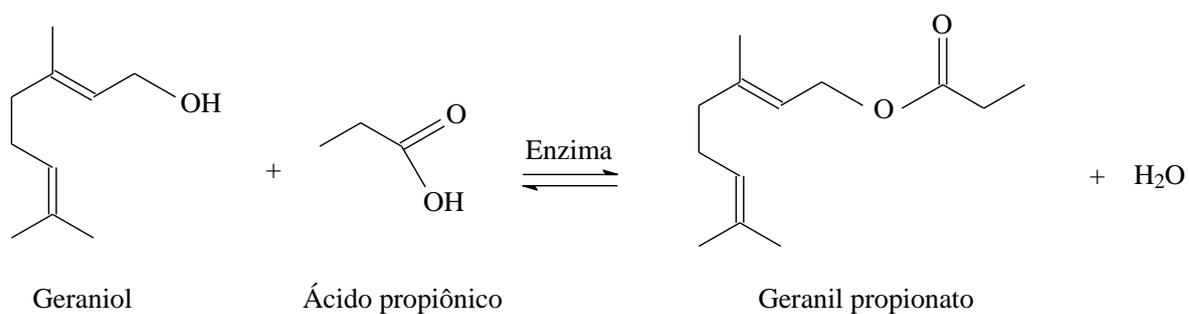
4.1. Produção Enzimática de Ésteres a Partir do Geraniol

A partir de resultados obtidos em experimentos preliminares foram definidos os sistemas a serem avaliados na etapa de transformação enzimática do álcool primário (geraniol). A lipase imobilizada comercial Novozym 435 foi utilizada como catalisador em todas as etapas do trabalho.

Para que as condições de produção de geranil oleato (Esquema1) e geranil propionato (Esquema 2) fossem otimizadas, utilizou-se a técnica de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta.



Esquema 1



Esquema 2

Figura 2. Reação de esterificação de geraniol e ácido oleico (Esquema 1) e Reação de esterificação de geraniol e ácido propiônico (Esquema 2).

4.1.1 Produção enzimática de geranyl oleato

4.1.1.1 Otimização de produção de geranyl oleato

Primeiro planejamento experimental

Visando avaliar a influência das variáveis independentes na produção de geranyl ésteres, um primeiro planejamento experimental fatorial 2³ foi realizado. As variáveis

estudadas foram temperatura (T), concentração de enzima [E] (% m/m em relação aos substratos) e razão molar (RM) álcool/ácido. A Tabela 14 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as conversões em geranil oleato e geranil propionato.

Tabela 14. Matriz do primeiro planejamento experimental 2^3 (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em geranil oleato e geranil propionato em 6 horas de reação.

Ensaio	T (°C)	RM geraniol/ ácido	[E] (%) (m/m)	Conversão (%)	
				Geranil oleato	Geranil propionato
1	-1 (40)	-1 (1:1)	-1 (1)	81,83	61,67
2	1 (60)	-1 (1:1)	-1 (1)	86,47	66,60
3	-1 (40)	1 (5:1)	-1 (1)	93,12	53,14
4	1 (60)	1 (5:1)	-1 (1)	98,05	61,69
5	-1 (40)	-1 (1:1)	1 (10)	93,53	90,16
6	1 (60)	-1 (1:1)	1 (10)	94,35	85,77
7	-1 (40)	1 (5:1)	1 (10)	98,50	77,23
8	1 (60)	1 (5:1)	1 (10)	69,36	60,99
9	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,5)	97,27	68,85
10	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,5)	97,27	68,95
11	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,5)	98,71	68,59

A partir desta Tabela, pode ser observado que os dois ácidos tiveram comportamentos químicos diferentes em função dos níveis estudados neste planejamento experimental. O ácido oleico apresentou maiores taxas de conversão, no ponto central (ensaios 9-11) e nos ensaios 4 e 7 que foram conduzidos com excesso de um dos reagentes. Para o ácido propiônico maiores conversões foram obtidas com maiores concentrações de enzima e razão molar 1:1, caso dos ensaios 5 e 6, os quais apresentaram conversões em geranil propionato de 90% e 85%, respectivamente.

Os resultados de conversão em geranil oleato e geranil propionato apresentados na Tabela 14 foram tratados estatisticamente. Os efeitos absolutos estão apresentados na forma de Gráfico de Pareto, nas Figuras 3 e 4.

Observou-se que em 6 horas de reação de geraniol com ácido oleico somente a temperatura apresentou o efeito significativo negativo ($p < 0,05$) na conversão (Figura 3).

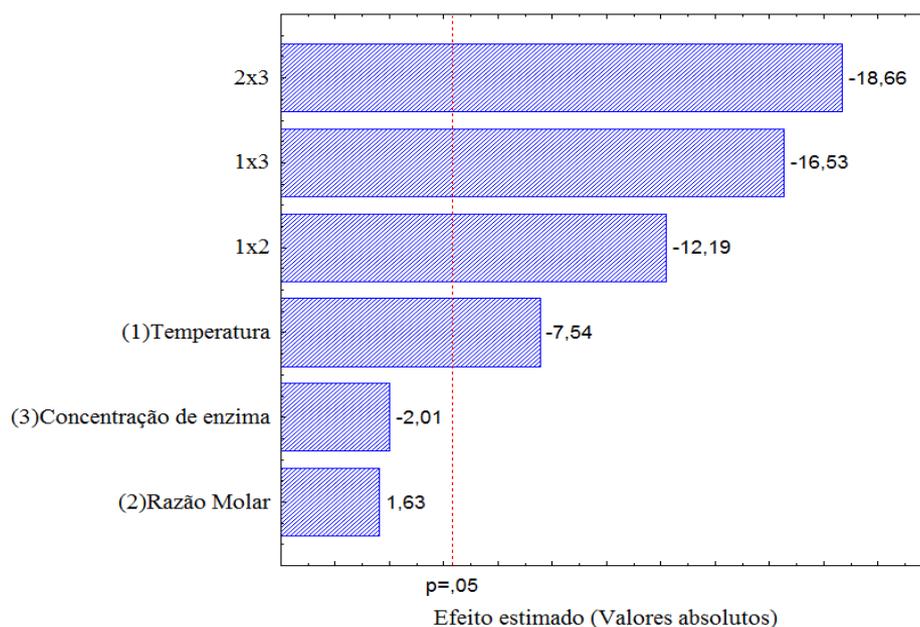


Figura 3. Gráfico de Pareto da produção de geranil oleato (6 horas de reação).

Este fato indica que para manter altas taxas de produção, a síntese enzimática pode ser conduzida em temperaturas mais amenas, significando economia de energia durante o processo de esterificação. Para a síntese de geranil propionato a concentração da enzima apresentou efeito positivo significativo ($p < 0,05$), o que significa que os maiores níveis desta variável conduzem a maiores conversões enquanto a razão molar e temperatura tiveram efeitos significativos negativos ($p < 0,05$) (Figura 4).

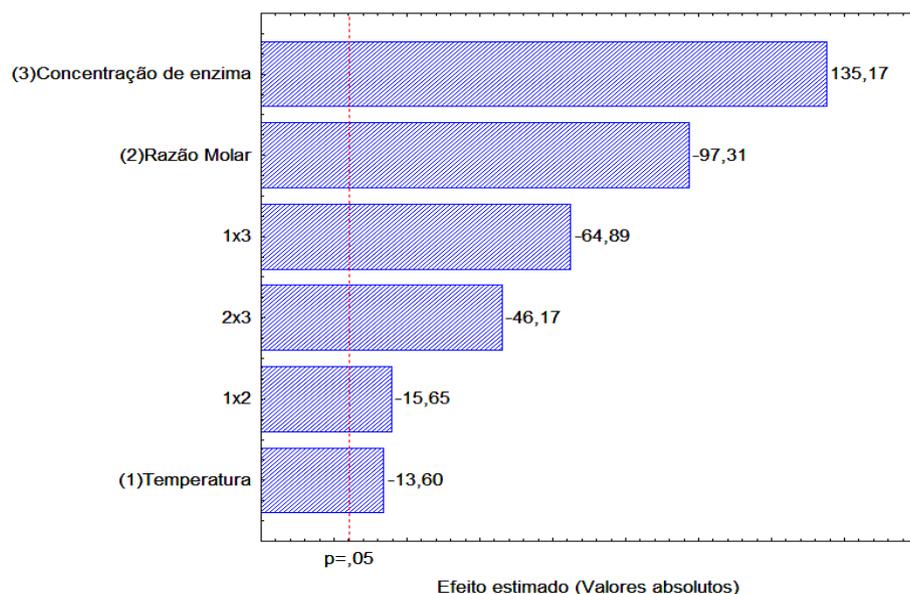


Figura 4. Gráfico de Pareto da produção de geranil propionato (6 horas de reação).

Segundo planejamento experimental

Com base nas conclusões obtidas no primeiro planejamento experimental foram realizados mais dois planejamentos experimentais: um planejamento fatorial completo 2^2 com objetivo de otimizar a produção de geranil oleato e um DCCR 2^2 para otimização de produção de geranil propionato.

Analisando a influência de cada uma das variáveis do primeiro planejamento experimental e visando maximizar a produção enzimática de geranil oleato, um delineamento fatorial 2^2 completo foi realizado. Como a temperatura apresentou efeito significativo negativo optou-se por fixar esta variável em 40°C , avaliando o efeito da razão molar (RM) entre os substratos e concentração de enzima [E] (m/m substrato) na conversão em geranil oleato. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Tabela 15.

A análise preliminar desta tabela permite verificar que a condição experimental relativa à maior concentração de enzima, em excesso de geraniol (experimento 4), conduziu à conversão mais elevada (94,12%). Em relação à razão molar álcool/ácido, a literatura (Chaar, 2000; Castro *et al.*, 1997) aponta que excesso de álcool poderia afetar

positivamente a conversão do processo. De uma forma geral, conversões mais elevadas na produção de geranil ésteres foram obtidas com maiores concentrações de enzima em todos os experimentos.

Os resultados obtidos no segundo planejamento experimental foram estatisticamente tratados e permitiram a obtenção de um modelo empírico codificado para a conversão enzimática de geranil oleato em função das variáveis avaliadas, o qual está apresentado na Equação 4.

$$\text{Conversão geranil oleato (\%)} = 89,45 + 1,93*RM + 5,08*[E] - 0,88*RM*[E] \quad (4)$$

Onde:

RM – razão molar entre geraniol e ácido oleico

[E] – concentração de enzima (%) m/m substratos

Tabela 15. Matriz do segundo planejamento experimental 2^2 realizado (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em geranil oleato conduzidas em 40°C, agitação de 150rpm e tempo de reação de 6 horas.

Ensaio	RM geraniol/ ácido oleico	[E] (%) (m/m)	Conversão (%)
1	-1 (1:1)	-1 (1)	80,09
2	1 (5:1)	-1 (1)	85,74
3	-1 (1:1)	1 (10)	92,03
4	1 (5:1)	1 (10)	94,12
5	0 (3:1)	0 (5,5)	91,68
6	0 (3:1)	0 (5,5)	92,22
7	0 (3:1)	0 (5,5)	90,29

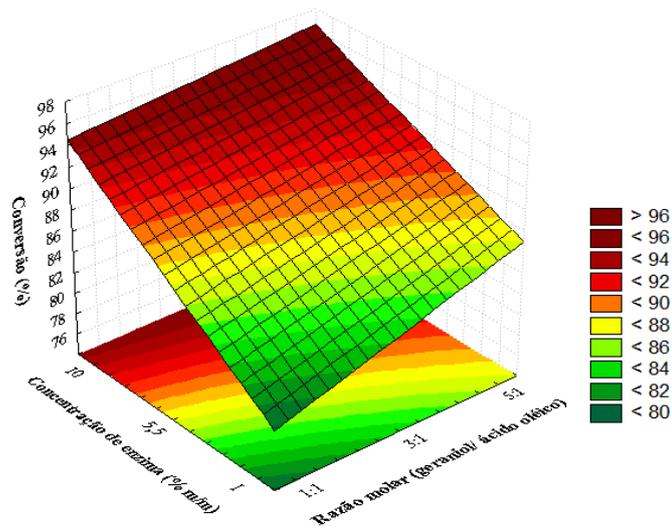
Os parâmetros não significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância (ANOVA), valores apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Análise de variância para produção de geranil oleato no segundo planejamento experimental.

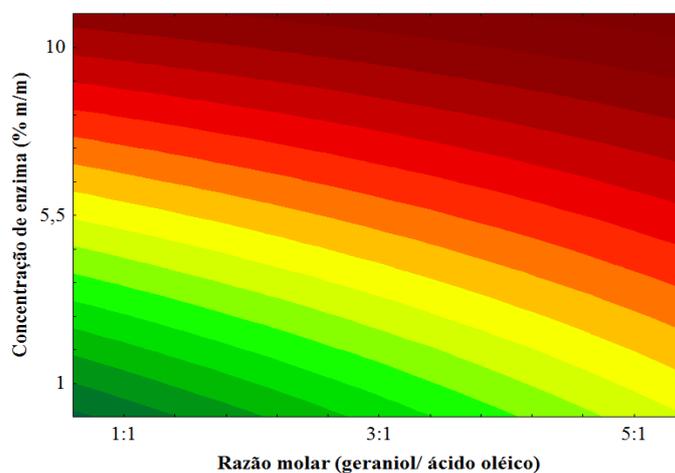
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	121,36	3	40,45	5,57
Residual	21,78	3	7,26	
Falta de Ajuste	19,81	1		
Erro Puro	1,97	2		
Total	143,14	6		

$R=0,84$; $F_{0,1;3;3}= 5,3$

O coeficiente de correlação R obtido foi de 0,84 e o F calculado foi maior que o valor tabelado (5,3), sendo que estes validaram estatisticamente um modelo empírico ($p<0,1$) para produção de geranil oleato na faixa investigada e permitiram a construção da superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) apresentadas na Figura 5. A razão molar e concentração da enzima influenciaram significativamente na conversão dos substratos. Como pode ser observado na Figura 5, nas mais altas concentrações de enzima e maiores razões molares foram encontradas as maiores conversões



a)



b)

Figura 5. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de geranil oleato em função da concentração de enzima e razão molar.

Os principais estudos apresentados na literatura referentes ao tema serão expostos a seguir, como forma de comparação com os dados experimentais obtidos no presente trabalho. Olsen *et al.* (2006) realizaram um estudo da conversão do lavandulol em acetato de lavandulil através da catálise enzimática em dióxido de carbono supercrítico utilizando a lipase imobilizada Novozym 435 como catalisador, ácido acético como agente acilante e n-hexano como solvente. Durante o trabalho, otimizou-se a conversão da biotransformação avaliando-se a concentração de substrato, temperatura, pressão e densidade. Conversões de

até 86% foram observadas para concentrações de substrato de 60mM, temperatura de 60°C e 10 MPa. Um aumento da temperatura do sistema resultou em menor enantioseletividade, considerando que mudanças na pressão e na densidade tiveram pouco efeito neste parâmetro.

4.1.1.2 Cinética da produção enzimática de geranyl oleato

A cinética da produção enzimática de geranyl oleato em sistema livre de solvente foi realizada a partir dos resultados obtidos na condução dos planejamentos experimentais e em testes preliminares (temperatura de 50°C; razão molar geraniol: ácido oléico 3:1; concentração de enzima de 5,5% (m/m substratos) e agitação 150 rpm). O estudo cinético foi realizado utilizando-se réplicas da amostra de partida (“cinética destrutiva”).

- ✓ Efeito da razão molar geraniol:ácido oleico na cinética de produção enzimática de geranyl oleato.

Os experimentos para o estudo do efeito cinético da razão molar geraniol:ácido oleico foram realizados fixando a temperatura em 50°C, concentração de enzima em 5,5% (m/m substratos) e agitação em 150rpm. A Figura 6 apresenta as curvas obtidas de conversão em função do tempo, variando a razão molar geraniol : ácido oleico em 1:1, 3:1 e 5:1. A partir da Figura 6 pode-se observar que em 30 minutos da reação maiores conversões foram alcançadas com razões molares 3:1 e 5:1 correspondendo a 73,9 e 70,9%, respectivamente. Taxas iniciais similares (1,66; 1,55 e 1,61min⁻¹) foram obtidas para as três razões molares testadas (1:1; 3:1 e 5:1, respectivamente), demonstrando que, na faixa estudada, esta variável não apresentou diferença significativa. Após uma hora de reação os rendimentos das reações ficaram próximos para razões molares 1:1, 3:1 e 5:1, atingindo conversões superiores a 90%.

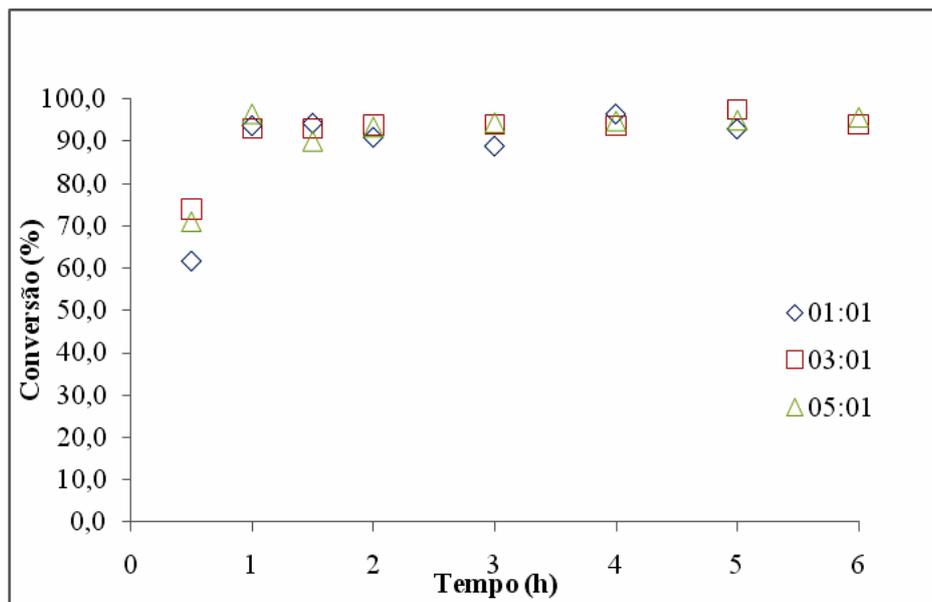


Figura 6. Efeito da razão molar sobre a conversão de geranil oleato à temperatura de 50°C, concentração de enzima de 5,5% (m/m substratos) e agitação de 150 rpm.

A razão molar ácido:álcool é um dos parâmetros mais importantes em esterificações enzimáticas. Uma vez que a reação é reversível, um aumento na quantidade de um dos reagentes poderá resultar em mais altas conversões, e como esperado, deslocará o equilíbrio químico na direção do produto. Um caminho de deslocamento da reação na direção da síntese é o aumento da concentração de álcool. Contudo, alta concentração de álcool poderá reduzir a velocidade da taxa da reação devido à inibição. He *et al.* (2002) avaliaram o efeito da razão molar ácido: álcool na síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila em um sistema contendo éter de petróleo nas razões molares de 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4, na temperatura de 40°C, com lipase imobilizada de *Candida sp.* 99-125 (10% m/m substratos). Os autores observaram a mais alta conversão (86%) nas razões molares de 4:1 e 2:1.

Outro caminho para deslocamento de equilíbrio de uma reação é a remoção de subproduto formado. A água gerada durante a reação de esterificação é considerada o mais importante parâmetro que precisa ser controlado. Mesmo sob condições de baixa

concentração de água, durante o curso da reação, 1 mol de água é formado para cada mol de éster sintetizado. Remoção de água por diversos métodos pode prevenir este fenômeno e ajudar na direção da reação para sua conclusão com altas conversões (Irimescu *et al.*, 2004). O uso de peneiras moleculares no decorrer deste trabalho pode explicar as altas taxas de conversões (93,7%) alcançadas para razão molar 1:1 após uma hora de reação (Figura 6).

- ✓ Efeito da concentração de enzima na cinética de produção enzimática de geranyl oleato.

O efeito cinético da concentração de enzima no sistema foi avaliado mantendo-se fixas as condições do sistema na temperatura de 50°C, razão molar geraniol:ácido oleico de 3:1 e agitação de 150rpm, possibilitando a obtenção das curvas cinéticas em função do tempo variando a concentração de enzima em 1, 5,5 e 10% (m/m substratos) (Figura 7).

Como pode ser observado na Figura 7, a concentração de enzima tem influência significativa na produção de geranyl oleato. Com 10% de enzima a reação de esterificação se desenvolve rapidamente alcançando conversão quase completa (98,9%) em 30 minutos de reação (taxa inicial de 3,30min⁻¹). Observa-se também uma tendência de estabilidade nas conversões utilizando concentração de catalisador na faixa de 1 a 10% de enzima (m/m), a partir de 3 horas de reação. Uma possível explicação para este fato poderia ser a hipótese de que um excesso de enzima no meio pode não colaborar com o aumento da conversão, pois na presença de grande quantidade de lipase muitas moléculas da enzima podem agregar-se e o sítio ativo pode não ficar exposto aos substratos. Isto conduz à formação de agregados e uma distribuição não homogênea da enzima. As moléculas de enzima na superfície externa de tais partículas são expostas a altas concentrações de substrato, mas o transporte de massa dentro da partícula do biocatalisador pode

drasticamente limitar a concentração de substrato no interior da partícula. Menores atividades de uma fração de biocatalisador reduzem a eficiência por unidade de massa do biocatalisador e não aumenta a conversão (Karra-Châabouni *et al.*, 2006).

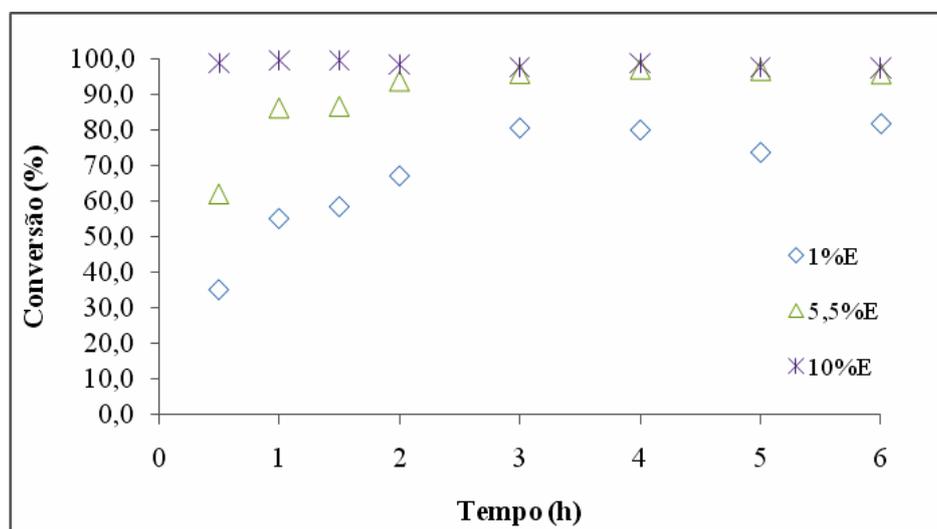


Figura 7. Efeito da concentração de enzima sobre a conversão de geranyl oleato à temperatura de 50°C, razão molar geraniol: ácido oleico de 3:1 e agitação 150rpm.

✓ Efeito da temperatura na cinética de produção enzimática de geranyl oleato.

A fim de avaliar o efeito cinético da temperatura sobre a conversão de geranyl oleato, manteve-se fixa a razão molar geraniol:ácido oleico (3:1), concentração da enzima em 5,5% (m/m substratos) e agitação em 150rpm, o que possibilitou a obtenção das curvas de conversão em função do tempo, variando a temperatura em 40, 50 e 60°C, conforme apresentado na Figura 8. Taxas iniciais similares foram obtidas para as três temperaturas avaliadas (2,28; 2,39 e 2,81min⁻¹, respectivamente).

A temperatura apresenta dois importantes papéis no sistema reacional. Primeiramente, altas temperaturas podem melhorar a difusão dos substratos ou sua solubilidade. Em segundo lugar, as enzimas possuem uma temperatura ótima de atuação, que no caso da Novozym 435 está em torno de 40 a 70°C, como comentado anteriormente.

Güvenç *et al.* (2002) estudaram a esterificação de isoamil acetato catalisada pelas enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM sem a adição de solvente, agitação de 150rpm e concentração de enzima de 5% (p/p substratos). Na razão molar de ácido/álcool 1:2, com a Novozym 435, obtiveram o equilíbrio da reação em 6 horas nas três temperaturas estudadas (30, 40 e 50°C) com 81% de conversão. Com a Lipozyme RM IM, na razão molar ácido/álcool 1:1, em 48 horas de reação obtiveram conversão de 20% a 50°C e 13% a 30°C.

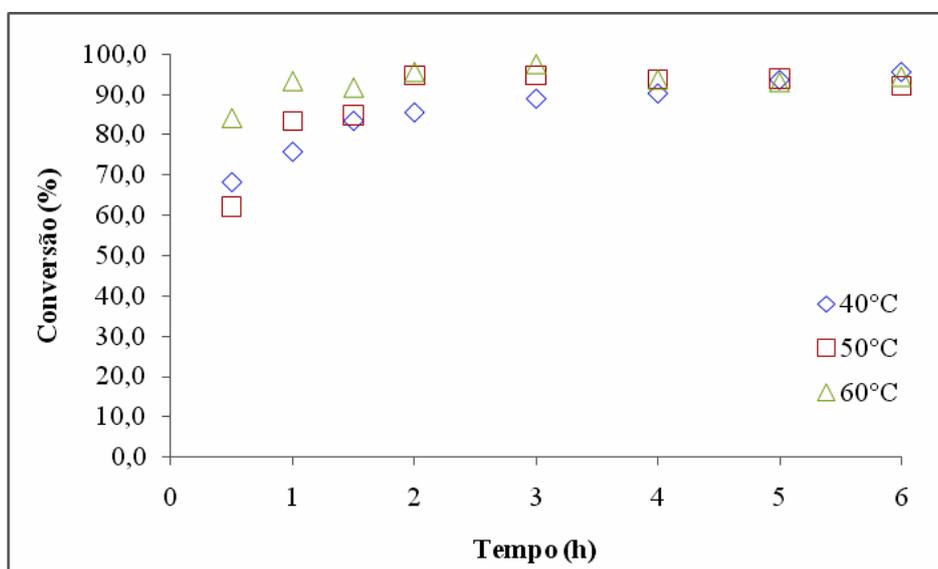


Figura 8. Efeito da temperatura sobre a conversão de geranil oleato à razão molar ácido oleico:geraniol de 3:1, concentração de enzima de 5,5% e agitação de 150rpm.

A partir da Figura 8 pode se observar que na temperatura 60°C em uma hora de reação foi possível atingir 93,4% de conversão. É possível também notar que a conversão aumenta com o tempo e atinge conversão máxima de 95% em 2 horas de reação para temperaturas de 50 e 60°C. He *et al.* (2002), utilizando a enzima de *Candida sp.* 99-125, em um sistema utilizando éter de petróleo como solvente, estudaram o efeito da temperatura na produção de palmitato de 2-etilexila. Observaram que quando a

temperatura era controlada no intervalo de 40-50°C, a produção de palmitato de 2-etilexila aumentou com o aumento da temperatura. Em contraste, quando a temperatura foi elevada de 50 a 70°C, o rendimento diminuiu.

4.1.2 Produção enzimática de geranil propionato

4.1.2.1 Otimização de produção de geranil propionato

Com base nas conclusões obtidas no primeiro planejamento experimental e tendo como objetivo a otimização do processo de conversão em geranil propionato, um DCCR 2² totalizando 11 experimentos foi realizado. Considerando que a melhor conversão foi obtida à temperatura de 40°C (ensaio 5 da Tabela 14), na faixa estudada, seu valor foi fixado.

No primeiro planejamento experimental, nos maiores níveis de concentração de enzima e menores razões molares, maiores conversões de geranil propionato foram obtidas. Estes fatos determinaram os deslocamentos dos níveis da variável concentração de enzima para valores superiores. As variáveis independentes estudadas foram razão molar (RM) e concentração de enzima ([E] m/m substrato). A Tabela 17 apresenta a matriz DCCR e as conversões em geranil propionato obtidas nesta etapa.

A partir da Tabela 17 pode ser observado que os ensaios realizados no ponto central com razão molar (3:1) e concentração de enzima (10%) conduziram às maiores conversões em geranil propionato. Porém, conversão similar foi encontrada no ensaio 7 com razão molar 3:1 e concentração de enzima 3%. Este fato pode indicar que nas condições estudadas a enzima não teve efeito pronunciado.

Os resultados obtidos no terceiro planejamento experimental foram tratados estatisticamente e estão apresentados na Tabela 18. Verificou-se que o coeficiente de correlação obtido (0,86) e o teste F (F calculado maior que F tabelado) validaram

estatisticamente o modelo ($p < 0,1$) e permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno, apresentados na Figura 9.

Tabela 17. Matriz do terceiro planejamento experimental (valores codificados e reais) com respostas em conversão em geranyl propionato nas reações conduzidas em 40°C, agitação de 150rpm e tempo de reação de 6 horas.

Ensaio	RM geraniol:ácido propiônico	[E] (% m/m)	Conversão (%)
1	1:1 (-1)	5 (-1)	58,57
2	5:1 (1)	5 (-1)	83,01
3	1:1 (-1)	15 (1)	86,32
4	5:1 (1)	15 (1)	88,6
5	0,18:1 (-1,41)	10 (0)	14,1
6	5,8:1(1,41)	10 (0)	61,67
7	3:1 (0)	3 (-1,41)	93,02
8	3:1 (0)	17 (1,41)	90,7
9	3:1 (0)	10 (0)	93,32
10	3:1 (0)	10 (0)	94,29
11	3:1 (0)	10 (0)	96,17

Os parâmetros não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância (ANOVA) (Tabela 18), resultando na validação do modelo empírico codificado otimizado para conversão enzimática de geranyl propionato em função da razão molar, concentração de enzima e interações entre concentração de enzima e razão molar, o qual está apresentado na Equação 5.

Tabela 18. Análise de variância para produção de geranyl propionato no terceiro planejamento experimental.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	5358,50	5	1071,70	6,76
Residual	792,40	5	158,48	
Falta de Ajuste	788,21	3		
Erro Puro	4,19	2		
Total	6150,91	10		

R=0,87; $F_{0,05;5;5} = 5,05$

$$\text{Conversão geranil propionato (\%)} = 94,54 + 11,76 * RM - 24,87 * [RM]^2 + 3,77 * E + 2,28 * E^2 - 5,54 * RM * [E]$$

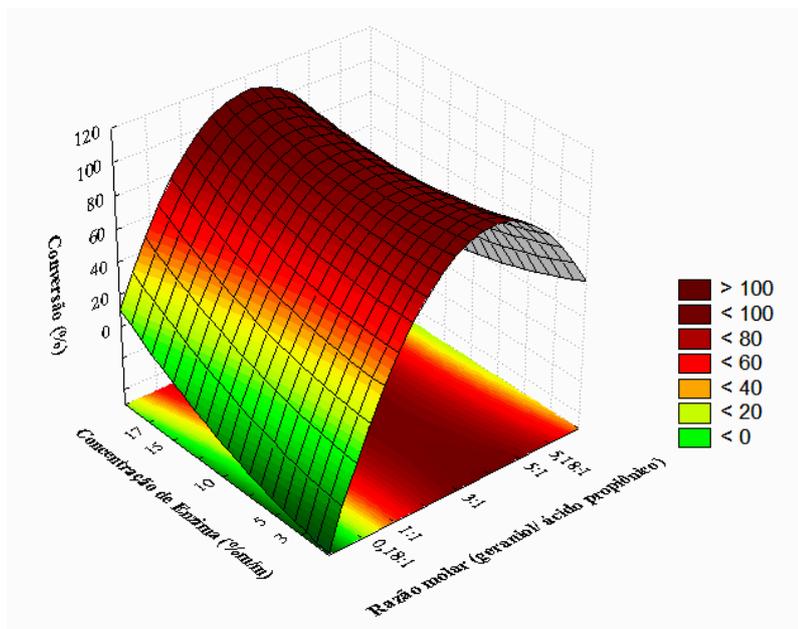
(5)

Onde:

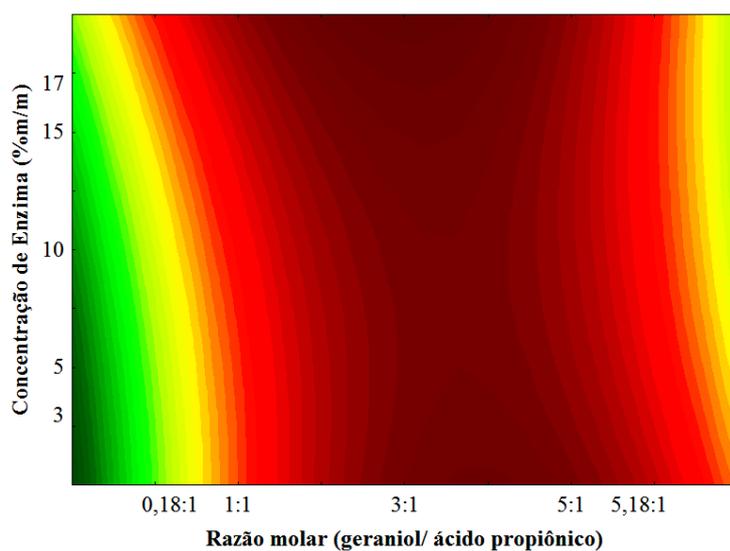
RM – razão molar entre geraniol e ácido oleico

[E] – concentração de enzima (%) m/m substratos

Como pode ser observado na Figura 9, as concentrações de enzima e razão molar que otimizaram a produção de geranil propionato foram obtidas nos pontos centrais do planejamento, na condição de razão molar 3:1 (geraniol : ácido propiônico) e 10% de enzima, alcançando uma conversão média de 94,6% de produto.



(a)



(b)

Figura 9. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de geranil propionato em função da concentração de enzima e razão molar.

Alguns estudos apresentados na literatura relatam a esterificação enzimática em sistema livre de solvente com diferentes ácidos graxos e alcoóis. Kumar *et al.* (2004) investigaram a síntese de etil palmitato em sistema livre de solvente e obtiveram 97% de conversão. Güvenç *et al.* (2002) estudaram a produção enzimática de isoamil acetato em sistema livre de solvente e obtiveram 80% de conversão utilizando 5% (m/m substratos)

com Novozym 435, em 6 horas de reação, razão molar ácido/álcool de 1:2 na temperatura de 30°C e agitação de 150rpm. Utilizando a enzima comercial Novozym 435, Santos *et al.* (2007) avaliaram a síntese de butil ésteres em sistema livre de solvente, onde a mais alta proporção obtida correspondeu a 49% utilizando ácido butírico como agente acilante.

Síntese de geranil e citronelil ésteres a partir alcoólise de óleo de coco usando lipase *Rhizomucor miehei* foi investigada por De *et al.* (1999). As condições otimizadas da reação foram: temperatura, 50°C; período de incubação, 5 horas; concentração de enzima, 10% (m/m). Dentro das condições estudadas, o rendimento da reação foi superior a 50% para ambos os alcoóis. Chang *et al.* (2006) estudaram a produção de hexil laurato utilizando a enzima Lipozyme IM 77 em sistema livre de solvente. As condições ótimas de síntese foram encontradas no tempo de reação de 40 minutos, 58°C, concentração da enzima de 25,4mg/volume (0,196 BAUN) e um pH de 5,9, com 69,7% de conversão. Ikeda & Kurokawa (2001) usaram lipase de *Candida antarctica* imobilizada em fibra de gel de acetato de celulose - TiO₂ para conduzir a síntese de geranil acetato. Após 100 horas de reação, o rendimento da reação foi de 85%.

Na presença de solvente orgânico podem ser citados como forma de comparação os resultados apresentados a seguir. Bartling *et al.* (2001) investigaram o uso de membranas para remoção de água na síntese enzimática de geranil acetato catalisada por *Candida antarctica* em n-hexano e concluíram que o uso de membranas permite aumentar o rendimento da reação de 94% para 100% a temperatura 30°C e razão molar 1:1 (ácido acético e geraniol).

Com o objetivo de reutilizar as enzimas imobilizadas por várias bateladas, e tornar mais fácil a separação do biocatalisador do meio, Tan *et al.* (2006) estudaram um método para síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila por lipase imobilizada sobre membranas de fibra sintética em reator de batelada, onde obtiveram 95% de esterificação utilizando

razão molar ácido palmítico/2-etil-hexanol 1:1,3 - 1:1,5, 40°C, lipase usada na imobilização 5000 - 6000UI/g membrana, em sistema com éter de petróleo. Garcia *et al.* (1999) investigaram a cinética da esterificação de ácido palmítico catalisada por Novozym 435 para a síntese de isopropil palmitato, onde obtiveram 70% de esterificação, em 2 horas de reação, temperatura de 65-75°C e concentração do biocatalisador de 2,2-7,83wt%.

4.1.2.2 Cinética da produção enzimática de geranil propionato

Com base nos resultados obtidos anteriormente, realizou-se um estudo da cinética da reação para a produção de geranil propionato. O estudo cinético foi realizado utilizando-se réplicas da amostra de partida (“cinética destrutiva”).

- ✓ Efeito da razão molar geraniol: ácido propiônico na cinética de produção enzimática de geranil propionato

Os experimentos para o estudo do efeito da razão molar ácido propiônico:geraniol foram realizados fixando a temperatura em 50°C, concentração de enzima em 10% (m/m substratos) e agitação em 150rpm. A Figura 10 apresenta as curvas de conversão obtidas em função do tempo, variando a razão molar geraniol: ácido propiônico em 1:1, 3:1, 5:1. A partir dessa figura pode ser observado que a razão molar influencia no rendimento da reação nos primeiros 30 minutos atingindo 88% de conversão para razão molar 5:1 e a 99% depois de 6 horas de reação. Taxas iniciais de 0,95; 1,48 e 2,93min⁻¹ foram obtidas para razões molares de 1:1, 3:1 e 5:1, respectivamente. Após 1 hora de síntese observa-se estabilização nas curvas de rendimento para razões molares 5:1 e 3:1. Cabe salientar que para razão equimolar os valores máximos de conversão (95%-98%) foram atingidos depois de 4 horas de reação. Além disso, quando comparamos os resultados obtidos para ácido propiônico com os resultados obtidos para ácido oleico percebe-se que a influência da

razão molar na conversão em ésteres de geraniol parece ser mais pronunciada para ácido de cadeia menor.

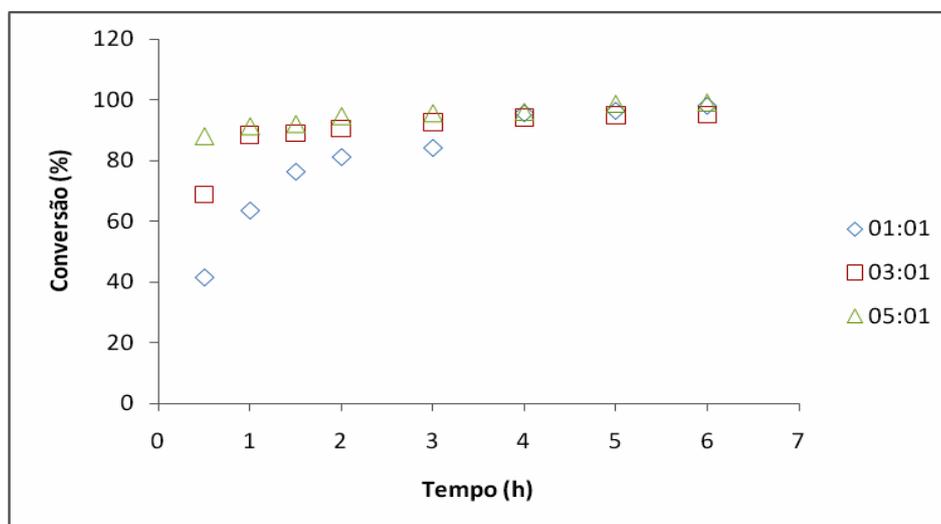


Figura 10. Efeito da razão molar sobre a conversão de geraniol propionato à temperatura de 50°C, concentração de enzima de 10% (m/m substratos) e agitação de 150rpm.

Dörmo *et al.* (2004) analisaram o efeito da razão molar de ácido:álcool na esterificação de isoamil oleato na temperatura de 40°C, 0,5% de enzima (Novozym 435), agitação de 150rpm e 7 horas de reação, sem a utilização de solvente. Avaliaram o efeito da razão molar em 1:1, 1:2, 1:5 e 2:1 de ácido:álcool e obtiveram mais altas conversões em 4 horas de reação (70-80%) com as razões molares de 1:2 e 1:5.

- ✓ Efeito da concentração de enzima na cinética de produção enzimática de geraniol propionato

O efeito da concentração de enzima no sistema foi avaliado mantendo-se fixas as condições do sistema na temperatura de 50°C, razão molar ácido propiônico:geraniol de 3:1 e agitação de 150rpm, possibilitando a obtenção das curvas cinéticas em função do tempo, variando a concentração de enzima em 1, 5,5 e 10% (m/m substratos) (Figura 11).

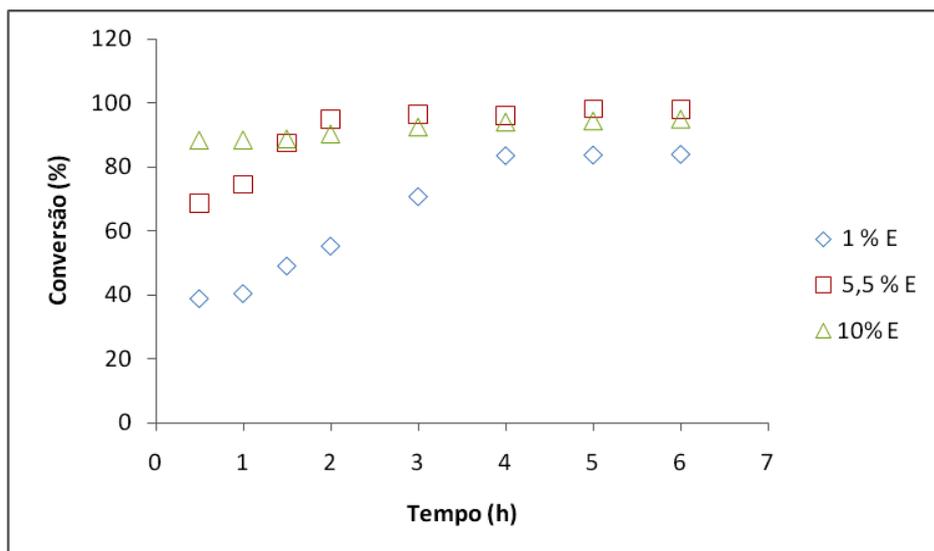


Figura 11. Efeito da concentração de enzima sobre a conversão de geranil propionato à temperatura de 50°C, razão molar geraniol : ácido propiônico de 3:1 e agitação de 150rpm.

Com 10% de enzima (m/m substratos), pode-se observar que a reação ocorre rapidamente alcançando elevada conversão (88%), em 30 minutos (taxa inicial de 2,95 min^{-1}). Taxas iniciais de 0,43 e 1,05 min^{-1} foram obtidas para concentrações de enzima de 1 e 5,5% (m/m substratos), respectivamente. Na condição com 1% (m/m substratos) de enzima no sistema, a conversão em geranil propionato foi inferior em todos os pontos com conversão 83,68% após de 4 horas de reação. Após este período observou-se a estabilização na curva sinética alcançando maior converção (84%) na concentração de enzima de 1% (m/m substratos) em 6 horas de reação. Conforme visualizado na Figura 11 há uma tendência de estabilidade nas conversões na faixa de 5,5 e 10% de enzima (m/m) a partir de 2 hora da reação. O mesmo fenômeno foi observado para produção de geranil oleato (Figura 7).

- ✓ Efeito da temperatura na cinética de produção enzimática de geranil propionato

A fim de avaliar o efeito da temperatura sobre a conversão de geranil propionato, manteve-se fixa a razão molar ácido propiônico:geraniol (3:1), concentração da enzima em 10% (m/m substratos) e agitação em 150rpm, o que possibilitou a obtenção das curvas de conversão em função do tempo, variando a temperatura em 40, 50 e 60°C, conforme apresentado na Figura 12.

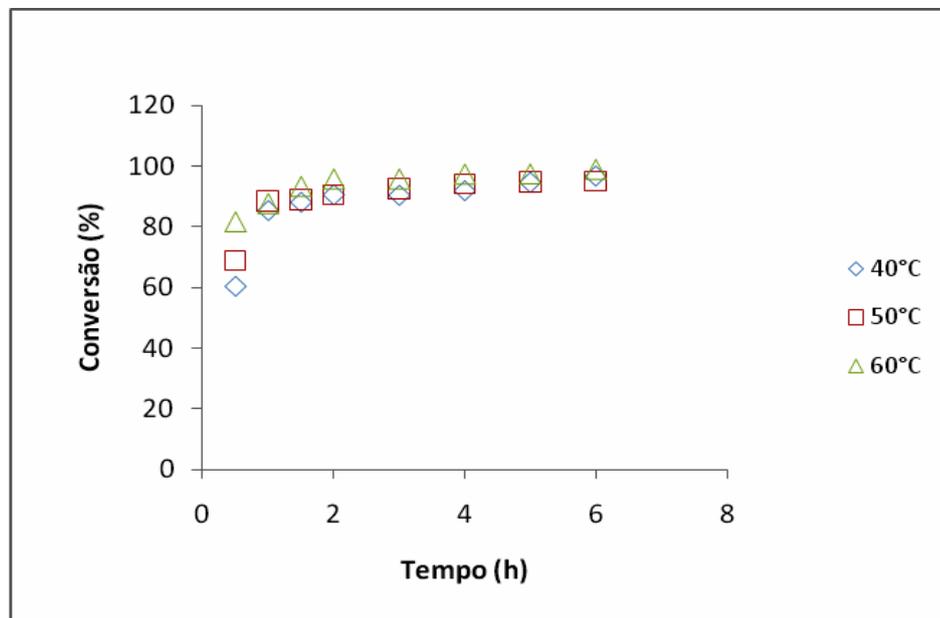


Figura 12. Efeito da temperatura sobre a conversão de geranil propionato à razão molar geraniol : ácido propiônico de 3:1, concentração de enzima de 10% e agitação de 150rpm.

A enzima Novozym 435 possui uma temperatura ótima de atuação em torno de 40 a 70°C, como foi comentado anteriormente. Os resultados do estudo cinético demonstram (Figura 12) que altas conversões podem ser atingidas para todas as temperaturas testadas já na primeira hora de reação (taxas iniciais de reação $1,43\text{min}^{-1}$, $1,49\text{min}^{-1}$ e $1,53\text{min}^{-1}$

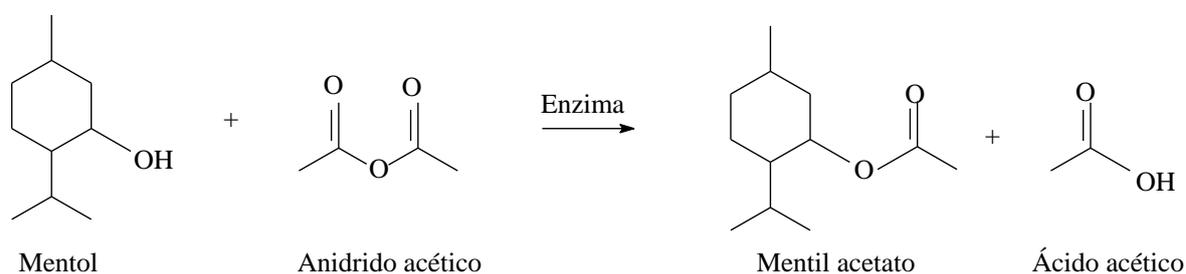
respectivamente), chegando aproximadamente a 85% de conversão já na primeira hora de reação.

Yee *et al.* (1997) estudaram os efeitos das condições reacionais na produção de geranil butirato e geranil caproato em sistemas com n-hexano e lipase de *Pseudomonas* sp. imobilizada. Os parâmetros investigados foram a concentração de enzima, a concentração de substratos, a adição de água, a temperatura, o pH e a reutilização de enzima. Conversões de 96 e 99% foram alcançadas para citronelil butirato e geranil caproato, respectivamente, com concentração de enzima 15% (m/m do substrato), temperatura reacional entre 30°C e 50°C, adição 2% de água depois de 24 horas de incubação.

4.1.3 Ciclos de utilização da lipase para a produção de geranil oleato e geranil propionato

A utilização de enzimas imobilizadas em reações de síntese apresenta como principal vantagem a possibilidade de reutilização destas. Tendo como base este argumento, foram avaliados 10 ciclos consecutivos de reutilização da enzima Novozym 435 na condição otimizada no planejamento de experimentos para produção de geranil oleato e geranil propionato. A atividade residual, definida como: $(\text{atividade final}/\text{atividade inicial}) \times 100$, apresentou, para todas as condições testadas, valores de cerca de 98%, consistindo em informação importante, a qual possibilita o reuso do catalisador em sucessivas bateladas ou seu emprego como catalisador deste sistema reacional em processos contínuos.

4.2 Produção Enzimática de Ésteres a Partir do (\pm) Mentol



Esquema 3. Reação de esterificação de mentol e anidrido acético.

4.2.1 Otimização de produção de ésteres de mentol

Visando definir qual substrato a ser utilizado, juntamente com o (\pm) mentol na reação para a produção enzimática de mentil ésteres, um planejamento experimental fatorial 2^3 foi realizado. Como agentes acilantes foram testados ácidos oleico, propiônico e anidrido acético (Esquema 3). As variáveis independentes estudadas foram temperatura, concentração de enzima e razão molar (ácido ou anidrido:álcool). A Tabela 19 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as conversões em mentil acetato. Cabe salientar que a utilização de ácido oleico e ácido propiônico como substratos para transformação de (\pm) mentol utilizando Novozym 435 como catalisador não conduziram à formação de produtos.

A partir desta tabela pode ser observado que maiores conversões (49,5% e 49,7%) foram obtidas com altas concentrações de enzima e excesso de mentol, fato esperado devido à reversibilidade da reação de esterificação.

Tabela 19. Matriz do primeiro planejamento experimental completo com as respostas em termos de conversão em mentil acetato.

Ensaio	T (°C)	RM anidrido/mentol	[E] (%) (m/m)	Conversão (%)
1	-1 (40)	-1 (1:1)	-1 (1)	33,21
2	1 (60)	-1 (1:1)	-1 (1)	29,24
3	-1 (40)	1 (5:1)	-1 (1)	41,46
4	1 (60)	1 (5:1)	-1 (1)	47,05
5	-1 (40)	-1 (1:1)	1 (10)	32,28
6	1 (60)	-1 (1:1)	1 (10)	27,01
7	-1 (40)	1 (5:1)	1 (10)	49,48
8	1 (60)	1 (5:1)	1 (10)	49,68
9	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,5)	44,59
10	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,5)	40,01
11	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,5)	42,33

Os resultados de conversão apresentados na Tabela 19 foram tratados estatisticamente. Os efeitos estimados estão apresentados na forma de Gráfico de Pareto, na Figura 13.

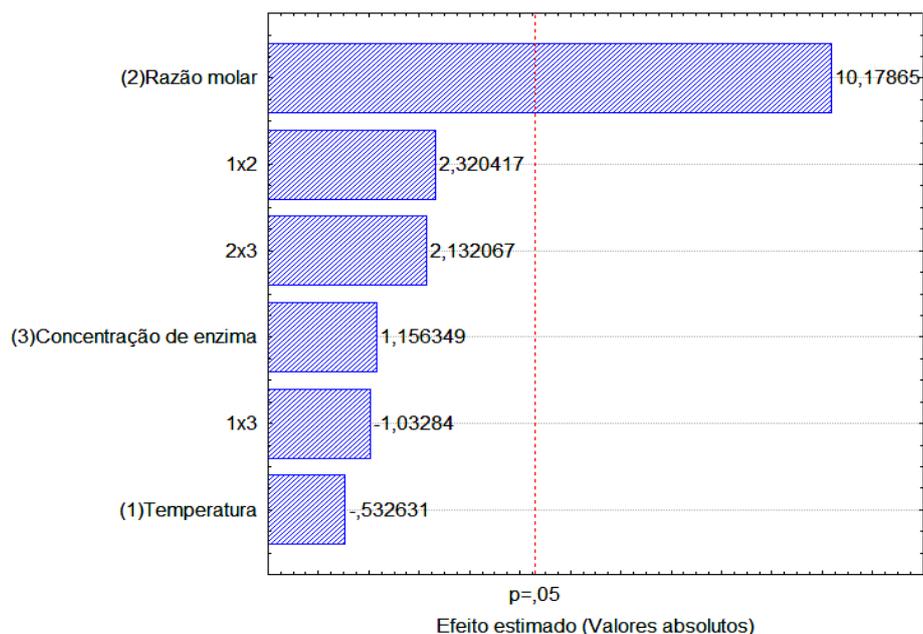


Figura 13. Gráfico de Pareto da produção de mentil acetato (6 horas de reação).

Observou-se que em 6 horas de reação somente a razão molar entre os substratos apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,05$) na conversão em mentil acetato (Figura 13).

Os dados estatísticos permitiram a obtenção de um modelo empírico codificado para produção de mentil acetato na faixa investigada em função das variáveis avaliadas, o qual está apresentado na Equação 6.

$$\text{Conversão mentil acetato (\%)} = 39,67 - 0,43 * T + 8,24 * RM + 0,94 * E + 1,87 * T * RM - 0,84 * T * E + 1,73 * RM * E$$

(6)

A análise de variância (Tabela 20) demonstrou que o coeficiente de correlação R obtido foi de 0,94 e o F calculado (9,82) foi maior que o valor tabelado (6,16), validando estatisticamente um modelo empírico ($p < 0,05$) permitindo a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 14.

Tabela 20. Análise de variância para produção de mentil acetato.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	609,52	6	101,5863	9,82
Residual	41,39	4	10,34721	
Falta de Ajuste	30,90	2		
Erro Puro	10,49	2		
Total	650,91	10		

R=0,94; $F_{0,05;6;4} = 6,16$

Kobayashi *et al.* (2004) estudaram a síntese de L-mentil ésteres de ácidos graxos poliinsaturados em sistemas livres de solvente orgânico usando lipases produzidas a partir de *Candida rugosa* (Lipase-AY, Amano Enzyme Inc. e Aichi) como biocatalisadores e L-mentol, ácidos pentacosenoico, linolênico e γ -linolêico como substratos. Maiores conversões foram obtidas à temperatura de 30°C, razão molar 1,2:1mol/mol, atividade de água de 20% e concentração de enzima de 1600U/g. O equilíbrio da reação foi alcançado após 3 dias de reação com 75% de rendimento para L-Mentil pentacosenoato usando Lipase-AY. Outros dois ácidos também foram testados nas mesmas condições reacionais, embora os rendimentos das reações foram inferiores, alcançando 54% para L-Mentil linoleniato e 41% para L-mentil γ -linolenato, após 4 dias de reação.

Como pode ser observado na Figura 14, tanto a temperatura quanto a concentração de enzima não tiveram efeito na produção de mentil acetato (a) e o aumento da temperatura não influenciou significativamente na produção (b), mas a razão molar teve efeito positivo na taxa de conversão (c).

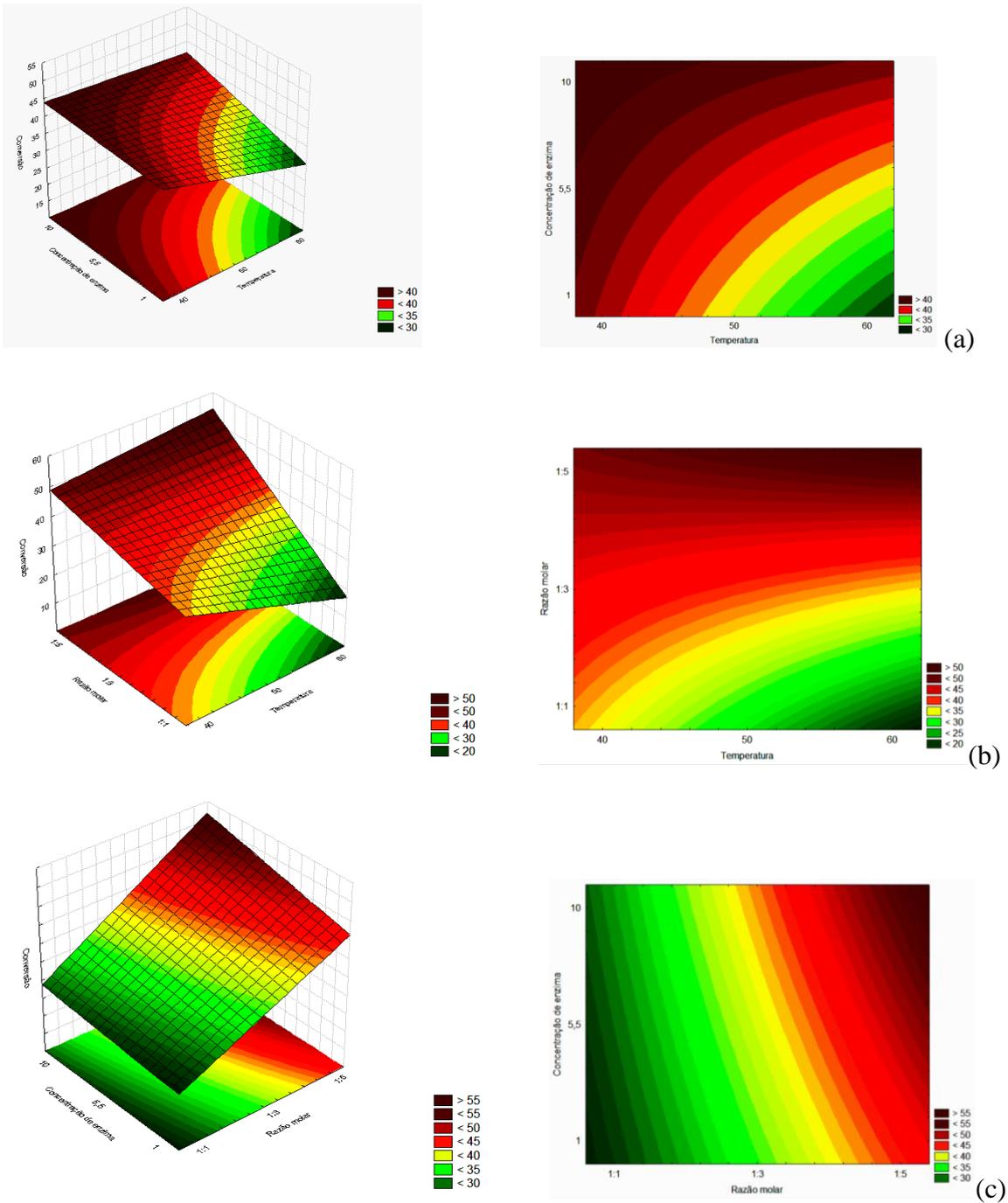


Figura 14. Superfícies de resposta e curvas de contorno para produção de mentil acetato (a) em função da concentração de enzima e temperatura, (b) em função da temperatura e razão molar, (c) em função da concentração de enzima e razão molar.

4.2.2 Cinética da produção enzimática de mentil acetato

Com base nos resultados obtidos anteriormente, realizou-se um estudo da cinética da reação para a produção de mentil acetato. O estudo cinético foi realizado utilizando-se réplicas da amostra de partida (“cinética destrutiva”).

- ✓ Efeito da razão molar mentol:anidrido acético na cinética de produção enzimática de mentil acetato

A partir dos resultados obtidos na condução do planejamento experimental foi realizado estudo cinético da influência da razão molar na produção de mentil acetato. Os experimentos para o estudo do efeito da razão molar mentol:anidrido acético foram realizados fixando a temperatura em 50°C, concentração de enzima em 5,5% (m/m substrato) e agitação em 150rpm. A Figura 15 apresenta as curvas de conversão obtidas em função do tempo, variando a razão molar mentol:anidrido acético em 1:1, 1:3, 1:5, 1:7. As taxas iniciais obtidas (5,67; 4,57; 3,48 e 2,06 min⁻¹ respectivamente) demonstraram que aumento da concentração de anidrido acético no meio reacional diminui a taxa inicial de reação, desfavorecendo a formação dos produtos (Figura 15).

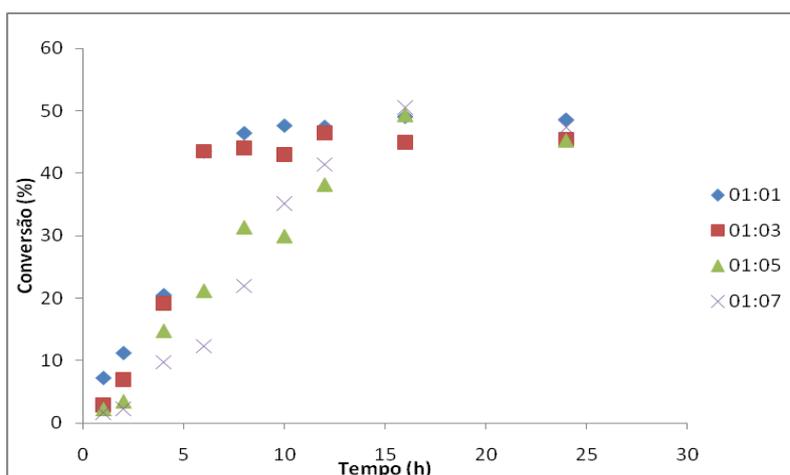


Figura 15. Efeito da razão molar sobre a conversão de mentol e anidrido acético à temperatura 50°C, concentração de enzima de 5,5% (m/m substratos) e agitação 150 rpm.

Vários trabalhos encontrados na literatura (Wu *et al.*, 1996; Athawale *et al.*, 2001; Jasmani *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Lü *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2006) foram realizados com o intuito de produzir ésteres de mentol opticamente puros a partir do mentol racêmico em sistemas com solventes orgânicos. Wu *et al.* (1996) investigaram a esterificação estereoseletiva do (\pm) mentol em n-hexano usando anidridos de ácidos acético, propiônico e butírico como agentes acilantes e lipase AY-30 de *Candida cylindracea* como biocatalisador. A razão molar (\pm) mentol anidrido butírico foi mantida 1:1. A enzima mostrou ser seletiva para esterificação do (-)-mentol com rendimento acima de 64% após de 48 horas de reação. O excesso enantiomérico obtido foi de 86%.

Resolução catalítica de (\pm) mentol em síntese enzimática de monômero de mentil metacrilato opticamente ativo usando lipase de *Pseudomonas cepacia* (Lipase-PS) foi realizada por Athawale *et al.* (2001). Diferentes parâmetros reacionais (quantidade de catalisador, tipo de agente acilante, solvente, temperatura e enantioseletividade) foram testados pelos autores. Metacrilato de metila, metacrilato de vinila e mono-oxima metacrilato de 2,3-butanodiona foram usados como agentes de acilação. Os melhores resultados foram obtidos usando mono-oxima metacrilato como substrato, diisopropil éter como solvente, concentração de enzima 1000 unidades e temperatura 30°C atingindo 98% de excesso enantiomérico após de 24 horas de reação.

Wang *et al.* (2002) também estudaram fatores que afetam a resolução de (\pm)-mentol em reações de esterificação. Entre 10 lipases testadas, a lipase de *Candida rugosa* demonstrou melhor capacidade de resolução enantiomérica. A lipase foi imobilizada em diferentes suportes e os experimentos foram realizados com diferentes agentes acilantes. O alto rendimento e pureza óptica do produto foram alcançados em ciclo-hexano saturado com água com ácido valérico usando lipase de *C. rugosa* imobilizada em suporte DEAE-

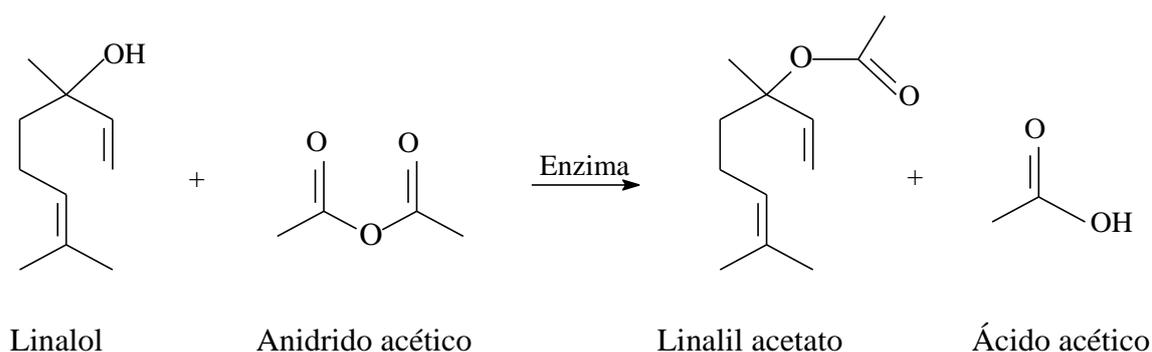
Sephadex A-25, atingindo a conversão de 95% em termos de excesso enantiomérico (ee_p ,%) após de 48 horas de conversão.

A atividade e estabilidade enzimática bem como enantioseletividade da lipase de *Candida cylindracea* em dois sistemas de solventes: n-hexano e surfactante 1,4-bis (2-etilexil) sulfosuccinato (AOT) foram estudados por Lü *et al.* (2005). Os autores usaram ácido propiônico com agente acilante. Os resultados indicaram que a lipase apresentou maior estabilidade em AOT do que em n-hexano, o que provou que o sistema de micelas reversas tem aplicação potencial para manutenção da atividade enzima por um longo tempo. Provavelmente isso ocorre porque as moléculas da lipase podem ser presas em micro-gotas de água retidas nas micelas evitando contato direto com meio orgânico desfavorável. A enantioseletividade ($E>30$, $ee_p = 92,5\%$) foi relativamente alta nos dois sistemas testados. As condições reacionais (temperatura, pH do tampão e concentração de água) também foram estudadas. A conversão máxima (15,7%) foi obtida com pH 6,5, teor de água 0,04%, temperatura 45°C para o sistema com n-hexano. Para reações em sistema de micelas reversas AOT/hexano a conversão máxima (31,87%) foi obtida com pH 7,5, $\omega_0 6$ e temperatura 45°C. Tempo de reação para dois sistemas testados foi de 20 dias.

Esterificação enantiosseletiva do (\pm)-mentol foi realizada por Yuan *et al.*(2005) utilizando lipase de *Candida rugosa* (CRL) em líquidos iônicos (1-butil-3-metil-imidazólio hexafluorofosfato ([BMIM][PF₆]) e 1-butil-3-metil-imidazólio tetrafluoroborato) e solventes orgânicos de hidrofobicidades diferentes. Anidrido propiônico foi empregado como um agente acilante. Como a enzima apresentou maior rendimento de conversão (40,2% e 41%) e enantioseletividade (ee_p (%) 84,5 e 76,5) em [BMIM] [PF₆] e hexano respectivamente em uma reação de 24 h, o trabalho foi focado utilizando esses dois solventes em meios reacionais. Uma comparação da atividade, estabilidade e enantioseletividade da CRL foi realizada através do estudo dos efeitos da razão molar de

substratos, temperatura, tempo de incubação e reutilização da enzima. Verificou-se que o controle da temperatura foi mais crucial no líquido iônico que em hexano para alcançar alta conversão e enantioseletividade da reação. O sistema líquido iônico mostrou uma vantagem de usar anidrido menos ácido para alcançar maior rendimento de conversão de (±)-mentol e melhor enantioseletividade. Além disso, durante uma incubação de 40-60 dias no líquido iônico, atividade da CRL foi 2,5 vezes superior ao seu valor inicial, enquanto que em hexano diminuiu para menos de 60% em dois dias. A enzima também mostrou potencialidade de reuso no líquido iônico. Estas vantagens sugeriram que líquidos iônicos podem ser usados como uma alternativa verde substituindo solventes orgânicos na esterificação enantiosseletiva do (±)-mentol. Cabe salientar que esta etapa de trabalho não teve como objetivo realização de estudos completos sobre a capacidade da enzima obtida de *C. antarctica* conduzir a resolução enantiomérica de (±)-mentol em síntese de mentil acetato sugerindo, desta forma, a continuidade de pesquisa focada para este problema.

4.3 Produção Enzimática de Ésteres a Partir do (±) Linalol



Esquema 4. Reação de esterificação de linalol e anidrido acético.

4.3.1 Otimização de produção de ésteres de linalol

Visando definir o substrato a ser utilizado juntamente com o linalol na reação para a produção enzimática de linalil ésteres (Esquema 4.), um primeiro planejamento

experimental fatorial foi realizado. As variáveis independentes estudadas foram temperatura, concentração de enzima e razão molar ácido (anidrido):álcool.

A Tabela 21 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as conversões em linalil acetato. Cabe salientar que a utilização de ácido oleico e ácido propiônico como substratos para transformação de linalol utilizando Novozym 435 como catalisador não conduziram à formação de produtos.

Tabela 21. Matriz do primeiro planejamento experimental completo com as respostas em termos de conversão em linalil acetato.

Ensaio	T (°C)	RM anidrido/ linalol	[E] (%) (m/m)	Conversão (%)
1	-1 (30°C)	-1 (1:1)	-1 (1%)	0,19
2	1 (70°C)	-1 (1:1)	-1 (1%)	2,58
3	-1 (30°C)	-1 (1:1)	1 (10%)	0,21
4	1 (70°C)	-1 (1:1)	1 (10%)	2,39
5	-1 (30°C)	1 (3:1)	-1 (1%)	0,31
6	1 (70°C)	1 (3:1)	-1 (1%)	1,06
7	-1 (30°C)	1 (3:1)	1 (10%)	0,41
8	1 (70°C)	1 (3:1)	1 (10%)	1,75
9	0 (50°C)	0 (2:1)	0 (5,5%)	1,78
10	0 (50°C)	0 (2:1)	0 (5,5%)	1,55
11	0 (50°C)	0 (2:1)	0 (5,5%)	1,33

A partir desta tabela pode ser observado que maiores conversões foram obtidas em condições de maiores temperaturas.

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada e a análise de efeitos é apresentada no Gráfico de Pareto (Figura 16).

Observou-se em 6 horas de reação (Figura 16) que a temperatura apresentou um efeito significativo ($p < 0,05$) positivo, o que representa que maiores faixas de temperatura conduziram a maiores conversões em ésteres.

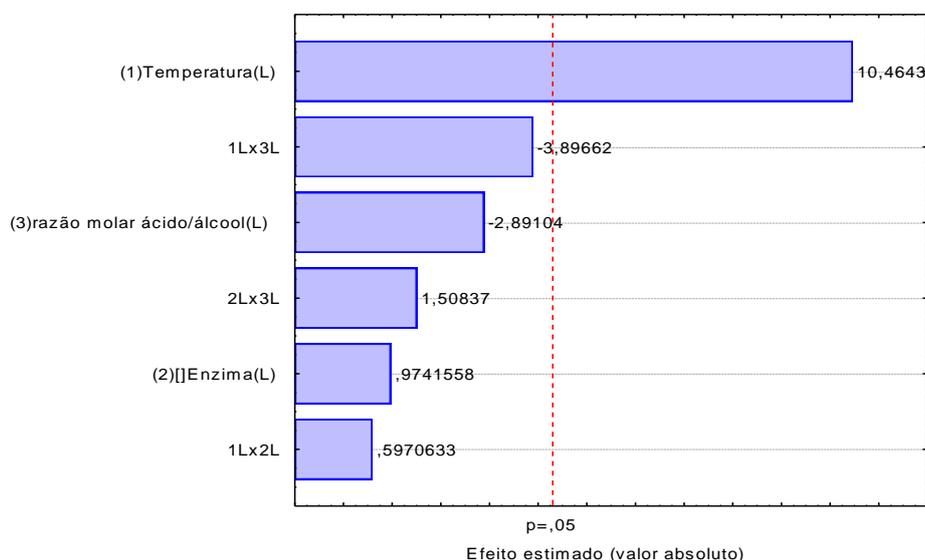


Figura 16. Gráfico de Pareto da produção de linalil acetato (6 horas de reação).

Com base nas conclusões obtidas no primeiro planejamento experimental, um segundo planejamento completo foi realizado, deslocando os níveis das variáveis. Como a temperatura apresentou efeito positivo e temperaturas superiores à 70°C poderiam causar perda da atividade enzimática, optou-se por deslocar os níveis desta variável, tendo como nível inferior 50°C , ponto central 60°C e nível superior, temperatura de 70°C . Em relação à razão molar anidrido:linalol, a literatura (Chaar, 2000) aponta que excesso de anidrido poderia afetar positivamente a conversão do processo. Desta forma, esta variável foi mantida no planejamento e, deslocado os seus níveis para 3:1, 6:1 e 9:1 como nível inferior, central e de nível superior respectivamente, buscando assim, aumentar a conversão do processo. Com base na mesma justificativa, a concentração de enzima, embora não tenha apresentado efeito significativo, foi também mantida e deslocados os seus níveis, buscando aumentar a conversão em linalil ésteres.

Analisando a influência de cada uma das variáveis do primeiro planejamento experimental e visando maximizar a produção enzimática de linalil acetato (em sistema livre e na presença de solvente orgânico) realizou-se um segundo planejamento experimental 2^3 de 8 ensaios e 3 pontos centrais. A Tabela 22 apresenta a matriz do segundo planejamento com os valores reais e codificados das variáveis temperatura, concentração de enzima e razão molar anidrido:álcool com as respectivas respostas em termos de conversão em linalil acetato.

Tabela 22 - Matriz do segundo planejamento experimental completo com as respostas em termos de conversão em linalil acetato.

Ensaio	T (°C)	RM anidrido/linalol	[E] (%) (m/m)	Conversão (%)
1	-1 (50°C)	-1 (3:1)	-1 (5%)	0,6
2	1 (70°C)	-1 (3:1)	-1 (5%)	3,38
3	-1 (50°C)	-1 (3:1)	1 (15%)	0,63
4	1 (70°C)	-1 (3:1)	1 (15%)	3,55
5	-1 (50°C)	1 (9:1)	-1 (5%)	0,5
6	1 (70°C)	1 (9:1)	-1 (5%)	5,44
7	-1 (50°C)	1 (9:1)	1 (15%)	0,91
8	1 (70°C)	1 (9:1)	1 (15%)	0,65
9*	0 (60°C)	0 (6:1)	0 (10%)	1,16
10*	0 (60°C)	0 (6:1)	0 (10%)	0,96
11*	0 (60°C)	0 (6:1)	0 (5,5%)	0,93

*Ponto Central.

A análise preliminar desta tabela permite verificar que condições de maiores temperaturas, em excesso de anidrido acético, com concentrações inferiores de enzima (experimento 6) conduziram a conversões mais elevadas em linalil acetato. De uma forma geral, conversões mais elevadas foram obtidas quando da utilização de temperaturas mais elevadas.

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada e foram calculados os efeitos das variáveis independentes, apresentado na Tabela 23. Observou-se em 6 horas de reação

(Tabela 23) que a temperatura e a concentração de enzima apresentaram respectivamente efeito significativo positivo e negativo ($p < 0,05$) na conversão em linalil acetato. As interações temperatura x concentração de enzima e temperatura x razão molar anidrido:álcool também apresentaram efeito significativo negativo na conversão em ésteres, considerando 95% de confiança. Todos estes efeitos foram levados em consideração no delineamento do terceiro planejamento experimental, realizado.

Tabela 23. Coeficientes de regressão das variáveis na produção enzimática de linalil acetato.

Parâmetro	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	p
Média*	1,70	0,04	0,0005
(1) Temperatura (L)*	2,59	0,09	0,0012
(2) Concentração de enzima (L)*	-1,04	0,09	0,0070
(3) Razão molar anidrido:álcool (L)	-0,16	0,09	0,2029
Interação 1(L) x 2(L)	-1,26	0,09	0,0048
Interação 1(L) x 3(L)	-0,25	0,09	0,1021
Interação 2(L) x 3(L)	-1,14	0,09	0,0059

*efeitos significativos a $p < 0,05$.

Como a temperatura apresentou efeito significativo positivo e temperaturas superiores a 70°C poderiam causar perda da atividade enzimática, optou-se por manter os níveis de estudo desta variável, comparado ao segundo planejamento. Como a concentração de enzima apresentou efeito significativo negativo, a concentração desta variável foi diminuída no terceiro planejamento experimental, tendo em vista o custo do catalisador no processo como um todo. A razão molar anidrido:linalol, não tendo apresentado efeito significativo na segunda etapa, foi mantida constante (1:1).

Analisando a influência de cada uma das variáveis do segundo planejamento experimental e visando maximizar a produção enzimática de linalil acetato realizou-se um

terceiro planejamento experimental completo 2^2 avaliando o efeito da temperatura e da concentração de enzima. A Tabela 24 apresenta a matriz do terceiro planejamento com os valores reais e codificados das variáveis temperatura e concentração de enzima com as respectivas respostas em termos de conversão em linalil acetato. Cabe ressaltar a boa reprodutibilidade dos dados experimentais obtidos no ponto central do planejamento experimental.

Tabela 24. Matriz do terceiro planejamento experimental com as respostas em termos de conversão em linalil acetato.

Ensaio	Temperatura (°C)	[] Enzima (%m/m)	Conversão (%)
1	-1 (50°C)	-1 (1%)	0,8
2	1 (70°C)	-1 (1%)	0,07
3	-1 (50°C)	1 (5%)	0,59
4	1 (70°C)	1 (5%)	3,81
5	0 (60°C)	0 (3%)	1,24
6	0 (60°C)	0 (3%)	1,28
7	0 (60°C)	0 (3%)	1,75

A Tabela 25 apresenta os coeficientes de regressão obtidos. Pode-se observar que a temperatura e a interação concentração de enzima e temperatura apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$).

Tabela 25. Coeficientes de regressão para a produção de linalil acetato.

Parâmetro	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão	p
Média*	1,36	0,11	0,006
Temperatura (L)*	0,62	0,14	0,048
Concentração de enzima (L)*	0,88	0,14	0,0248
Interação 1(L) x 2(L)	0,91	0,14	0,0204

*efeitos significativos a $p < 0,05$.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada, conforme mostrado na Tabela 26, resultando na validação de um modelo empírico codificado para produção de linalil acetato como função da temperatura e da concentração de enzima.

Tabela 26. Análise de variância para a produção de linalil acetato.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	8,56	3	2,85	47,57
Residual	0,18	3	0,06	
Falta de ajuste	0,02	1		
Erro Puro	0,16	2		
Total	8,75	6		

O coeficiente de correlação R obtido foi de 0,99 e o F calculado foi maior que o valor tabelado (9,27), sendo que estes validaram estatisticamente um modelo empírico ($p < 0,05$) para a produção de linalil acetato na faixa investigada e permitiram a construção da superfície de resposta apresentada na Figura 17.

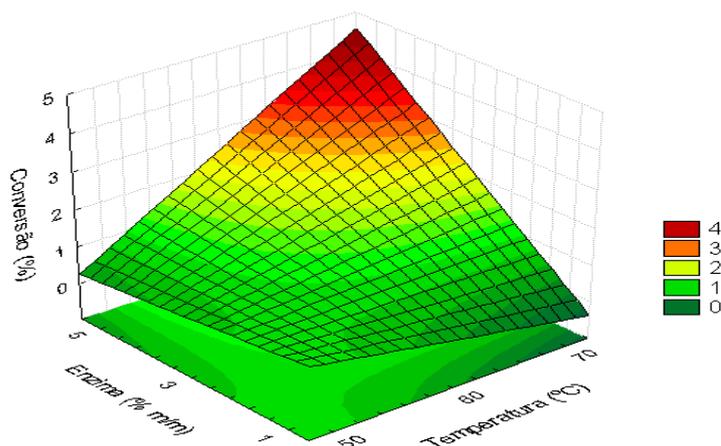


Figura 17. Superfície de resposta ilustrando o efeito da temperatura e da concentração de enzima na produção de linalil ésteres.

Observou-se em 6 horas de reação (Figura 17) que a temperatura e a concentração de enzima apresentaram efeito significativo positivo ($p < 0,05$) na conversão em linalil acetato.

Castro *et al.* (1997) estudaram a síntese de ésteres terpenoides por via enzimática e a influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool terpênico. O estudo foi realizado com ácidos graxos com cadeias alifáticas de diferentes tamanhos, de 2 a 18 carbonos e conversões de 95 a 98% foram alcançados para ácidos contendo 4 ou mais carbonos. Numa segunda série de experimentos, diferentes alcoóis terpênicos foram esterificados com ácido butírico, sendo constatado uma influência marcante da estrutura do álcool terpênico no desempenho desta preparação enzimática. Resultados de esterificação maiores que 95% somente foram obtidos para os alcoóis primários como citronelol, geraniol e nerol. Alcoóis secundários (mentol) e terciários (linalol) não foram esterificados, nas condições testadas.

As condições trabalhadas por Castro *et al.* (1997) na síntese de alcoóis primários, secundários e terciários utilizando uma preparação enzimática com a enzima Lipozyme IM

numa concentração fixa de 10% (m/m) em relação a massa total de reagentes, em batelada (45°C/24h/150rpm) utilizando n-heptano como solvente não resultaram em esterificação para os alcoóis terciários. Para comparação, levando em consideração os estudos realizados no presente trabalho, que mostram o efeito significativo positivo da temperatura na produção de ésteres de linalol, foi relacionado no primeiro planejamento de experimentos o ponto central onde a temperatura é de 50°C, a concentração de enzima 5,5% (m/m) em relação ao substrato e a razão molar anidrido/álcool de 2:1, podendo-se observar que houve produção de linalil ésteres com valores de conversão de até 1,78%.

Chaar (2000) realizou estudos analíticos e a modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans. A reação de acetilação do óleo essencial para formação do éster acetato de linalila foi realizada pela rota do anidrido acético/acetato de sódio. A reação foi realizada com excesso de anidrido acético na razão molar de linalol, anidrido acético e acetato de sódio 1:9:1 sob temperatura de 120°C e pressão atmosférica. A variação da temperatura na reação foi estudada fixando a relação molar 1:9:1 e variando a temperatura de 110° a 150°C em intervalos de 10°C, sob pressão atmosférica.

Segundo Chaar (2000), o linalol presente no óleo essencial reage com o anidrido acético formando o acetato de linalila e o ácido acético, o qual eleva a acidez do meio reacional, reduzindo, assim, a velocidade da reação. Para evitar que isto ocorra, adicionou-se o acetato de sódio que atua como agente tamponante, controlando desta forma a acidez gerada.

Quando Chaar (2000) avaliou a influência da temperatura na produção de acetato de linalila observou que o melhor rendimento da reação (61,8%) foi obtido na temperatura de 130°C, considerando a relação molar de linalol, anidrido acético e acetato de sódio 1:9:1, e que acima de 130°C houve um declínio no rendimento da reação.

Um rendimento de 61,8% sem dúvida é um alto valor, mas considerando a alta faixa de temperatura necessária para alcançar esta conversão, este processo pode se tornar de alto custo. Enquanto isso, a utilização de rotas de produção com catalisadores enzimáticos gera menores custos energéticos de processo.

Martín *et al.* (2007) realizaram um estudo termodinâmico da síntese direta de acetato de linalila a partir de linalol em meio de dióxido de carbono supercrítico. O estudo termodinâmico da reação baseou-se na equação de estado de Peng-Robinson e compreendeu uma análise do equilíbrio de fases no sistema como também do equilíbrio químico. Os autores relataram que a reação é praticamente irreversível em todas as condições de interesse para este processo. Para o estudo de equilíbrio de fases, a pressão operada no reator foi de 15 a 20 MPa para assegurar que a reação proceda em uma única fase. Na operação, pressão e temperatura de 7MPa e 353K, respectivamente, têm sido propostas para a separação da mistura de linalol e acetato de linalila obtida através do reator, conectando o fator de separação entre componente e o gás carregador.

Como o ponto de equilíbrio controla a quantidade de éster formado, o uso de um excesso do ácido carboxílico ou do álcool aumenta o rendimento baseado no reagente limitante. O rendimento de uma reação de esterificação também pode ser incrementado pela remoção de água da mistura reacional assim que é formada. Sendo assim, como aponta a literatura, o excesso de anidrido poderia afetar positivamente a conversão do processo. No presente trabalho, o excesso de anidrido acético não afetou positivamente o rendimento da reação para a produção de acetato de linalila, sendo que maiores conversões foram encontradas em sistemas com razão molar ácido:álcool 1:1. De uma maneira geral foi possível observar que maiores conversões foram obtidas com maiores concentrações de enzima, em temperaturas mais elevadas, na razão molar anidrido:álcool 1:1.

4.4 Produção Enzimática de Ésteres a Partir do Óleo Essencial de citronela

A partir de resultados obtidos em experimentos preliminares foram definidos os sistemas a serem avaliados na etapa de transformação enzimática do óleo essencial de citronela usando ácidos oleico e propiônico como agentes acilantes.

4.4.1 Composição química do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*)

A Figura 18 apresenta o perfil cromatográfico do óleo essencial de citronela, obtido por CG-EM.

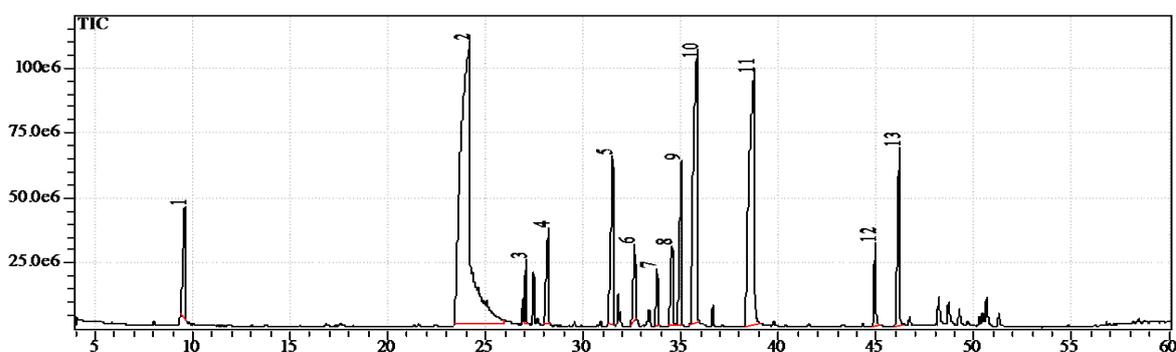


Figura 18. Cromatograma do óleo essencial de citronela.

Na Tabela 27 pode-se observar a composição química do óleo essencial antes do processo de esterificação, apresentando o citrionelal (35,28%) como componente majoritário, seguido do geraniol (21,99%) e citrionelol (10,9%). A análise cromatográfica também demonstrou que a fração majoritária do óleo é formada por monoterpenos oxigenados, correspondendo a 84,45% do total. As concentrações dos compostos de maior interesse (citrionelol e geraniol) foram superiores às reportadas por Baranauskiene *et al.*(2005) que encontrou 8,7% de citrionelol e 16,4% de geraniol. Segundo Marco *et al.*(2007) variações que ocorrem na composição química dos óleos essenciais extraídos das plantas da mesma espécie são comuns e dependem da época e lugar da coleta, espaçamento entre as plantas, altura em que são cortadas e pH do solo, entre outros.

Como as reações de esterificação são favoráveis aos alcoóis primários (Castro *et al.*, 1997) somente as concentrações de geraniol e citronelol foram monitoradas durante os ensaios.

Tabela 27. Composição química do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*).

Número	Nome do composto	Área (%)
1	D-limoneno	2,15
2	Citronelal	35,28
3	Linalol	1,61
4	β – Elemeno	2,83
5	Citronelil acetato	4,41
6	Cedreno	0,76
7	Geranial	1,22
8	Δ – Cadineno	2,80
9	Geranil Acetato	4,52
10	Citronelol	10,93
11	Geraniol	21,99
12	Germacren-4-ol D	1,48
13	Elemol	4,62
	TOTAL	94,6
	Monoterpenos	2,15
	Monoterpenos Oxigenados	84,45
	Sesquiterpenos	6,39
	Sesquiterpenos Oxigenados	6,1

4.4.2 Otimização de produção de citronelil e geranil oleato

Para que as condições de produção de citronelil e geranil oleato fossem otimizadas, utilizou-se a técnica de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta.

Visando avaliar a influência das variáveis independentes na produção de citronelil e geranil ésteres, um planejamento experimental fatorial 2^3 foi realizado. As variáveis estudadas foram temperatura (T), concentração de enzima [E] (m/m substratos) e razão molar (RM) álcool/ácido. A Tabela 28 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as conversões em citronelil e geranil oleatos.

Com a interpretação da Tabela 28, pode ser observado que em 6 horas de reação, foi possível converter alcoóis monoterpênicos (geraniol e citronelol) presentes no óleo essencial bruto nos correspondentes ésteres de ácido oleico. Os maiores rendimentos em citronelil oleato (98,9%) e geranil oleato (82,5%) foram obtidos para razão molar dos reagentes 1:1 e concentração de enzima 10% (ensaio 6).

Tabela 28. Matriz do planejamento experimental 2^3 completo com as respostas em termos de área de citronelil oleato e geranil oleato.

Ensaio	T (°C)	RM óleo/ácido	[E] (%)(m/m)	Conversão (%)	
				Citronelil oleato	Geranil oleato
1	-1 (40)	-1 (1:1)	-1 (1)	86,7	57,1
2	1 (60)	-1 (1:1)	-1 (1)	90,6	75,4
3	-1 (40)	1 (1:5)	-1 (1)	35,7	20,0
4	1 (60)	1 (1:5)	-1 (1)	26,6	22,7
5	-1 (40)	-1 (1:1)	1 (10)	96,6	79,9
6	1 (60)	-1 (1:1)	1 (10)	98,9	82,5
7	-1 (40)	1 (1:5)	1 (10)	41,2	25,0
8	1 (60)	1 (1:5)	1 (10)	31,7	26,6
9	0 (50)	0 (1:3)	0 (5,5)	50,9	37,8
10	0 (50)	0 (1:3)	0 (5,5)	55,3	33,9
11	0 (50)	0 (1:3)	0 (5,5)	53,3	36,1

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada. Para a produção de citronelil oleato os efeitos das variáveis independentes estão apresentados na Tabela 29. Observou-se em 6 horas de reação (Tabela 29) que a razão molar e concentração de enzima tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$) negativo e positivo, respectivamente.

Os dados obtidos permitiram a obtenção de um modelo codificado otimizado para a conversão enzimática de citronelol em função da razão molar, temperatura e concentração da enzima, o qual está apresentado na Equação 7.

Tabela 29. Coeficientes de Regressão das variáveis na produção de citronelil oleato.

Parâmetro	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	p
Média*	60,68	0,66	0,000120
(1) Temperatura (L)	-1,5	0,77	0,194328
(2) Razão molar (L)*	-29,7	0,77	0,000689
(3) Enzima (L)*	3,6	0,77	0,044761
Interação 1(L) x 2(L)	-3,1	0,77	0,056970
Interação 1(L) x 3(L)	-0,25	0,77	0,826185
Interação 2(L) x 3(L)	-0,95	0,77	0,365822

*efeitos significativos a $p < 0,05$.

$$\begin{aligned} \text{Conversão em citronelil oleato (\%)} = & 60,65 - 1,5 * T - 29,7 * RM + 3,6 * [E] - 3,1 * T * RM - \\ & 0,25 * T * [E] - 0,95 * RM * [E] \end{aligned} \quad (7)$$

Onde:

RM - razão molar (óleo essencial/ácido oleico);

[E] - concentração de enzima;

T – temperatura.

Para verificar a validade dos modelos foram realizadas as análises de variância (ANOVA). Resultados referentes à produção de citronelil oleato estão apresentados na Tabela 30.

Verifica-se que o coeficiente de correlação R obtido foi de 0,99 e o F calculado (20,02) foi maior que o valor tabelado (6,16), sendo que estes validaram estatisticamente um modelo empírico ($p < 0,05$) para produção de citronelil oleato na faixa investigada e permitiram a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno em função das variáveis estudadas apresentadas na Figura 19.

Tabela 30. Análise de variância para produção de citronelil oleato.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	7239,14	6	1206,52	20,02
Residual	240,99	4	60,24	
Falta de Ajuste	231,28	2		
Erro Puro	9,70	2		
Total	7480,13	10		

$R=0,99$; $F_{0,05;6;4}= 6,16$

A Figura 19 (a) mostra que altas conversões podem ser atingidas com concentração de enzima 10% e razão molar 1:1. Analisando a interação da temperatura e razão molar (b) observa-se que processo de esterificação pode ocorrer em baixas temperaturas (40°C) mantendo razão molar 1:5. Ao mesmo tempo verificou-se que elevadas concentrações de enzima (10%) e baixas temperaturas (40°C) conduzem ao aumento da produção de citronelil oleato.

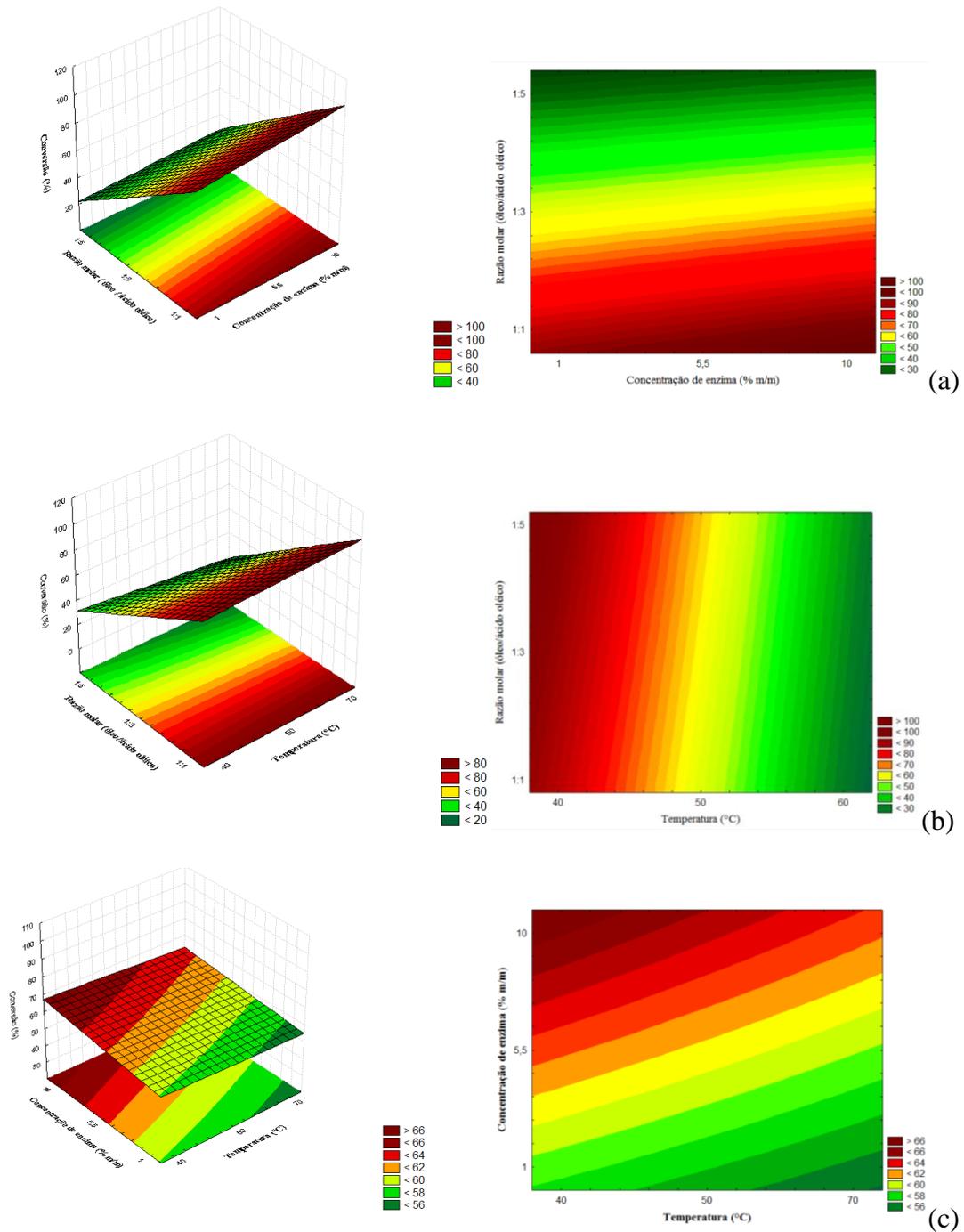


Figura 19. Superfícies de resposta e curvas de contorno para produção de citronelil oleato (a) em função da concentração de enzima e razão molar, (b) em função da temperatura e razão molar, (c) em função da concentração de enzima e temperatura.

Para avaliar a influência das mesmas variáveis na produção de geranil oleato também foram realizadas análises estatísticas. Os efeitos das variáveis independentes estão

apresentados na Tabela 31. Segundo a análise estatística, com 95% de confiança, pode-se afirmar que todas variáveis tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$), sendo que a razão molar apresentou efeito negativo enquanto a concentração de enzima e a temperatura tiveram efeitos positivos.

Tabela 31. Coeficientes de Regressão das variáveis na produção de geranil oleato.

Parâmetro	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	p
Média*	45,19	0,59	0,000171
(1) Temperatura (L)*	3,16	0,69	0,044706
(2) Razão molar (L)*	-25,08	0,69	0,000762
(3) Enzima (L)*	4,86	0,69	0,019726
Interação 1(L) x 2(L)	-2,07	0,69	0,095776
Interação 1(L) x 3(L)	-2,12	0,69	0,092257
Interação 2(L) x 3(L)	-2,63	0,69	0,062850

*efeitos significativos a $p < 0,05$.

Os dados obtidos permitiram a obtenção de um modelo codificado otimizado para a conversão enzimática de geraniol em função da razão molar, temperatura e concentração da enzima, qual está apresentado na Equação 8.

$$\begin{aligned}
 \text{Conversão em geranil oleato (\%)} = & 45,19 + 3,16 * T - 25,08 * RM + 4,86 * [E] - 2,07 * T * RM - \\
 & 2,12 * T * [E] - 2,63 * RM * [E]
 \end{aligned}
 \tag{8}$$

Onde:

RM - razão molar (óleo essencial/ácido oleico);

[E] - concentração de enzima;

T – temperatura.

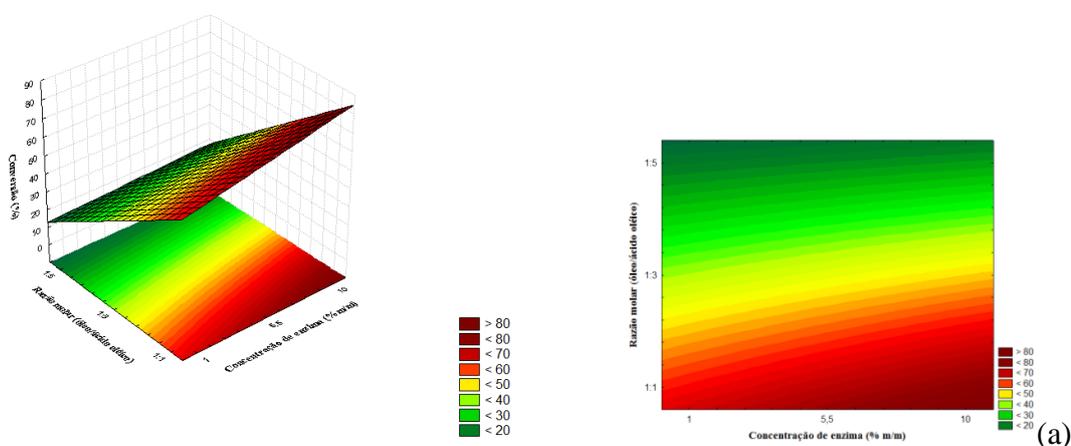
As análises de variância (ANOVA) referentes à produção de geranyl oleato estão apresentadas na Tabela 32. Verificou-se que o coeficiente de correlação obtido (0,99) e o teste F (F calculado (9,36) maior que o F tabelado (6,16) validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,05$) e permitiram a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 20.

Tabela 32. Análise de variância para produção de geranyl oleato.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	5429,15	6	904,85	9,36
Residual	386,69	4	96,67	
Falta de Ajuste	379,01	2		
Erro Puro	7,68	2		
Total	5815,84	10		

R=0,99; $F_{0,05;6;4} = 6,16$.

A razão molar, temperatura e concentração da enzima influenciaram significativamente na conversão dos substratos. Como pode ser observado na Figura 20, nas mais altas concentrações de enzima e temperaturas foram encontradas as maiores conversões, embora a razão molar possa ser mantida 1:1.



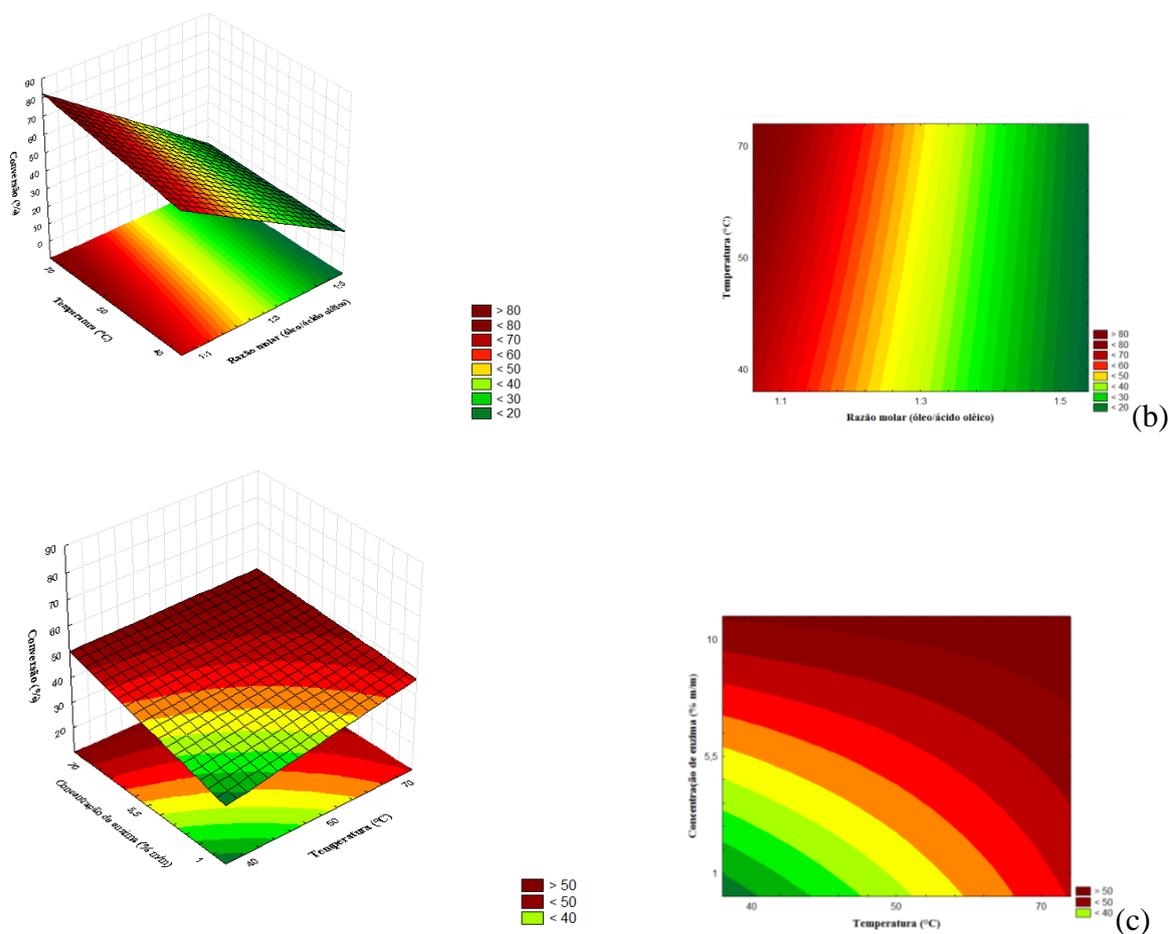


Figura 20. Superfícies de resposta e curvas de contorno para produção de geranyl oleato (a) em função da concentração de enzima e razão molar, (b) em função da temperatura e razão molar, (c) em função da concentração de enzima e temperatura.

Visando a obtenção de geranyl oleato a partir de óleo essencial de citronela, tanto a temperatura como a concentração de enzima devem ser elevadas (60°C e 10%, respectivamente), mantendo uma razão molar entre óleo essencial e ácido oleico (1:1).

4.4.3 Otimização de produção de citronelil e geranyl propionato

A Tabela 33 apresenta os resultados em termos de conversões de geraniol e citronelol em geranyl e citronelil propionatos. A partir desta tabela pode ser observado que o geraniol apresentou maiores taxas de conversão em todos os ensaios. Para os dois

alcoóis, maiores rendimentos foram obtidos com maior concentração de enzima (10%), razão molar óleo essencial/ácido propiônico de 1:1 e temperatura de 60°C, correspondendo à conversões de 92,9% para citronelil propionato e 96,5% para geranil propionato (ensaio 6).

Tabela 33. Matriz do planejamento experimental 2³ completo com as respostas em termos de área de citronelil propionato e geranil propionato.

Ensaio	T (°C)	RM óleo/ácido	[E] (%)(m/m)	Conversão (%)	
				Citronelil propionato	Geranil propionato
1	-1 (40)	-1 (1:1)	-1 (1)	30,26	65,44
2	1 (60)	-1 (1:1)	-1 (1)	55,43	77,91
3	-1 (40)	1 (1:5)	-1 (1)	31,26	66,09
4	1 (60)	1 (1:5)	-1 (1)	26,9	63,94
5	-1 (40)	-1 (1:1)	1 (10)	90,72	95,4
6	1 (60)	-1 (1:1)	1 (10)	92,95	96,51
7	-1 (40)	1 (1:5)	1 (10)	86,77	93,47
8	1 (60)	1 (1:5)	1 (10)	53,78	77,20
9	0 (50)	0 (1:3)	0 (5,5)	63,18	81,60
10	0 (50)	0 (1:3)	0 (5,5)	62,69	81,35
11	0 (50)	0 (1:3)	0 (5,5)	63,25	81,63

Altas conversões em ésteres também foram obtidas no ensaio 5 com temperatura de 40°C e mesmas concentrações de enzima (10%) e razão molar (1:1). Este fato indica que altas conversões podem ser atingidas em temperaturas mais baixas, permitindo economia de energia durante o processo de esterificação.

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada. Observou-se em 6 horas de reação que todas as variáveis tiveram efeitos significativos ($p < 0,05$) na produção de ésteres a partir de citronelol e geraniol. A concentração de enzima apresentou um efeito positivo, e

temperatura e razão molar apresentaram efeitos negativos tanto na produção de geranil propionato como na produção de citronelil propionato.

Os dados obtidos permitiram a obtenção de dois modelos codificados otimizados para a conversão enzimática de citronelol e geraniol em função da razão molar, temperatura e concentração da enzima, os quais estão apresentados nas Equações 9 e 10, respectivamente.

$$\begin{aligned} \text{Conversão citronelil propionato (\%)} = & 59,74 - 1,24 * T - 8,83 * RM + 22,54 * [E] - 8,09 * T * RM - \\ & 6,44 * T * [E] - 1,94 * RM * [E] \end{aligned} \quad (9)$$

$$\begin{aligned} \text{Conversão geranil propionato (\%)} = & 80,05 - 0,60 * T - 4,32 * RM + 11,15 * [E] - 4,00 * T * RM - \\ & 3,18 * T * [E] - 0,99 * RM * [E] \end{aligned} \quad (10)$$

Onde:

RM - razão molar (óleo essencial/ácido propênico);

[E] - concentração de enzima;

T – temperatura.

As análises de variância (ANOVA) referentes à produção de citronelil e geranil propionato estão apresentados nas Tabelas 34 e 35, respectivamente. O coeficiente de correlação obtido (0,99) e o teste F (F calculado em 75,94 para citronelil propionato e em 90,87 para geranil propionato) foram maiores que o F tabelado (6,16) e validaram estatisticamente os modelos ($p < 0,05$).

Tabela 34. Análise de variância para produção de citronelil propionato.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	5589,694	6	931,61	75,94
Residual	49,06	4	12,26	
Falta de Ajuste	48,88	2		
Erro Puro	0,186	2		
Total	5638,760	10		

$$R^2=0,99; F_{0,05;6;4}= 6,16$$

Tabela 35. Análise de variância para produção de geranil propionato.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	1363,80	6	227,30	90,87
Residual	10,00	4	5,50	
Falta de Ajuste	9,95	2		
Erro Puro	0,047	2		
Total	1373,80	10		

$$R^2=0,99; F_{0,05;6;4}= 6,16$$

Considerando a composição química do óleo de citronela observa-se que este possui concentração total de alcoóis de 40,6% (Tabela 27). Destes, os alcoóis primários citronelol (10,9%) e geraniol (21,9%), os quais são majoritários, apresentam alta capacidade de esterificação enzimática, conforme relatado por Castro *et al.* (1997). Para produção de ésteres de ácidos oleico e propiônico, os efeitos negativos da razão molar na esterificação de citronelol e geraniol indicam que altas taxas de produção podem ser mantidas reduzindo a razão molar e, conseqüentemente, permitindo economia dos reagentes. Já um aumento na concentração de enzima pode aumentar os rendimentos das reações estudadas.

Como altas conversões em ésteres foram obtidas usando dois ácidos, tanto em alta como em baixa temperaturas (60 e 40°C) (Tabelas 28 e 33, ensaios 5 e 6) , sugere-se a utilização de temperaturas amenas visando a redução de consumo de energia. Cumpre salientar que na literatura não foram encontrados relatos sobre a esterificação de óleos essenciais brutos, mas alguns trabalhos citam produções de ésteres a partir de geraniol e citronelol. Lipase imobilizada de *Pseudomonas* sp. foi testada para avaliar sua habilidade de catalisar reações de transesterificação de citronelil butirato e geranil caproato em n-hexano. Parâmetros das reações tais como concentração de enzima, concentração dos substratos, adição de água, temperatura, tempo de reação e reutilização de enzima foram testados por Yee *et al.* (1997). Os autores atingiram altos rendimentos das reações com 96% e 99% de conversão para citronelil butirato e geranil caproato, respectivamente, usando concentração de lipase Amano PS de 15%, temperatura entre 30 e 50°C, tempo de reação 24 horas e 2% de água adicional.

4.5 Considerações Finais

Os resultados apresentados neste capítulo visaram avaliar a influência das variáveis no processo e otimizar a produção enzimática de bioaromas a partir de alcoóis monoterpênicos primário (geraniol) secundário (mentol) e terciário (linalol) em sistema livre de solvente orgânico. Os melhores resultados em termos de conversão (>90%) foram obtidos para geraniol e óleo essencial da citronela com ácidos propiônico e oleico. O tempo de reação para a produção dos ésteres foi fixado em 6 horas. Em relação ao estudo cinético realizado, o qual avaliou os efeitos da razão molar ácido: álcool, concentração de enzima (%) (m/m substratos) e temperatura, conversões na ordem de 80% em 30 minutos de reação puderam ser observadas. Não foi possível sintetizar ésteres a partir de alcoóis secundários e terciários (mentol e linalol) usando ácidos propiônico e oleico como

substratos, mas a substituição desses pelo anidrido acético levou à formação dos produtos de interesse. A conversão máxima do (\pm) mentol e (\pm) linalol foram de 49,68% e 5,4% respectivamente, depois de 6 horas de reação.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1. Conclusões

Neste trabalho foi avaliada a viabilidade técnica de reações de sínteses enzimáticas de geranyl oleato, geranyl propionato, mentil acetato, linalil acetato e esterificação de óleo essencial da citronela bem como a influência das variáveis de processo e cinética das reações.

A metodologia analítica se mostrou eficaz na quantificação dos ésteres produzidos pela reação de esterificação utilizando a enzima Novozym 435 como catalisador.

O presente trabalho permitiu avaliar a influência da razão molar álcool:ácido, concentração de enzima e temperatura na conversão do processo.

Sobre as reações enzimáticas com o álcool primário (geraniol), pode-se concluir que as condições otimizadas para produção de ésteres com ácidos oleico e propiônico (> 95%) são: temperatura, 40°C; concentração de enzima, 10% (m/m); razão molar álcool:ácido, 5:1 e 3:1, respectivamente; tempo de reação, 6 horas. Na avaliação do efeito da concentração de enzima na cinética reacional, observou-se que concentração de enzima de 10% m/m em relação aos substratos proporciona rendimentos acima de 90%, em 30 minutos de reação para dois ácidos. Na avaliação do efeito da razão molar na cinética de produção de geranyl oleato, não foi observado aumento do rendimento da reação em função do excesso do geraniol, enquanto que para a síntese de geranyl propionato foi necessário adicionar excesso de álcool (razão molar 5:1) para obter-se rendimento da mesma magnitude (>90%) em 30 minutos de reação. Na avaliação do efeito da temperatura, pode-se concluir que o efeito dessa variável na produção de geranyl oleato foi maior a 60°C quando comparado com a produção geranyl propionato a 40°C, atingindo rendimentos superiores a 90% para os dois ésteres após 1 hora de reação.

Na condição reacional otimizada, foi avaliada a reutilização da enzima por dez ciclos consecutivos de 6 horas. A atividade residual da enzima Novozym 435 foi de cerca de 98% na produção de geranil propionato e geranil oleato.

Para as reações enzimáticas do álcool secundário (mentol), pode-se concluir que este composto necessita de maior tempo de reação e temperaturas mais elevadas em comparação com o álcool primário (geraniol). As condições otimizadas para a produção de mentil acetato (> 45%) são: temperatura, 60°C; concentração de enzima, 10% (m/m); razão molar anidrido:álcool, 5:1; tempo de reação, 6 horas. A avaliação do efeito da razão molar na cinética de produção de mentil acetato mostrou que o melhor rendimento (>45%) é obtido após de 6 horas de reação, com razão molar 1:1, à temperatura de 50°C e concentração de enzima de 5,5% (m/m) em relação ao substrato.

Para reações enzimáticas do álcool terciário (linalol), conclui-se que o linalol apresenta alto impedimento estérico. O maior rendimento ($\approx 6\%$) foi obtido à temperatura mais elevada (70°C), com excesso de anidrido acético (9:1) e concentração de enzima de 5% (m/m) em relação ao substrato, depois de 6 horas de reação.

Nos testes de esterificação de óleo essencial bruto da citronela, demonstrou-se que conversões acima de 90% na produção de ésteres a partir de ácidos oleico e propiônico podem ser obtidas em condições semelhantes: temperatura, 60°C; razão molar óleo essencial:ácido, 1:1; concentração de enzima 10% (m/m) em relação ao substrato.

5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- avaliar outras lipases, incluindo preparações enzimáticas não comerciais, como catalisadores;

- estudar a produção de geranyl propionato e geranyl oleato em processo em regime contínuo;
- avaliar a produção de ésteres a partir de geraniol em temperaturas inferiores a 40°C;
- realizar estudo de viabilidade econômica a respeito da produção de bioaromas a partir de alcoóis monoterpênicos naturais;
- realizar estudo da resolução enantiomérica de (\pm) mentol e (\pm) linalol;
- avaliar, de forma mais aprofundada, a cinética para os diferentes sistemas reacionais;
- desenvolver a modelagem cinética dos dados obtidos, utilizando modelo mecanístico do tipo ping-pong bi-bi;
- avaliar o comportamento da reação de esterificação em meios alternativos, como ultrassom, por exemplo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Zuhair, K.V. Jayaraman, S. Krishnan, W. Hoong Chan. (2006) The Effect of Acid Concentration and Water Content on the Production of Biodiesel by Lipase. **Biochem. Eng. J.** 30: 212-217.

Antunes, A.M. (1999). A importância da gestão para o desenvolvimento biotecnológico em enzimas industriais. In: 4^o Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC. **Anais.** pp. 1-5. Rio de Janeiro, 1999.

Athawale, V.; Manjrekar, N.; Athawale, M. Enzymatic synthesis of chiral menthyl metacrylate monomer by *Pseudomonas cepacia* lipase catalysed resolution of (\pm)-menthol. **J. Mol. Cat. B: Enzymatic.** 16: 169-173.

Baranauskiene, R.; Venskutonis, P. R.; Dewettinck, K.; Verhé, R. (2006). Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. **Food Res. Int.** 39: 413–425.

Barghini, P.; Montebove, F.; Ruzzi, M.; Schiesser, A. (1998). **Optimal conditions for bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by *Pseudomonas fluorescens*.** In: Demian, A.L.; Solomon, N.A. (Ed.) **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.** Washington: American Society for Microbiology. pp 230-247.

Bartling, K.; Thompson, J.U.S.; Pfromm, P.H.; Czermak, P.; Rezac, M.E. (2001). Lipase-catalyzed synthesis of geranyl acetate in n-hexane with membrane-mediated water removal. **Biotechnol. Bioeng.** 75(6): 676-681.

Berger, R.G. (2009). Biotechnology of flavours – the next generation. **Biotechnol. Lett.** 31: 1751-1659.

Biasi A. (2008). Produção enzimática de ésteres de linalol em meio orgânico e em sistema livre de solvente. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada de Alto Uruguai e das Missões. Erechim, RS.

Borzani, W., Schmidell, W.; Lima, U. de A.; Aquarone, E. (2001) **Biotechnologia Industrial – Fundamentos**, v. 1, São Paulo/SP, Ed. Edgard Blücher Ltda, p. 197 – 215.

Brunella, A.; Graf, M.; Kittelmann, M.; Laumen, K.; Ghisalba, O. (1997). Production, purification and characterization of a highly enantioselectiv (S)-N-acetyl-1-phenylethylamine amidohydrolase from *Rhodococcus equi* AC6. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47: 515-520.

Carvalho, P.O.; Campos, P.R.B.; Noffs, M.D.; Oliveira, J.G; Shimizu, M.T.; Silva, D.M. (2003). Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Quim. Nova.** 26(1): 75-80.

Castilho, L.R.; Polato, C.M.S.; Baruque, E.A.; Sant’anna, G.L.; Freire, D.M.G. (2000). Economic analysis of lípase production by *Penicillium restrictum* in solid state and submerged fermentations. **Biochem. Eng. J.** 4: 239-247.

Castro, H.F.; Pereira, E. B.; Anderson, W. A.(1996). Production of terpene ester by lipase in non-conventional media. **J. Braz. Chem. Soc.** 7(4): 1-6.

Castro, H. F.; Oliveira, P. C.; Soares, C. A. F. (1997). Síntese de ésteres terpenoides por via enzimática: Influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciên. Tecnol. Alim.** 17: 197-205.

Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C. (2004). Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quim. Nova.** 27: 146-156.

- Chaar, J. da S. (2000). Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial de espécie *Aniba duckei* Kostermans. **Tese de doutorado**. Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo. São Carlos, SP.
- Chang, S-W.; Shaw, J-F.; Shieh, C-H.; Shieh, C-J. (2006). Optimal formation of hexyl laurate by Lipozyme IM-77 in solvent-free system. **J. Agr. Food Chem.** 54: 7125 - 7129.
- Chartrain, M.; Roberge, C.; Chung, J.; McMamara, J.; Zhao, D.; Olewinski, R.; Hunt, G.; Salmon, P.; Roush, D.; Yamazaki, S.; Wang, T.; Grabowski, E; Buckland, B.; Greasham, R. (1999). Asymmetric bioreduction of (2-(4-nitro-phenyl)-N-(2-oxo-2pyridin-3-yl-ethyl)-acetamide) to its corresponding (R) alcohol (R)-N-(2-hidroxy-2-pyridin-3-yl-ethyl)-2-(4-nitro-phenyl) acetamide by using *Candida sorbophila* MY 1833. **Enzyme Microb. Technol.** 25: 489-495.
- Chatterjee, T.; Bhattacharyya, D.K. (1998). Synthesis of terpene esters by an immobilized lipase in a solvent-free system. **Biotechnol. Lett.** 20(9): 865-868.
- Concerti, A.; del Borghi, A.; Gandolfi, R.; Molinari, F.; Palazzi, E; Perego, E.; Perego, E.; Zilli, M. (2002). Simplified kinetics and thermodynamics of geraniol acetylation by lipophilized cells of *Aspergillus oryzae*. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 216-223.
- Costa, S. A.; Cortez, E.V.; Castro, H. F. (1995). Comparação do desempenho da síntese do butirato de citronila por via química e via enzimática. In: 1º Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEC-IC). **Anais**. pp. 81-84. São Carlos, 1995.
- Daggett, V.; Schroder, S.; Kollman, P. (1991). Catalytic pathway of serine proteases – classical and quantum mechanical. **J. Am. Chem. Soc.** 23: 8926-8935.
- Dalla-Vechia, R.; Nascimento, M.G.; Soldi, V. (2004). Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova.** 27: 623-630.

De, B.K.; Chatterjee, T.; Bhattacharyya, D.K. (1999). Synthesis of Geranyl and citronellyl esters of coconut oil fatty acids through alcoholysis by *Rhizomucor miehei* lipase catalysis. **JAACS**. 76(12): 1501-1504.

Demyttenaere, J.C.R.; Van Belleghem K.; De Kimpe N. (2001). Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. **Phytochem**. 57: 199-208.

Dossat, V; Combes, D.; Marty, A. (2002) Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. **Enzyme Technol**. 30: 90-94.

Dörmo, N.; Bélafi-Bakó, K.; Bartha, L.; Ehrenstein, U. Gubicza, L. (2004). Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fuel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochem. Eng. J.** 21: 229-234.

Du, W.; Xu, Y.; Liu, D.; Zeng, J. (2004). Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **J. Molec. Catal. B: Enzymatic**. 30: 125-129.

Duetz, W.A.; Bouwmeester, H.; Beilen, J.B.; Witholt, B. (2003). Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 61: 269-277.

Fenaroli, G. (1975). **Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients**. 2 ed. CRC Press. pp 46-54.

Fob, S.; Harder, J. (1997). Microbial biotransformation of a tertiary allyl alcohol: Regioselective isomerization of linalool to geraniol without nerol formation. **FEMS Microbiol. Lett**. 28: 6-12.

Gerhard, R. (2004). Industria de alimentos sofisticada produção de aromas. **Disponível (online)** <http://www1.folha.uol.com.br/folha/equilibrio/noticias/ult263u3726.shtml> (4 de fevereiro).

- Garcia, T.; Sanchez, M.; Martinez, M.J. (1999). Optimization of lipase-catalyzed synthesis of 3-hexen-1-yl acetate by direct esterification in hexane and a solvent-free medium. **Enzyme Microb. Technol.** 25: 584, 1999.
- Giri, A.; Dhinger, V.; Giri, C.C.; Sing, A.; Ward, O.P.; Narasu, M.L. (2001). Biotransformation using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. **Biotechnol. Adv.** 19: 175-199.
- Gryglewicz, S.; Jadownicka, E.; Czerniak, A. (2000). Lipase catalysed synthesis of aliphatic, terpene and aromatic esters by alcoholysis in solvent-free medium. **Biotechnol. Lett.** 22: 1379-13982.
- Güvenç, A.; Kapucu, N.; Mehmetoglu, Ü. (2002). The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochem.** 38: 379-386.
- Hasan, F.; Shan, A.A.; Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb. Technol.** 39: 235-251, 2006.
- He, X-L.; Chen, B-Q.; Tan, T-W. (2002). Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl esters of fatty acids by immobilized lipase from *Candida* sp. 99-125. **J. Molec. Catal. B: Enzymatic.** 18: 333-339.
- Heath, C.M.; Imre, R.C.; Jones, J.J.; Rees, M.J.; Robins, K.G.; Verrall, M.S. (1997). Whole cell biotransformation of 5-(4-(2-(2-pyridyl)methylamine) ethoxy) benzyllidenethiazolidine- 2,4-dione to its benzyl derivative using a yeast reductase. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 68: 324-330.
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. **Chem. Rev.** 102: 4501-4523.
- Hill, R.A. (1993) **Terpenoids**. In: Thompson, R.H. (Ed.) **The Chemistry of Natural Product**. London; New York: blackie Academic & Professional; Champan & Hall. pp 106-139.

<http://www.e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=102&word=> (ANVISA)

<http://www.freedom.inf.br/notas-fragrancias-movimentam-mais-que-us-6-bi-1299.asp>

(2010).

Ikeda, Y.; Kurokawa, Y. (2001). Synthesis of geranyl acetate by lipase Entrap – immobilized in cellulose acetate-TiO₂ gel fiber. **JAOCS**. 78(11): 1099-1103.

Illanes S, A. (1994). **Biotecnologia de Enzimas**. Chele: Ediciones Univesitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso. 639 p.

Irimescu, R.; Saito, T.; Kato, K. (2004). Enzymatic kinetic resolution of primary alcohols by direct esterification in solvent-free system. **J. Molec. Catal. B: Enzymatic**. 27: 69-73.

Janssens, L.; De Pooter, H.L.; Schamp, N.M.; Vandamme, E.J.(1992). Production of Flavours by Microorganisms. **Process Biochem**. 27: 195-215.

Jasmani, H.; Basri, M; Razak, C.N.A.; Salleh, A.B.; Ahmad, F.B.H. (2001). Enantioselective esterification of (±)-Menthol with butyric abhydride in hexane by modified lipase from *Candida Rugosa*. **Malasyan J. Analiyt. Scien**. 7(1): 209-212.

Karra-Chaabouni, M.; Pulvin, S.; Touraud, D.; Thomas, D. (1996). Enzymatic synthesis of geraniol esters in a solvent-free system by lipases. **Biotechnol. Lett**. 18(9): 1083-1088.

Karra-Chaabouni, M.; Pulvin, S.; Touraud, D.; Thomas, D. (1998). Parameters affecting the synthesis of geranyl butirate by Esterase 30,000 from *Mucor miehei*. **JAOCS**. 75(9): 1201-1206

Karra-Châabouni, M.; Ghamghi, H.; Bezzine, S.; Rekik, A.;Gargouri, Y. (2006) Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Process Biochem**. 41: 1692-1698.

Kashi, F.J.; Fooladi, J.; Bayat, M. (2007). Application of Biotransformation in Flavor and Fragrance Industry. **Pakistan J. Biol. Sci.** 10: 1685-1690.

Kato, K.; Gong, Y.F.; Tanaka, S.; Katayama, M.; Kimoto, H. (1999). Optimal resolution of 2-(3-indolyl)propionic acid with *Mucor javanicus* and α -chymotrypsin. **Biotechnol. Lett.** 21: 457-461.

Knez, Z.; Habulim, H. (2001). Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review. **J. Supercrit. Fluid.** 23: 29-42.

Kobayashi, T; Nagao T; Kawashima, A.; Watanabe, Y.; Shimada, Y. (2004). Synthesis of polyunsaturated fatty acid L-menthyl esters through lipase-catalyzed esterification in an organic solvent-free system. **J. Oleo Sci.** 53(6): 309-312.

Kumar, R.; Modak, J.; Madras, G. (2005). Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. **Biochem. Eng. J.** 23: 199-202.

Kumar, R.; Madras, G.; Modak, J. (2004). Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide. **Ind. Eng. Chem. Res.** 43: 1568-1573, 2004.

Leak, D.J.; Sheldon, R.A.; Woodley, J.M.; Adlercreutz, P. (2009). Biocatalysts for selective introduction of oxygen. **Biocatal. Biotransform.** 27: 1-26.

Liu, K.J; Huang, Y.R. (2010). Lipase-catalyzed production of a bioactive terpene esters in supercritical carbon dioxide. **J. Biotechnol.** 146: 215-220.

Lynch, R.M.; Woodley, J.M.; Lilly, M.D. (1997). Process design for the oxidation of fluorobenzene to fluorocatechol by *Pseudomonas putida*. **J. Biotechnol.** 58: 167-175.

- Lü, Z.; Chu, Y.; Han, Y.; Wang, Y.; Liu, J. (2005) Enzymatic esterification of DL-menthol with propionic acid by lipase from *Candida cylindracea*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 80: 1365-1370.
- Macrae, A. R.; Hammond, R. C. (1985). Present and future applications of lipases. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.** 3: 193-217.
- Malcata, F. X.; Reyes, H. R.; Garcia, H. S.; Hill, C. G.; Amundson, C.H. (1990). Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A review. **JAOCS.** 67: 890-910.
- Mamuro, I. A.; Chenb, B.; Eguchi, M. Kudo, T.; Surekha, S. (2001). Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **J. Molec. Catal. B-Enzymatic.** 16: 53-58.
- Marco, C. A.; Innecco, R.; Mattos, S. H; Borges, N. S.S.; Nagao, E. O. (2007). Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Hortic. Bras.** 25: 429-432.
- Maróstica, J.M.R. (2006) Biotransformação de terpenos para produção de compostos de aroma funcionais. **Tese de doutorado.** Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.
- Mei-Xiang, W.; Jian-Jun L.; Gai-Jiao J.; Ji-Sheng, L. (2001). Enantioselective biotransformations of racemic 2-aryl-3-methylbutyronitriles using *Rhodococcus* sp. AJ270. **J. Molec. Catal. B: Enzymatic.** 14: 77-83.
- Mirata, M.A.; Wuest, M.; Mosandl, A.; Schrader, J. (2008). Fungal biotransformation of (±)-linalool. **J. Agric. Food Chem.** 56: 3287-3296.
- Monot, F. (1994). La catalyze enzymatique in milieu organique. **Rev. I. Fr. Petrol.** 49(2): 187-208.

Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. (2003). **Harper's Illustrated Biochemistry**, 26 Edição, McGraw-Hill.

Novo Nordisk. (2001). Manual técnico das enzimas Lipozyme IM e Novozym 435.

Noureddini, H; Gao, X.; Philkana, R. S.(2005). Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technol.** 96: 769-777.

Oliveira, D.; Oliveira, J.V. (2000). Kinetics of the enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO₂. **Ind. Eng. Chem. Res.** 39: 4450-4454.

Oliveira, D.; Nascimento Filho, I.; Di Luccio, M.; Faccio, C.; Rosa, C. D.; Bender, J. P.; Lipke, N.; Amroginski, C.; Dariva, C.; Oliveira, J. V.(2005). Kinetics of enzyme-catalyzed alcoholysis of soybean oil in n-hexane. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 124: 231-242.

Oliveira, D.; Di Duccio, M.; Faccio, C.; Rosa, C. D.; Bender, J. P.; Lipke, N.; Amroginski, C.; Menoncin , S.; Oliveira, J. V.(2004). Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 115: 771-780.

Olsen, T.; Kerton, F.; Marriott, R.; Grogan, G. (2006). Biocatalytic esterification of lavandulol in supercritical carbon dioxide using acetic acid as the acyl donor. **Enzyme Microb. Technol.** 39 (4): 621-625.

Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C.R.; Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzyme. **Curr. Sci.** 77: 149-162.

Parmar, A.V.; Kumar, H.; Marwaha, S.S.; Kennedy, J.F. (1998). Recent trends in enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA). **Crit. Rev. Biotechnol.** 18(1): 1-12.

Paula, A. V.; Barbosa, C. S.; Castro. (2005). Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Quim. Nova.** 28: 792-796.

Pereira, R.S. (1995). Fermento biológico de padaria (*Saccharomyces cerevisias*) e seu uso em sínteses assimétricas. **Quim. Nova.** 18(5): 452-459.

Pereira, R.S. (1998). The use of baker's yeast in the generation of asymmetric enters to produce chiral drugs and other compounds. **Crit. Rev. Biotechnol.** 18(1): 25-83.

Peres, C.; Harper, N.; Gomes da Silva, M.D.R.; Barreiros, S. (2003). Water Activity Effects on geranyl acetate synthesis catalyzed by Novozym in supercritical ethane and in supercritical carbon dioxide. **J. Agric. Food Chem.** 51: 1884-1888.

Peres, C.; Harper, N.; Gomes da Silva, M.D.R.; Barreiros, S. (2005). Effect of zeolites on lipase catalyzed esterification in nonaqueous media. **Enzyme Microb. Technol.** 37: 145-149.

Quiroga, E.; Priolo, N.; Marchese, J; Barberis, S. (2005). Stability of *Araujain*, a novel plant protease, in different organic systems. **Acta Farm. Bonaerense.** 24(2): 204-208.

Risch, S.J.; Ho, C. (2000). **Flavor Chemistry: Industrial and Academic Research.** American Chemical Society. Washington, 182p.

Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos.** Editora Casa do Pão, Campinas, Brazil, p. 3.

Roure, F.; Ducret, A.; Trani, M.; Lortie, R. (1997). Enantioselective esterification of racemic ibuprofen in solvent media under reduced pressure. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 69: 266-270.

- Santos J.C.; Bueno T.; Ros P.C.M.; Castro H.F. (2007). Lipase-catalyzed synthesis of butyl esters by direct esterification in solvent-free system. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 82: 956-961.
- Saxena, R.K.; Sheoran, A.; Giri, B.; Davidson, W.S. (2003). Purifications strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Meth.** 52: 1-18.
- Schrader, J.; Etschmann, M.M.W.; Sell, D.; Hilmer, J-M.; Rabenhorst, J. (2004). Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavor compounds – current industrial processes and future prospects. **Biotechnol. Lett.** 26: 463-472.
- Serra, S; Fuganti, C; Brenna, E. (2005). Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends Biotechnol.** 23(4): 193-198.
- Shimada, Y.; Watanabe, Y.; Sugihara, A.; Tominaga, Y. (2002). Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **J. Molec. Catal. B: Enzymatic.** 17: 133-142.
- Shimoni, E.; Ravid, U.; Shoham, Y. (2000). Isolation of *Bacillus* sp. Capable of transforming isoeugenol to vanillin. **J. Biotechnol.** 78: 1-9.
- Singh, M.; Singh, S.; Singh, R.S.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. (2008). Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. **Bioresource Technol.** 99: 2116-2120.
- Stevenson, D.E.; Parkhar, S. G.; Zhang, J.; Stanley, R. A.; Jansen, D.J.; Cooney, J.M. (2007). Combinatorial enzymic synthesis for functional testing of phenolic acid esters catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®). **Enzyme Microb. Technol.** 40: 1078-1086.

- Tachihara, T.; Hashimoto, H; Ishizaki, S.; Komai, T.; Fujita, A.; Ishikawa, M.; Kitahara, T. (2006). Microbial resolution of 2-methylbutyric acid and its application to several chiral flavor compounds. **Dev. Food Sci.** 43: 97-100.
- Tan, Q; Day, D.F.; Cadwallader, K.R. (1998) Bioconversion of (R) – (+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). **Process Biochem.** 33: 29-37.
- Tan, T.; Chen, B-Q.; Ye, H. (2006). Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl palmitate by lipase immobilized on fabric membranes in the batch reactor. **Biochem. Eng. J.** 29: 41-45.
- Todd, S.; Scurr, D. J.; Gough, J. E.; Alexander, M. R.; Ulijn, R.V. (2009). Enzyme-activated RGD ligands on functionalized poly(ethylene glycol) monolayers: surface analysis and cellular response. **Langmuir.** 25(13): 7533-7539.
- Toniazzo G. (2005). Seleção de microrganismos para oxidação de monoterpenos. **Tese de doutorado.** Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ.
- Torres de Pinedo, A.; Peñalver, P.; Rondón, D.; Morales, J.C. (2005). Efficient lipase-catalyzed synthesis of new lipid antioxidants based on a catechol structure. **Tetrahedron Lett.** 61: 7654-7660.
- Tramper, J. (1996). Chemical versus biochemical conversion: when and how to use biocatalysts. **Biotechnol. Bioeng.** 52: 290-295.
- Varma, M. N., Madras, G. (2010) Kinetics of enzymatic synthesis of geranyl butyrate by transesterification in various supercritical fluids. **Biochem. Eng. J.** 49: 250-255.
- Viazzi, P.A.; Furstoss, R. (1996). Microbial transformations 34: enantioselective hydrolysis of a key-lactone involved in the synthesis of the antidepressant Milnacipran®. **Tetrahedron Lett.** 37(26): 4519-4522.

Vidinha, P.; Harper, N.; Micaelo, N. M.; Lourenço, N. M.; Gomes da Silva, M. D. R.; Cabral, J. M. S.; Afonso, C. A. M.; Soares, C. M.; Barreiros, S. (2004). Effect of immobilization support, water activity, and enzyme ionization state on cutinase activity and enantioselectivity in organic media. **Biotechnol. Bioeng.** 85: 442-449.

Villeneuve, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J.; Haas, M. J. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **J. Molec. Catal. B: Enzymatic.** 9: 113-148.

Wang, D,L; Nag, A.; Lee G-C.; Shaw, J-F. (2002). Factors affecting the resolution of *dl*-Menthol by immobilized lipase-catalyzed esterification in organic solvent. **J. Agric. Food Chem.** 50: 262-265.

Warshel, A.; Narayszabo, G.; Sussman, F. (1989). How do serine proteases really work. **Biochem.** 28: 3629-3637.

Widjaja, A.; Yeh, T-H; Ju, Y-H. (2008). Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester. **J. Chin. Inst. Chem. Eng.** 39: 413-418.

Yadav, G.D.; Lathi P.S. (2004). Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies. **J. Molec. Catal. B: Enzymatic.** 27: 113-119.

Yee, L.; Akoh, C.C.; Phillips, R.S. (1997). Lipase PS-catalyzed transesterification of citronellyl butyrate and geranyl capronate: effect of reaction parameters. **JAOCs.** 74(3): 255-260.

Yuan, Y; Bai, S.; Sun, Y. (2006). Comparison of lipase-catalyzed enantioselective esterification of (\pm)-menthol in ionic liquids and organic solvents. **Food Chem.** 97: 324-330.

Zhong-Liu W.; Zu-Yi, L. (2003). Enantioselective biotransformation of α,α -disubstituted dinitriles to the corresponding 2-cyanoacetamides using *Rhodococcus* sp. CGMCC 0497. **Tetrahedron: Asymmetr.** 14: 2133-2142.

Zmijewski, M.J.; Vicezi, J.; Landen, B. E.; Muth, W.; Marler, p.; Anderson, B. (1997). Enantioselective reduction of 3,4-methylene-dioxyphenylacetone using *Candida famata* and *Zygosaccharomyces rouxii*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47: 162-166.

ANEXO