



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

LAYANE DA SILVA CORRÊA

**SÍNTESE DE ÉSTERES DE GERANIOL E CITRONELOL VIA
CATÁLISE ENZIMÁTICA**

**FLORIANÓPOLIS, SC
2018**

Layane da Silva Corrêa

SÍNTESE DE ÉSTERES DE GERANIOL E CITRONELOL VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA

Dissertação submetida ao Programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, na Área de concentração de desenvolvimento de processos químicos e biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
Coorientadora: Dr^a. Rosana Oliveira
Henriques

Florianópolis, SC
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Corrêa, Layane da Silva

Síntese de Ésteres de Geraniol e Citronelol via Catálise Enzimática / Layane da Silva Corrêa orientador, Agenor Furigo Jr ; coorientadora, Dr^a .Rosana Oliveira Henriques. Florianópolis, SC, 2018.

89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. ésteres de aroma. 3. esterificação. 4. enzimas. 5. lipase. I. Furigo Jr., Agenor. II. Henriques, Rosana Oliveira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Layane da Silva Corrêa

**SÍNTESE DE ÉSTERES DE GERANIOL E CITRONELOL VIA
CATÁLISE ENZIMÁTICA**

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

Florianópolis, 06 de novembro de 2018.

Prof^a. Cintia Soares, Dr^a.
Coordenadora do Curso

Prof. Agenor Furigo Jr., Dr.
Orientador

Rosana Oliveira Henriques, Dr.^a
Coorientadora

Banca Examinadora:

Prof^a. Daiana Cardoso de Oliveira, Dr^a

Prof. Cristiano José de Andrade, Dr.

"A única coisa que se coloca entre um homem e o que ele quer na vida é normalmente meramente a vontade de tentar e a fé para acreditar que aquilo é possível".

(Richard M. Devos)

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer realização, é necessário primeiramente sonhar. Junto com o sonho, o esforço, o estudo, a dedicação, a ousadia e a vontade de vencer fizeram com que hoje este objetivo deixasse de ser sonho e se tornasse realidade. Porém, sozinha talvez eu não conseguisse chegar até aqui. Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Grata a Deus pelo dom da vida, pela luz que sempre pôs no meu caminho e pela força para seguir em frente.

Aos meus pais, pelo apoio incansável, incentivos e orientações para que eu procurasse seguir o caminho correto.

Aos meus irmãos Patrick e Pedro pela convivência feliz, auxílios e desentendimentos que nos tornam ainda mais irmãos.

Ao meu noivo e melhor amigo, Ricardo, por tanta paciência e atenção principalmente quando, por causa dos afazeres eu não pude retribuí-lo. Obrigada por alimentar minhas forças e coragens.

Aos avós, tios e primos que sempre estiveram presentes, mesmo que à distância.

Aos professores da Universidade Federal de Santa Catarina pela contribuição através de suas experiências. Em especial aos orientadores e coorientadores, Dr. Agenor Furigo Jr., Dra. Débora de Oliveira, Dra. Rosana Henriques Oliveira e Dr. Lindomar Lerin que, com muita atenção e boa vontade, dedicaram seus valiosos tempos para me orientar a cada passo desta dissertação.

A CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao Laboratório LiEB, pelo apoio e infraestrutura para com o desenvolvimento e a conclusão deste projeto. Aos colegas do laboratório, agradeço pelos apoios diários, palavras de carinho e convivência leal, principalmente, àqueles que se tornaram grandes amigos.

RESUMO

Os ésteres terpênicos são tradicionalmente produzidos por métodos como extração ou síntese química, apresentando desvantagens como baixo rendimento, uso de ácidos como catalisadores e formação de subprodutos. Como uma alternativa, o uso de enzimas como catalisadores fornece produtos mais puros e condições reacionais brandas. Assim, este trabalho teve como objetivo a síntese de ésteres terpênicos derivados de geraniol e citronelol através de reações de esterificação catalisadas pelas lipases imobilizadas comerciais de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-IM®) e de *Candida antarctica* (Novozym 435®). Foram estudadas a cinética e as melhores condições reacionais para as sínteses, comparando os resultados obtidos com cada uma das lipases. O geraniol e o citronelol foram esterificados com os ácidos oleico, acético, láurico e esteárico. Para todos os ésteres sintetizados, as melhores condições foram 35 °C e razão molar ácido para álcool de 1:1. Todos os ésteres sintetizados atingiram conversões entre 80-100% com ambas as enzimas estudadas em até 4h de reação. Para síntese do oleato de citroneíla e geraniíla, não foi necessário utilizar solventes orgânicos, uma vez que se obteve melhores rendimentos na ausência destes. Para os ésteres formados a partir dos ácidos láurico e esteárico, o uso de solvente foi indispensável para melhorar a miscibilidade entre os substratos. A reutilização da Novozym 435® e da Lipozyme TL-IM® foi realizada por mais dois ciclos após o primeiro uso, mantendo sua atividade catalítica preservada na maioria dos casos, com rendimentos superiores a 60%. Os resultados demonstraram a eficiência da reação catalisada pelas duas enzimas comerciais, sendo possível obter novos ésteres de aroma sintéticos com elevados rendimentos através da catálise enzimática. Por fim, foram realizados testes preliminares para a síntese dos ésteres estudados, utilizando a lipase *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em nanopartículas magnéticas NPM-TLL, com resultados iniciais promissores.

Palavras-chave: ésteres de aroma, esterificação, enzimas, lipase.

ABSTRACT

Terpenic esters are traditionally produced by methods such as extraction or chemical synthesis, has drawbacks such as low yield, use of acids as catalysts and formation of by-products. As an alternative, the use of enzymes as catalysts provides purer products and mild reactional conditions. The objective of this work was synthesized terpenic esters derived from geraniol and citronellol through esterification reactions catalyzed by the immobilized lipases from *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM[®]) and *Candida antarctica* (Novozym 435[®]). Geraniol and citronellol were esterified with oleic, acetic, lauric and stearic acids. For all the synthesized flavor esters, the best conditions were 35 °C, and the molar ratio between acid and alcohol was 1:1. Geranyl and citronellyl esters reached yields between 80-100% within 4 h of reaction. For the synthesis of the citronellyl and geranyl oleate, higher yields were obtained in the absence of organic solvents. For the esters from lauric and stearic acids, using solvent was indispensable to improve the miscibility between the substrates. The reuse of Novozym 435[®] and Lipozyme TL-IM[®] was performed for two more cycles after the first use, with yields higher than 60%. The results demonstrated the efficiency of the reaction catalyzed by these two commercial enzymes and the feasibility of the methodology for the production of synthetic flavor esters through enzymatic catalysis. The flavor esters synthesized were not described in literature up to the date, giving this research an innovative feature. Finally, preliminary tests were performed for the synthesis of the esters studied, using the lipase of *Thermomyces lanuginosus* immobilized on NPM-TLL magnetic nanoparticles, with promising initial results.

Keywords: flavors, terpenic esters, geraniol, citronellol, lipase.

LISTA DE ABREVIACÕES

- PVA:CH – Copolimerização: lcool polivinilico e quitosana
SBA - Silicato nanoestruturado
SC-CO₂ – Dióxido de carbono supercrítico
TLL - lipase de *Thermomyces lanuginosus*
NPM – Nanopartículas de magnetita
NPM-TLL - lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄
SDS – Lauril sulfato de sódio
NPM-SDS – Nanopartículas de magnetita funcionalizadas com Lauril sulfato de sódio
βGal - β-D-galactosidase de *Kluyveromyces lactis*
CRL - lipase de *Candida rugosa*
AA – cido acético
AnA – Anidrido acético
p-NPB - Butirato de p-nitrofelina
p-NP – p-Nitrofenol

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1: TERPENOS ENCONTRADOS NA NATUREZA: 1 LINALOL, 2 TERPINEN-4-OL, 3 CARVACROL E 4 P-CIMENO..... | 26 |
| FIGURA 2: REAÇÃO GERAL PARA ESTERIFICAÇÃO | 28 |
| FIGURA 3: REAÇÃO GERAL DE ESTERIFICAÇÃO COM ANIDRIDO | 28 |
| FIGURA 4: REAÇÃO GERAL PARA TRANSESTERIFICAÇÃO | 29 |
| FIGURA 5: ESTRUTURA DE FORMAS ABERTAS E FECHADAS DE TLL | 31 |
| FIGURA 6: CLASSIFICAÇÃO DE MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS | 33 |
| FIGURA 7: REAÇÕES PARA SÍNTESE DOS ÉSTERES DE GERANIOL E CITRONELOL | 40 |
| FIGURA 8: SÍNTESE DAS NPM:SDS | 45 |
| FIGURA 9: NPM-SDS SOB INFLUÊNCIA DE UM CAMPO MAGNÉTICO | 45 |
| FIGURA 10: RENDIMENTO EM ÉSTERES DE GERANOÍLA E CITRONEÍLA PARA REAÇÕES CATALISADAS PELAS ENZIMAS LIPOZYME TL-IM® E NOVOZYM 435® | 50 |
| FIGURA 11: INFLUÊNCIA DOS SOLVENTES ORGÂNICOS HEXANO E ISO-OCTANO NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE OLEATO DE GERANOÍLA (A) E OLEATO DE CITRONEÍLA (B). | 53 |
| FIGURA 12: INFLUÊNCIA DOS SOLVENTES ORGÂNICOS HEXANO E ISO-OCTANO NAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO..... | 54 |
| FIGURA 13: EFEITO DA TEMPERATURA NOS ÉSTERES DE GERANIOL..... | 58 |
| FIGURA 14: EFEITO DA TEMPERATURA NOS ÉSTERES DE CITRONELOL ... | 59 |
| FIGURA 15: COMPARATIVO DE CONVERSÕES EM ÉSTERES DE GERANIOL PARA DIFERENTES RAZÕES MOLARES ENTRE OS REAGENTES..... | 61 |
| FIGURA 16: COMPARATIVO DE CONVERSÕES EM ÉSTERES DE CITRONELOL PARA DIFERENTES RAZÕES MOLARES. | 62 |
| FIGURA 17: COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES QUANTIDADES DE DERIVADOS ENZIMÁTICOS NAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO..... | 63 |
| FIGURA 18: CINÉTICA DOS ÉSTERES NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE REAÇÃO. | 67 |
| FIGURA 19: ENSAIOS DE REUSO ENZIMÁTICO. | 71 |
| FIGURA 20: SUPORTES NPM-SDS EM SUSPENSÃO | 75 |
| FIGURA 21: SUPORTES NPM-SDS SECAS | 75 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1: COMPOSTOS MONOTERPÊNICOS E SUAS PROPRIEDADES ORGANOLÉPTICAS | 27 |
| TABELA 2: BIOCATALISADORES INDUSTRIAIS IMPORTANTES | 30 |
| TABELA 3: PUBLICAÇÕES DE SÍNTESE DE ÉSTERES DE GERANIOL COM LIPASE IMOBILIZADA..... | 35 |
| TABELA 4: PUBLICAÇÕES DE SÍNTESE DE ÉSTERES DE CITRONELOL COM LIPASE IMOBILIZADA..... | 37 |
| TABELA 5: CONVERSÃO EM ACETATO DE CITRONEÍLA UTILIZANDO ÁCIDO ACÉTICO (AA) E ANIDRIDO ACÉTICO (ANA), NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DAS ENZIMAS LIPOZYME TL-IM® E NOVOZYM 435® ... | 51 |
| TABELA 6: RELAÇÃO ENTRE A MELHOR QUANTIDADE DE DERIVADO ENZIMÁTICO E ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO..... | 66 |
| TABELA 7: RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SOBRENADANTE | 76 |
| TABELA 8: ATIVIDADE HIDROLÍTICA | 77 |
| TABELA 9: REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO VIA CATÁLISE NPM-TLL..... | 78 |
| TABELA 10: REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA NPM-TLL COM BAIXAS CONVERSÕES..... | 79 |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO GERAL | 23 |
| 1.1 | OBJETIVO GERAL | 24 |
| 1.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 24 |
| 2. | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 25 |
| 2.1 | ÉSTERES | 25 |
| 2.1.1 | <i>Ésteres terpênicos</i> | 25 |
| 2.1.2 | <i>Reações de esterificação</i> | 28 |
| 2.1.3 | <i>Reações de transesterificação</i> | 29 |
| 2.2 | ENZIMAS | 29 |
| 2.2.1 | <i>Lipases</i> | 30 |
| 2.3 | IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS | 31 |
| 2.3.1 | <i>Métodos de imobilização</i> | 32 |
| 2.3.2 | <i>Lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas</i> ... | 33 |
| 2.4 | SÍNTESE DE ÉSTERES COM GERANIOL CATALISADAS POR ENZIMAS IMOBILIZADAS | 34 |
| 2.5 | SÍNTESE DE ÉSTERES DE CITRONELOL CATALISADAS POR ENZIMAS IMOBILIZADAS | 37 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODOS | 39 |
| 3.1 | MATERIAIS | 39 |
| 3.2 | MÉTODOS | 39 |
| 3.2.1 | <i>Reações de esterificação</i> | 40 |
| 3.2.1.1 | Influência dos solventes orgânicos nas reações de esterificação..... | 42 |
| 3.2.1.2 | Tempo de reação | 42 |
| 3.2.1.3 | Efeito da temperatura nas reações de esterificação | 42 |
| 3.2.1.4 | Estudo do efeito da razão molar entre os reagentes na formação de ésteres | 43 |
| 3.2.1.5 | Efeito da concentração de biocatalisador nas reações de esterificação..... | 43 |
| 3.2.2 | <i>Cinética das reações de esterificação</i> | 43 |
| 3.2.3 | <i>Quantificação dos ésteres</i> | 43 |
| 3.2.4 | <i>Recuperação e reutilização do biocatalisador em reações consecutivas</i> | 44 |
| 3.2.5 | <i>Reações de esterificação utilizando lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas</i> | 44 |
| 3.2.5.1 | Síntese dos suportes de NPM-SDS | 44 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.5.2 | Imobilização da lipase TLL no suporte NPM-SDS | 46 |
| 3.2.5.3 | Determinação do teor de proteínas | 46 |
| 3.2.5.4 | Determinação da atividade hidrolítica | 47 |
| 4. | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 49 |
| 4.1 | SÍNTESE DOS ÉSTERES DE GERANOÍLA E CITRONEÍLA . | 49 |
| 4.1.1 | <i>Influência dos solventes orgânicos nas reações de esterificação.....</i> | <i>52</i> |
| 4.1.2 | <i>Efeito da temperatura nas reações de esterificação... 56</i> | |
| 4.1.3 | <i>Efeito da razão molar dos substratos nas reações de esterificação.....</i> | <i>60</i> |
| 4.1.4 | <i>Efeito da concentração de derivado enzimático nas reações de esterificação.....</i> | <i>63</i> |
| 4.2 | CINÉTICAS PARA AS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO... 67 | |
| 4.3 | REUTILIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR EM REAÇÕES CONSECUTIVAS | 71 |
| 4.4 | REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO LIPASE IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS | 74 |
| 4.4.1 | <i>Síntese dos suportes de NPM-SDS.....</i> | <i>74</i> |
| 4.4.2 | <i>Quantidade de proteínas imobilizadas</i> | <i>76</i> |
| 4.4.3 | <i>Determinação da atividade hidrolítica.....</i> | <i>76</i> |
| 4.4.4 | <i>Síntese de ésteres via catálise enzimática NPM-TLL .</i> | <i>78</i> |
| 5. | CONCLUSÕES | 81 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
| | APÊNDICES..... | 93 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

Ésteres de álcoois e ácidos graxos são amplamente aplicáveis em indústrias alimentícias e de cosméticos, principalmente como emulsificantes, aromatizantes e fragrâncias. Enquanto ésteres de baixa massa molecular são usados frequentemente como perfumes e fragrâncias, os ésteres de alta massa molecular encontram aplicações como lubrificantes, emulsificantes e aromatizantes aplicáveis também às indústrias farmacêuticas (VARMA; MADRAS, 2010).

Tradicionalmente, esses compostos são isolados de vegetais por meio de extração ou produzidos por reações catalisadas por métodos químicos, envolvendo ácidos fortes. O primeiro caminho normalmente torna-se um processo com alto custo de produção comercial, tendo em vista um baixo rendimento de produto puro. Enquanto isso, o segundo caminho citado trata-se de um processo não específico que requer purificação futura (TRUSEK-HOLOWNIA; NOWORYTA, 2007).

Desta forma, a utilização de processos industriais com catalisadores enzimáticos vêm crescendo e sendo estabelecidos. Devido a maior especificidade, as enzimas requerem condições brandas de reação e também permitem processos menos agressivos do ponto de vista ambiental. Além disto, pelo uso de catálise enzimática, o custo de produção é reduzido, pois não há formação de subprodutos, reduzindo assim os gastos com processos de purificação (GUPTA et al., 2013).

As lipases são amplamente utilizáveis em processos de hidrólise de triglicerídeos, na síntese de ésteres em meios orgânicos, entre outras aplicações. No entanto, ao trabalhar com lipases livres, algumas restrições são encontradas como: a enzima pode ser facilmente inativada, apresenta baixa estabilidade operacional, além de difícil reutilização (TANG et al., 2017). Portanto, as técnicas de imobilização de enzimas surgem como alternativa para resolver tais inconvenientes. Por meio de sua imobilização, permite-se que a enzima seja recuperada e reutilizada, promovendo uma maior estabilidade operacional em relação à enzima livre, tornando sua aplicação como biocatalisador economicamente viável (LIGIANARA et al., 2016).

Os ésteres formados a partir de geraniol são comercialmente muito importantes porque estão presente na grande maioria dos óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas (MURCIA et al., 2018). Além de sua importância industrial como aroma e fragrância, estes possuem propriedades anti-microbianas, imunoestimulantes e atuam como agente de agrotóxicos com baixa toxicidade (ADENUBI et al., 2018). Já os

ésteres a partir de citrionelol, são muito estudados pela sua propriedade ativa como repelentes e pesticidas naturais (TAVARES et al., 2018).

A literatura acerca de sínteses enzimáticas de ésteres terpênicos via catálise enzimática, alguns trabalhos são encontrados. Porém há poucos dados que tratam das sínteses de laurato de geranoíla, oleato de geranoíla e citroneíla, estearato de geranoíla e citroneíla.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta dissertação foi sintetizar enzimaticamente ésteres derivados de geraniol e citrionelol a partir de diferentes ácidos graxos.

Para tais sínteses, almejou-se otimizar as condições de reação realizando estudos cinéticos, comparando as enzimas comerciais imobilizadas Lipozyme TL-IM[®] de *Thermomyces lagunosus* e Novozym 435[®] de *Candida antarctica*, bem como verificar o reuso destas enzimas. Adicionalmente, realizou-se testes para produção dos mesmos ésteres, utilizando a enzima lipase de *Thermomyces lagunosus* imobilizada em suportes de magnetita (NPM-TLL), como biocatalisador.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar os ésteres derivados de geraniol e citrionelol via catálise enzimática, a partir dos ácidos oleico, láurico, esteárico, acético e anidrido acético;
- Verificar a influência da temperatura, solvente orgânico, razão molar, carga enzimática e tipo de lipase comercial imobilizada nas reações de esterificação estudadas;
- Reutilizar as enzimas comerciais imobilizadas em novos ensaios verificando as conversões atingidas em cada reuso;
- Produzir nanopartículas de magnetita (NPM) e aplicá-las como suporte para a imobilização da enzima lipase TLL;
- Sintetizar os ésteres terpênicos estudados utilizando o derivado NPM-TLL como biocatalisador.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÉSTERES

Os ésteres são compostos orgânicos derivados de ácidos carboxílicos. Eles possuem um radical carbônico no lugar do hidrogênio dos ácidos carboxílicos. Encontram-se em diversas essências de frutas, sendo constituídos, nesses casos, de ácidos monocarboxílicos de baixa massa molecular e álcoois superiores (CAMPOS et al., 1979).

Os ésteres são sintetizados, normalmente, por meio de reação de álcoois, ou de fenóis, com ácidos carboxílicos ou derivados deles (MORRISON; BOYD, 1983). A síntese de ésteres é dada por vários métodos, entre eles, esterificação direta e transesterificação.

2.1.1 Ésteres terpênicos

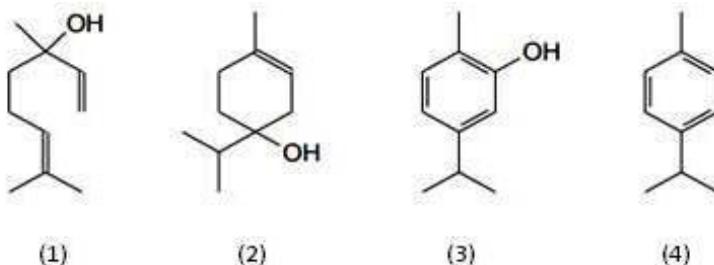
Os ésteres de terpeno são sintetizados a partir de esterificações de álcoois terpenóis com ácidos carboxílicos ou anidridos e são tradicionalmente catalisados por ácidos inorgânicos fortes, tais como H_2SO_4 e H_3PO_4 . No entanto, esses ácidos costumam ser altamente corrosivos e apresentam característica de contaminação, sendo então difíceis de reciclar (TAO et al., 2016). Outra forma de obtê-los é a partir de fontes naturais, como óleos essenciais de plantas. Nesse caso, pode ser realizada a destilação de arraste de vapor, seguida de técnicas de destilação fracionada. Porém, a destilação por arraste de vapor resulta em baixa concentração dos compostos desejados, tornando-se um processo caro (BEN; GARGOURI, 2015).

A partir disso, as lipases tornaram-se uma das ferramentas mais populares na biocatálise moderna, devido à sua capacidade de utilizar um amplo espectro de substratos em meios aquosos e não aquosos (BIAŁECKA-FLORJA et al., 2012). A lipase é uma enzima versátil, robusta e frequentemente usada, pois pode ser facilmente produzida em grandes quantidades. Além disso, a reação enzimática produz "produto natural", em termos de sua origem, que é de grande importância, especialmente na indústria de alimentos (DAMNJANOVIC et al., 2012).

Os compostos terpenóides são também conhecidos como isoprenóides por possuírem em sua estrutura esqueletos de 10 carbonos formados a partir do acoplamento molecular de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (LAKOUD; DJEROUROU, 2016). A Figura 1, apresenta exemplos de terpenos encontrados na natureza. Estes são produzidos por plantas, animais e micro-organismos (WEBER, 2016).

Ésteres terpênicos derivados de ácidos graxos de cadeia curta fazem parte do leque de óleos essenciais com aplicações significativas em indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica. São normalmente utilizados como fragrâncias e aromatizantes (MOHAMAD et al., 2015). Como exemplo podemos citar o acetato de citreoneila e o propionato de citreoneila que são usados em perfumaria para um aroma frutado e fresco (YOU et al., 2011).

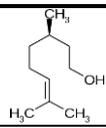
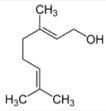
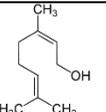
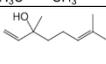
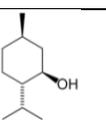
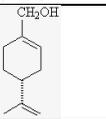
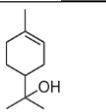
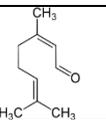
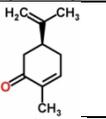
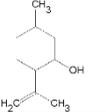
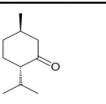
Figura 1: Terpenos encontrados na natureza: 1 linalol, 2 terpinen-4-ol, 3 carvacrol e 4 p-cimeno



Fonte: WEBER (2016).

Vários álcoois e aldeídos terpênicos são utilizados como aromatizantes, normalmente quando diluídos apresentam aroma floral ou cítrico. Diferentes propriedades organolépticas podem ser atribuídas ao mesmo composto dependendo, por exemplo, da sua concentração. Alguns compostos monoterpênicos utilizados na indústria de fragrâncias e aromas estão relacionados na Tabela 1(PAROUL).

Tabela 1: Compostos monoterpênicos e suas propriedades organolépticas

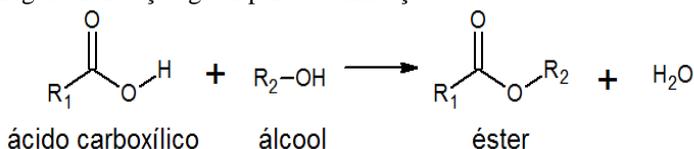
| Composto | Estrutura | Propriedades organolépticas |
|---------------------|---|--|
| Citronelol |  | Refrescante, suave, aroma de rosa, sabor amargo. |
| Geraniol |  | Aroma de rosa, doce, quente, seco. |
| Nerol |  | Refrescante, doce, aroma de rosas. |
| Linalol |  | Suave, doce, frutas cítricas,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

Fonte: PAROUL, (2011).

2.1.2 Reações de esterificação

Os ácidos carboxílicos reagem com os álcoois e formam ésteres por uma reação conhecida como esterificação (SOLOMONS, 1996). A reação direta de álcoois com ácidos carboxílicos é uma reação de equilíbrio, para deslocá-la no sentido de formação de produtos, são necessárias condições especiais (MORRISON; BOYD, 1983). A fórmula geral da reação segue de acordo com a Figura 2:

Figura 2: Reação geral para esterificação

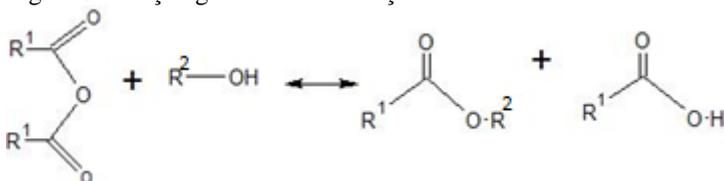


Fonte: SOLOMONS, (1996).

As reações de esterificação normalmente precisam ser catalisadas, pois na ausência de catalisadores as reações se tornam muito lentas. Tradicionalmente esta catálise é feita por meio de ácidos fortes. (SOLOMONS, 1996). Por esta razão, novos métodos, envolvendo catálise enzimática, vêm sendo estudados para substituir o uso destes catalisadores tradicionais.

Outra forma de esterificação bastante utilizada é a reação de anidridos de ácidos com álcoois, conduzindo a formação de ésteres, como mostra a Figura 3 (CAMPOS et al., 1979).

Figura 3: Reação geral de esterificação com anidrido



Fonte: CAMPOS et al., (1979).

A reação de um álcool com um anidrido é considerado o melhor método para obtenção de um éster (SOLOMONS, 1996), tendo preferência para produção em laboratório tendo em vista a menor complexidade de esterificar, devido a sua maior reatividade comparado aos ácidos carboxílicos (MORRISON; BOYD, 1983). Entretanto, nesta

reação há a formação de um subproduto, um ácido carboxílico derivado do anidrido, o qual precisaria ser removido para obtenção do éster puro.

2.1.3 Reações de transesterificação

Ésteres também são sintetizados por transesterificação, a partir de outros ésteres, por um mecanismo semelhante ao da esterificação catalisada por ácido (SOLOMONS, 1996). Desta forma, um éster reage com um álcool de interesse, apresentando a substituição nucleófila típica dos derivados de ácidos carboxílicos, são atacados produzindo a substituição do grupo $-OR^1$ por $-OR^2$, conforme mostra a Figura 4 (MORRISON; BOYD, 1983).

Figura 4: Reação geral para transesterificação



Fonte: MORRISON; BOYD (1983).

2.2 ENZIMAS

Enzimas são moléculas orgânicas de natureza proteica que frequentemente apresentam atividade catalítica. As proteínas são heteropolímeros formados por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. A ação catalítica das enzimas se faz, como a dos catalisadores inorgânicos, reduzindo a energia de ativação da reação, sem alteração do seu equilíbrio termodinâmico (BORZANI et al., 2001).

O interesse industrial em enzimas deve-se a obtenção de produtos de melhor qualidade que o tradicional, permitindo melhorias no processo, reduzindo custos e possibilitando a produção de substâncias que não são facilmente disponíveis ou somente dispõe-se em pequenas quantidades (BORZANI et al., 2001). As principais indústrias que utilizam enzimas são: farmacêutica, alimentícia, cosmética, têxtil e de papel/celulose (CHOI; HAN; KIM, 2015), sendo as enzimas de maior interesse industrial as proteases, amilases, renina bovina, glicamilase, glicose-isomerase, renina microbiana, pectinase, pancreatina, papaína, lipase, entre outras (BORZANI et al., 2001). A Tabela 2 ilustra algumas enzimas industriais.

Tabela 2: Biocatalisadores industriais importantes

| Enzima | Indústria |
|--------------------------------|---|
| Lipase | Biocombustível, farmacêutica e alimentícia. |
| Tripsina | Couro |
| Xilanase | Papel e celulose |
| Lipoxigenase | Alimentícia |
| Fitase | Alimentícia |
| Proteases a α -amilases | Química |
| Hialuronidase | Farmacêutica |

Fonte: BORZANI et al. (2001).

A biocatálise trouxe à tona estudos acerca de catalisadores ecológicos, atendendo as demandas de química verde e desenvolvimento sustentável que, além de reduzir fontes energéticas devido às condições brandas de reação, diminuiu também os subprodutos prejudiciais que são produzidos devido à não especificidade de reação, que podem acabar gerando um enorme impacto negativo ao meio ambiente (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017).

2.2.1 Lipases

De modo geral, as lipases podem ser utilizadas em processamento de alimentos, síntese orgânica, formulação de detergente, fabricação de óleo, entre outros (RAMYASREE et al., 2017).

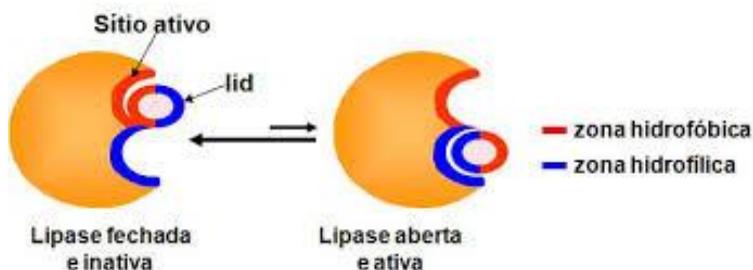
Dentre as enzimas mais utilizadas, a lipase acaba ganhando alta predominância devido à sua ampla especificidade, reconhecendo substratos muito diferentes. Diante disso, é permitido que uma determinada lipase seja utilizada como catalisador em reações bem diferentes como a produção de medicamentos, biodiesel ou alimentos, por exemplo (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Outros fatores tornam o uso da lipase uma importante ferramenta viável do ponto de vista catalítico e econômico são a disponibilidade comercial, a capacidade de catálise heterogênea e a estabilidade operacional. Não ser tóxica e ecologicamente correta também são fatores que as tornam amplamente utilizadas na indústria (JAVED et al., 2018).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) é uma proteína constituída de 269 aminoácidos com massa molar de 31.700 g/mol. Dependendo de sua conformação, a lipase pode estar com o sítio ativo

aberto, onde a enzima apresenta atividade, ou fechado por uma tampa móvel alfa-helicoidal cobrindo o local ativo e resultando na inatividade da enzima, conforme ilustra a Figura 5 a seguir (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Figura 5: Estrutura de formas abertas e fechadas de TLL



Fonte: (RODRIGUES, 2009).

As lipases estão disponíveis comercialmente na forma livre ou imobilizada. Dentre as lipases imobilizadas comerciais mais utilizadas estão a Novozym 435[®] e a Lipozyme TL-IM[®], ambas fornecidas pela Novozymes[®], onde cada uma possui diferentes microrganismos produtores de enzima, materiais de suporte e métodos de imobilização. A Novozym 435[®] é uma lipase de *Candida antartica B*, imobilizada em Lewatit VP OC 1600, uma resina macro-porosa com uma superfície hidrofóbica. Já a Lipozyme TL-IM[®] é uma lipase de *Thermomyces lanuginosus*, imobilizada em um suporte de silicato, com a superfície hidrofílica. Com relação aos protocolos de imobilização, a Novozym 435[®] é preparada via ativação interfacial na superfície hidrofóbica do suporte, enquanto a Lipozyme TL-IM[®] é imobilizada via troca aniônica. Essas diferenças dos biocatalizadores tornam a compreensão das interações dos substratos sobre as atividades das enzimas em diferentes sistemas, mais complexas (MENESES et al., 2017).

2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Em sua forma livre, as enzimas se tornam substâncias difíceis de serem recuperadas para reutilização após o primeiro uso, o que as deixam de ser viáveis economicamente. Esta desvantagem é superada com o processo de imobilização de enzimas. Utilizando esta técnica, pode-se, após seu uso, recuperar facilmente o catalisador, acarretando em rápida

finalização do ensaio e tornando-o repetitivo, reduzindo assim o custo do experimento (LIU; CHEN; SHI, 2018).

Desta forma, enzimas são frequentemente utilizadas em formas imobilizadas na indústria, devido à possibilidade de reuso ou uso contínuo dos biocatalisadores (WISEMAN, 1987). Além da reutilização, a imobilização pode fornecer uma melhor atividade da enzima e a pureza do produto geralmente é melhorada (SCHULER; KARGI, 2009).

2.3.1 Métodos de imobilização

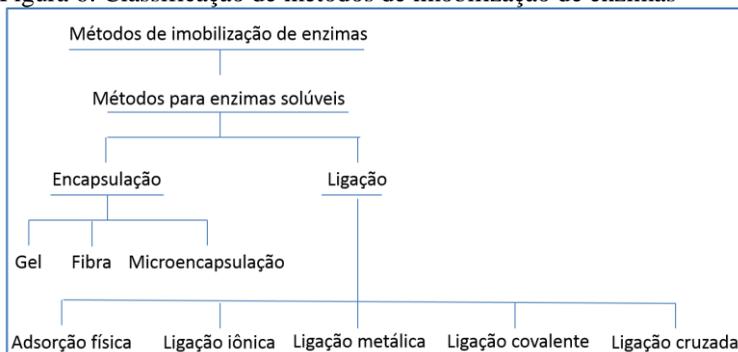
As enzimas podem ser classificadas conforme a forma no qual são imobilizadas, baseada na combinação do tipo de interação responsável pela imobilização e da natureza do suporte (WISEMAN, 1987), dividindo-se basicamente em dois grupos principais: métodos físicos (adsorção e encapsulamento) e métodos químicos (ligação química).

- a) Adsorção: São enzimas anexas à superfície do suporte, neste caso inertes (MADHAVAN et al., 2017), por fraca força física, tais como van der Waals ou forças de dispersão. O sítio ativo da enzima normalmente não é afetado e a atividade da enzima é mantida. Contudo, a desorção da enzima é um problema comum, especialmente na presença de força hidrodinâmica, uma vez que as forças de ligação são fracas (SCHULER; KARGI, 2009).
- b) Encapsulação é o aprisionamento de enzimas em uma matriz de confinamento, frequentemente constituída por materiais poliméricos, tais como Agar (SATTAR et al., 2018), poliacrilamida (BILAL et al., 2018) e colágeno (GENNARI et al., 2018). Contudo, outros tipos de materiais também vêm sendo utilizados, tais como carbono ativado (JUNQUEIRA et al., 2017), cerâmica porosa (MUNCINELLI et al., 2017), entre outros. A matriz de confinamento pode ser uma partícula, uma membrana ou uma fibra (SCHULER; KARGI, 2009), na qual a enzima é geralmente presa em pérolas insolúveis ou sol-géis hidrofóbicos. Este método apresenta algumas vantagens, pois costuma ser de fácil aplicação, barato e geralmente produz imobilizações estáveis (MADHAVAN et al., 2017).
- c) Ligação covalente: é a retenção de enzimas na superfície dos suportes pela formação de uma ligação covalente. A molécula de enzima é

ligada à superfície por meio de certos grupos funcionais tais como amino, carboxila, hidroxila e sulfidrila. Estes grupos funcionais não podem estar no sítio ativo (SCHULER; KARGI, 2009). Este método é o mais eficaz, possibilitando a ligação multipontual, e aumentando, assim, a eficiência e a estabilidade das enzimas imobilizadas (MADHAVAN et al., 2017).

A Figura 6 descreve um sistema de classificação dos métodos de imobilização.

Figura 6: Classificação de métodos de imobilização de enzimas



Fonte: Adaptado de WISEMAN (1987).

2.3.2 Lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas

As lipases vêm sendo imobilizadas em suportes magnéticos e seu comportamento nessas condições tem sido estudado. Como partículas nanométricas de magnetita com superfície funcionalizada foram utilizadas como suporte para adsorção de lipase nos estudos de LEE et al. (2009). Neste trabalho, a enzima imobilizada apresentou maior atividade específica comparada à livre, além de poder ser recuperada por separação magnética e reutilizada, permanecendo com atividade constante durante as reciclagens. HENRIQUES et al. (2018) adaptaram a metodologia previamente proposta por Lee et al. (2009), utilizando as nanopartículas magnéticas como suportes para a imobilização e coimobilização de enzimas. Neste, a lipase TLL foi adsorvida tanto de forma isolada, quanto coimobilizada com β -D-galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. Todos os derivados coimobilizados apresentaram uma estabilidade operacional superior às enzimas na sua forma livre, frente às temperaturas e faixa de pH estudadas, com a TLL ativa mesmo após a desnaturação térmica das demais enzimas coimobilizadas.

ALI et al. (2017) também imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* (CRL) em cápsulas de Fe₃O₄ revestido por SiO₂ em uma reação sol-gel. Desta forma, a estabilidade térmica, resistência ao pH, quantidade de ciclos e capacidade de armazenamento foram melhoradas em comparação à lipase livre. XIE; ZANG (2016) também imobilizaram a lipase CRL em nanocompósito de Fe₃O₄ revestido de sílica MCM-41, usando o glutaraldeído como um reagente de reticulação. Foi demonstrado que a lipase imobilizada teve uma melhor atividade catalítica em relação à sua forma livre.

SIKORA et al. (2016), desenvolveram um protocolo de imobilização enzimática em quitosana magnética de lipase CRL. Ao ser comparado com imobilizações comerciais, foram encontrados valores mais elevados de enantioselectividade e conversão em determinadas reações. Além disso, o estudo confirmou que, mesmo após 5 ciclos de reação, a lipase imobilizada mantém sua alta atividade catalítica.

2.4 SÍNTESE DE ÉSTERES COM GERANIOL CATALISADAS POR ENZIMAS IMOBILIZADAS

Ao realizar a busca na literatura referente à síntese de ésteres de aroma que utilizassem geraniol como fonte de álcool na esterificação e que fossem catalisadas com enzimas imobilizadas, alguns trabalhos publicados foram encontrados. Entre eles, encontraram-se diferentes doadores acila, reações realizadas com diferentes solventes ou na ausência deles. Foram localizadas enzimas imobilizadas em diferentes suportes poliméricos, como resinas, membranas e espuma poliméricas, além de imobilização em carvão ativado e experimentos catalisados por enzimas imobilizadas e disponibilizadas comercialmente. Tais publicações estão apresentadas na forma detalhada na Tabela 3.

Tabela 3: Síntese de ésteres de geraniol com lipase imobilizada

| Produto | Solvente | Suporte | Referência |
|-------------------------|---------------------|--|-----------------------------------|
| Propanoato de Geranoíla | Heptano | Carvão ativado | (MOHAMAD et al., 2015) |
| Butanoato de Geranoíla | Fluido supercrítico | Resina acrílica | (VARMA; MADRAS, 2010) |
| Propanoato de Geranoíla | Isooctano | Comercial | (TANG et al., 2017) |
| Acetato de Geranoíla | Isooctano | Membranas de polipropileno e poliamida | (TRUSEK HOLOWNIA; NOWORYTA, 2007) |
| Acetato de Geranoíla | Hexano | Membrana de poliacrilonitrila | (GUPTA et al., 2013) |
| Acetato de Geranoíla | Tolueno | Filme polimérico | (BADGUJAR; BHANAGE, 2014a) |
| Butanoato de Geranoíla | Isooctano | Comercial | (BEZBRADIC A et al., 2007) |
| Butirato de Geranoíla | Isooctano | Comercial | (DAMNJANO VIC et al., 2012) |
| Propionato de Geranoíla | Ausente | Espuma de poliuretano | (LIGIANARA et al., 2016) |
| Propionato de Geranoíla | Ausente | Carvão ativado | (INÊS et al., 2015) |

Fonte: A autora.

Outro fator importante que também foi analisado nestes trabalhos é com relação à conversão em cada esterificação, ou seja, o rendimento máximo de éster que foi possível produzir, em tais condições. Nestes trabalhos, foram encontradas conversões que variam de 51,3% a 99,9%. Foi observado, por exemplo, que as condições de reação e de catálise interferem muito no rendimento dos ésteres produzidos.

O propanoato de geranoíla que foi estudado por MOHAMAD et al. (2015); TANG et al. (2017), no primeiro trabalho obteve 51,3 % de conversão, enquanto o segundo trabalho obteve 87,5 %. No trabalho de MOHAMAD et al. (2015), a lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada

em nanotubos de carbono e utilizada como catalisador. Dessa maneira os autores atingiram o dobro de conversão, em relação à lipase livre, a 55 °C e 12 h de reação. Já TANG et al. (2017) imobilizaram a lipase de *Y. lipolytica* em uma resina macro porosa comercial (DA201-C), atingindo resultados melhores quando comparado ao anterior, com conversões de 87,5 % em 3,5 h de reação a 35 °C.

A síntese de acetato de geranoíla foi estudada por TRUSEK-HOLOWNIA; NOWORYTA (2007), imobilizando a lipase B de *C. antarctica* em membranas poliméricas por diferentes métodos. Um problema apresentado foi a presença do subproduto gerado, a água, que dificulta a separação dos reagentes, altera a cinética e a concentração de equilíbrio do produto, problema encontrado principalmente em esterificações de cadeias pequenas. Neste caso, a enzima livre obteve melhores resultados de conversão chegando próximo a 100% somente após 80 h de reação.

GUPTA et al. (2013) imobilizaram lipase de *T. lanuginosus* em poliacrilonitrila e foi possível converter 95% de acetato de geranoíla em 24 h de reação a 35 °C.

BADGUJAR; BHANAGE (2014b) utilizaram a lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em suporte polimérico como catalisador em reação de esterificação atingindo uma conversão 99 % ao produzir acetato de geranoíla a 55 °C em 3 h de reação.

BEZBRADICA et al. (2007) estudaram a síntese de butanoato de geranoíla catalisada pela lipase de *R. miehei* com experimentos em que o meio reacional apresentava-se sem solvente, mas estes não obtiveram bons resultados. Com o solvente iso-octano, atingiu-se conversões próximas a 90 % em 70 h de reação e 45 °C.

DAMNJANOVIC et al. (2012) também sintetizaram butanoato de geranoíla com a lipase de *Candida rugosa* imobilizada e atingiram conversões próximas a 100 % a 30 °C com mais de 10 h de reação.

LIGIANARA et al. (2016) produziram propionato de geranoíla e oleato de geranoíla com a lipase de *Candida antarctica* imobilizada em poliuretano e atingiu 97 % e 33,9 % de conversão, respectivamente, em condições não especificadas, relacionando apenas a aplicabilidade da enzima imobilizada.

INÊS et al., (2015) também estudaram a síntese de propionato de geranoíla, mas em meio reacional sem a adição de solvente com a lipase de *Penicillium crustosum* imobilizada, resultando em uma conversão máxima de 53 %, a 60 °C e 6 h de reação.

2.5 SÍNTESE DE ÉSTERES DE CITRONELOL CATALISADAS POR ENZIMAS IMOBILIZADAS

Na busca por ésteres de aroma que utilizassem citrionelol como fonte alcoólica e lipase como biocatalisador, foram encontrados o malonato, laurato e caprilato de citrionela. Nestes, diferentes doadores acila foram identificados, como o laurato de vinila (BADGUJAR; BHANAGE, 2014b e DHAKE et al., 2011), ácido láurico (HABULIN et al., 2008 e ABDULLAH; SULAIMAN; KAMARUDDIN, 2009), ácido malônico (SERRI; KAMARUDDIN; LEN, 2008) e octanoato de vinila (YOU et al., 2011). Além desta variável, foram localizados diferentes solventes e métodos de imobilização, conforme consta na Tabela 4.

Tabela 4: Publicações de síntese de ésteres de Citrionelol com lipase imobilizada

| Produto | Solvente | Suporte | Referência |
|-------------------------|--------------------|------------------|--|
| Laurato de Citrionela | SC-CO ₂ | Membrana PVA:CHI | (BADGUJAR; BHANAGE, 2015) |
| Laurato de Citrionela | Hexano | Comercial | (HABULIN et al., 2008) |
| Laurato de Citrionela | Hexano | SBA | (ABDULLAH; SULAIMAN; KAMARUDDIN, 2009) |
| Malonato de Citrionela | Isooctano | Comercial | (SERRI; KAMARUDDIN; LEN, 2008) |
| Laurato de Citrionela | SC-CO ₂ | Filme polimérico | (DHAKE et al., 2011) |
| Caprilato de Citrionela | Hexano | Látex | (YOU et al., 2011) |

Fonte: A autora.

Nestes estudos, também foram elencadas as melhores conversões em cada caso, que variaram de 80 a 99%. Sintetizando o laurato de citrionela, foram encontrados quatro trabalhos utilizando lipase imobilizada. BADGUJAR; BHANAGE (2015) encontraram conversão máxima de 94% em 4 h de reação, onde a temperatura não foi especificada. Já HABULIN et al. (2008), com as lipases comerciais imobilizadas Novozym 435[®], Lipozyme RM IM[®] e SP 382, obtiveram conversões próximas a 80%, 75% e 75%, respectivamente, em cerca de 1

h de reação a 60 °C. ABDULLAH; SULAIMAN; KAMARUDDIN (2009) atingiram uma conversão de 98% a 37 °C em 24 h de reação. Já DHAKE et al. (2011) estudaram as sínteses de acetato, butirato e laurato de citroneíla com conversões de 91%, 98% e 99%, respectivamente, a 45 °C em 12 h de reação. SERRI; KAMARUDDIN; LEN (2008) sintetizaram malonato de citroneíla com lipase de *Candida rugosa* resultando em uma conversão de 90% em 3 h de reação a 37 °C. YOU et al. (2011) utilizaram da catálise com lipase de *Carica papaya* para síntese do caprilado de citroneíla a 55 °C em 8 h de reação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados nas sínteses de ésteres de aroma foram frascos âmbar com capacidade de volume de 20 mL, micropipetas, provetas e béqueres com diferentes capacidades volumétricas, tubos Falcon, microtubos de centrifugação, câmara incubadora com agitação orbital (modelo MA 410, Marconi), funil, papel filtro, imãs, agitador mecânico (modelo RW20 IKA), reator com camisa de aquecimento e pHmêtro (modelo MB10, Marte).

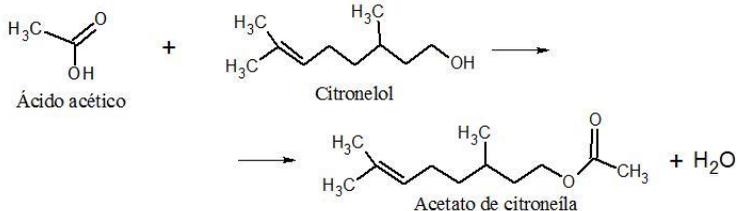
Para síntese dos ésteres terpênicos, foram utilizados como reagentes os alcoóis geraniol e citronelol (ambos da Sigma-aldrich), os ácidos acético (Quimex), oleico (Lafan), láurico (Vetec) e esteárico (Vetec), os solventes orgânicos hexano (Lafan) e isooctano (Sigma) e anidrido acético (Vetec). Como biocatalisadores foram selecionadas as lipase comerciais imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-IM[®]) e *Candida antartica* (Novozym 435[®]), ambas da Novozymes[®].

Para a síntese e imobilização da lipase TL em nanopartículas magnéticas, foram necessários oxalato de amônio monoidratado, sulfato de ferro (III) monoidratado, sulfato de ferro (II) heptaidratado, hidróxido de amônio 32% (v/v), lauril sulfato de sódio (SDS) (todos da VWR Chemicals), butirato de *p*-nitrofenila (Sigma-Aldrich) e cloreto de sódio (Vetec).

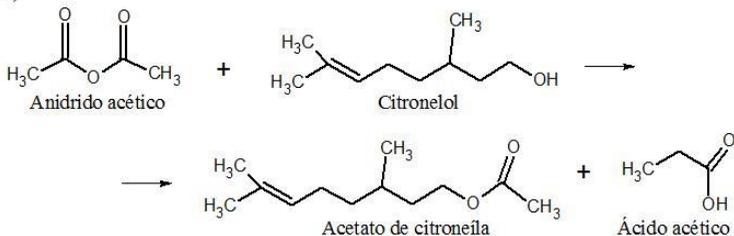
3.2 MÉTODOS

Conforme a revisão bibliográfica realizada, todos os ésteres em questão são inéditos na literatura, quando sintetizados com auxílio de biocatalisadores, exceto oleato de geranoíla que foi estudado por LIGIANARA et al. (2016) e CHIARADIA et al. (2016). Desta forma, as condições de reação (temperatura, uso de solventes, razão molar, carga enzimática e tempo de reação) foram estudadas por meio de testes em busca das condições ótimas, onde os critérios iniciais acerca do estudo foram estabelecidos com base em dados obtidos da literatura de ésteres semelhantes que utilizaram biocatalisadores em seus ensaios, como (DHAKE et al., 2011, ABDULLAH; SULAIMAN; KAMARUDDIN, 2009, GUPTA et al., 2013 e TANG et al., 2017).

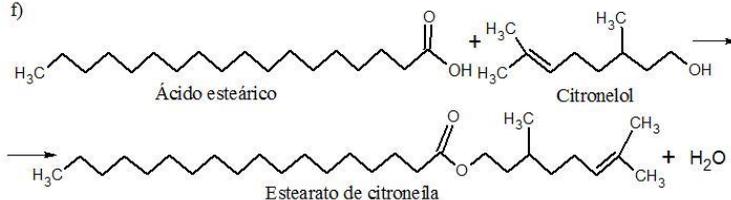
d)



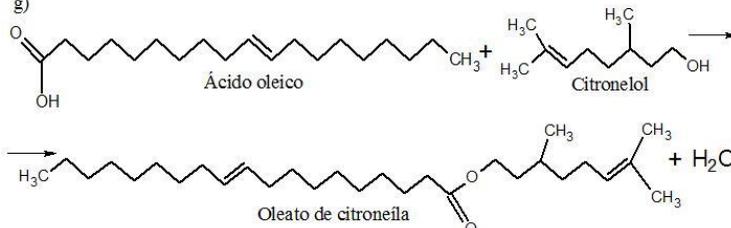
e)



f)



g)



Fonte: A autora.

Para melhorar a miscibilidade dos reagentes e diminuir a concentração de água no entorno do derivado enzimático, foram testados os solventes iso-octano e hexano. Para fins de comparação, foram testadas as mesmas reações sem qualquer solvente para avaliar seu comportamento. Como catalisadores, foram utilizadas os derivados

enzimáticos comerciais Lipozyme TL-IM® e Novozym 435®. Foram realizadas, adicionalmente, reações em branco, ou seja, sem a presença da enzima. Para aprimorar as condições de reação, foram testadas também diferentes temperaturas, razão molar e concentração de derivado enzimático analisando as maiores conversões de substratos em produtos para as reações de esterificações.

A fim de se ter as primeiras informações a respeito das condições experimentais adotadas, foram realizadas as reações de esterificações fixando o tempo de reação em 48 h. Para análise, foram retiradas amostras em 24 h e 48 h de reação. Todas as reações foram realizadas em frascos âmbar, devidamente vedados para evitar que os componentes do sistema evaporassem, sob agitação orbital de 200 rpm. Nestes, adotou-se também temperatura controlada de 35 °C, razão molar 3:1 (ácido:álcool), solvente iso-octano e 10% de derivado enzimático (enzima e suporte). Os experimentos foram conduzidos em uma câmara incubadora com agitação orbital.

3.2.1.1 Influência dos solventes orgânicos nas reações de esterificação

Foram realizadas as reações de esterificação conforme os métodos descritos anteriormente, diferindo apenas com relação ao solvente orgânico utilizado. Foram testados como solventes hexano e iso-octano. As reações de esterificação também foram realizadas na ausência de solvente.

3.2.1.2 Tempo de reação

Para determinar o tempo necessário para que as reações atingissem o máximo de conversão de substratos em ésteres possível, foram realizadas novamente as sínteses conforme os ensaios preliminares, mas desta vez foi deixado reagir durante 8 h, retirando alíquotas a cada 1 h para análise.

3.2.1.3 Efeito da temperatura nas reações de esterificação

Para estabelecer a melhor temperatura de reação para cada síntese, e já tendo os resultados anteriores realizados a 35 °C, as reações foram efetivadas novamente a 45 °C e 55 °C, com paradas para retirar alíquotas regularmente, para que ao término das análises, houvesse comparação entre os resultados.

3.2.1.4 Estudo do efeito da razão molar entre os reagentes na formação de ésteres

Outra variável analisada, para se obter maior conversão de ésteres, foi razão molar. Os experimentos anteriores foram realizados em proporção 3:1 (ácido:álcool). Desta forma, foram feitos testes 1:1 contendo 5 mmol de ácido e 5 mmol de álcool para todos os casos, bem como 2:1 contendo 10 mmol de ácido e 5 mmol de álcool. Foram retiradas alíquotas regularmente para análise futura e comparação dos resultados.

3.2.1.5 Efeito da concentração de biocatalisador nas reações de esterificação

Para verificar a influência da concentração de enzimas na velocidade de formação de ésteres, foram realizados testes de esterificação variando-se a concentração do derivado enzimático. Para os experimentos anteriores, utilizou-se a relação derivado enzimático/reagentes de 0,1g/g. Diante disto, foram realizados também os mesmos testes com concentração de derivado enzimático de 3%, 6% e 14% ($m_{\text{derivado enzimático}}/m_{\text{substratos}}$).

3.2.2 Cinética das reações de esterificação

Após a determinação das melhores condições de esterificação enzimática, realizou-se novamente cada esterificação reunindo o uso das melhores condições encontradas em cada efeito estudado. Retirou-se alíquotas de 150 μL regularmente para construir as curvas cinéticas para cada éster.

3.2.3 Quantificação dos ésteres

Para quantificar cada síntese realizada, foram retiradas amostras em períodos de tempo determinados e ambas foram armazenadas em microtubos de centrifugação. Quando não analisadas na hora, as amostras foram armazenadas em congelador para cessar a reação, com os frascos vedados com parafilme para impedir a evaporação de reagentes.

Para identificar e quantificar os ésteres, foram realizadas análises de cromatografia gasosa, em um cromatógrafo (Shimadzu GC-2010) equipado com processador de dados, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida ZB-WAX (30 m \times 250 μm \times 0,25 μm) e detector de ionização de chama (FID), com temperaturas programadas de 40 $^{\circ}\text{C}$ (8

min), 40-150 °C (10 °C.min⁻¹), 150-220 °C (10 °C.min⁻¹) e 220 °C (5 min), temperatura do injetor de 250 ° C, detector a 250 ° C, injeção em modo split, razão de split 1: 100, N₂ (56 kPa e 2 mL.min⁻¹) como gás carreador.

Para isso, foram colocados em vials diferentes 6 µL de cada substrato utilizados nas esterificações, diluídos em 1 mL de acetato de etila. Em seguida, analisou-se estas amostras para conhecer os picos gerados pelos reagentes individualmente. Depois disso, conhecendo os picos referentes aos reagentes, foram diluídos 30 µL de cada produto de reação em 1 mL de acetato de etila em vials para análise. Os novos picos formados foram atribuídos à formação de produtos, neste caso, ésteres. A conversão da reação foi acompanhada através da diminuição na largura do pico do reagente limitante e a formação do sinal referente ao produto.

3.2.4 Recuperação e reutilização do biocatalisador em reações consecutivas

Após cada ciclo de utilização, as enzimas comerciais imobilizadas foram separadas do sistema reacional por meio do processo de filtração utilizando um funil e papel filtro de velocidade de filtração rápida. Em seguida, o biocatalisador foi lavado duas vezes consecutivas com hexano. Após secarem em temperatura ambiente, os biocatalisadores recuperados foram mantidos sob refrigeração até o próximo reuso. A quantidade remanescente de enzima imobilizada no experimento anterior foi reutilizada para cada sistema de reação avaliada neste trabalho.

3.2.5 Reações de esterificação utilizando lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas

As reações de esterificação descritas acima foram também realizadas utilizando como catalisador a lipase de TL imobilizada em suportes de magnetita (Fe₃O₄).

3.2.5.1 Síntese dos suportes de NPM-SDS

Para síntese dos suportes NPM, utilizou-se o método proposto por HENRIQUES et al. (2018), adaptada de LEE et al. (2009). Desta forma, em um reator foram misturados 11 g de sulfato de ferro II com 5,65 g de oxalato de amônio, acrescido 100 mL de água destilada. Para dissolução total o sistema foi utilizado um agitador mecânico. Logo após, acrescentou-se 16 g de sulfato de ferro II e continuou a agitação mantendo

uma temperatura de 75 °C em um banho termostatzado acoplado ao reator como uma camisa de aquecimento, conforme a Figura 8. Logo em seguida, utilizou-se um cilindro de gás N₂ para desoxigenar o sistema. Dando sequência, adicionou-se sem pausa 50 mL de hidróxido de amônio a fim de ajustar o pH para próximo de 9,0 e a agitação permaneceu por mais 1h a 1200 rpm. Após o tempo programado, as partículas foram separadas com auxílio de um imã conforme consta na **Figura 9** e lavadas com água destilada várias vezes até que fosse retirado todo resíduo da reação, permanecendo apenas as nanopartículas magnéticas.

Figura 8: Síntese das NPM:SDS



Fonte: A autora.

Figura 9: NPM-SDS sob influência de um campo magnético



Fonte: A autora.

Para a funcionalização das partículas sintetizadas, foram adicionados 24 g de SDS dissolvido em água destilada, considerando uma razão mássica 1:2 (NPM:SDS). Em seguida, as NPM foram adicionadas ao SDS dissolvido, dentro de um reator fechado. Desoxigenou-se o sistema borbulhando N₂ e ajustou-se o pH para 5,0 com auxílio de uma solução aquosa de 10 % de ácido clorídrico e um phmetro. Com um agitador mecânico e camisa de aquecimento acoplados, manteve-se agitação de cerca de 300 rpm e temperatura de 75 °C por 24 h. Após o tempo programado, as partículas foram novamente lavadas, até que todo SDS sobrenadante fosse removido.

3.2.5.2 Imobilização da lipase TLL no suporte NPM-SDS

Foram pesados 2 g de suportes NPM-SDS e transferidos para tubos do tipo Falcon com capacidade de 40 mL de volume e adicionou-se 40 mL de cloreto de sódio 0,1% (m/v) e 2 mL de lipase TLL. Os tubos foram mantidos em agitação vertical com rotação de 300 rpm a temperatura ambiente (cerca de 25 °C) por 2 h.

A imobilização foi acompanhada através da retirada de alíquotas de 150 µL a cada 30 min, para o acompanhamento do decréscimo no teor de proteína contida no sobrenadante (Henriques et al.,2018).

3.2.5.3 Determinação do teor de proteínas

A quantidade de proteína no sobrenadante foi acompanhada pelo método de Bradford (1976). Para isto, das amostras de sobrenadantes retiradas durante a imobilização, 20 µL foram dispostas em diferentes tubos de ensaio e, em cada um, foi acrescido 2 mL de reagente de Bradford. Após 20 min realizaram-se as medições em espectrofotômetro UV/VIS (Hitachi modelo U-2900) em um comprimento de onda de 595 nm, o qual consiste no aumento da absorbância causada pela concentração de proteínas na solução de corante Azul Brilhante de Coomassie G-25 (reagente de Bradford).

Para interpretação dos resultados, previamente realizou-se o mesmo procedimento com amostras de quantidades conhecidas de proteínas e, a partir desses resultados, construiu-se uma curva de calibração (Apêndice A).

3.2.5.4 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica da lipase foi medida por método colorimétrico através de um aumento da absorbância na faixa de 348 nm, produzido pela formação do composto *p*-NP na reação de hidrólise do *p*-NPB.

Para determinar a atividade hidrolítica no derivado NPM-TLL foram necessários 20 mg de amostra e para medir a atividade residual no sobrenadante, utilizava-se 20 µL de amostra. Para ambos os casos, junto à alíquota, adicionou-se aos tubos de ensaio 20 µL de *p*-NPB 50 mM e 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0). Após serem misturadas, as amostras foram agitadas com auxílio de um agitador tipo vórtex Mixer (Kasvi basic K45-2820) durante dois minutos para que houvesse a formação do composto *p*-NP na reação de hidrólise do *p*-NPB, gerando uma coloração amarelada. Posteriormente, foi realizado o acompanhamento da atividade hidrolítica em espectrofotômetro, através do aumento da absorbância em 348 nm (HENRIQUES, 2016). A atividade hidrolítica foi calculada conforme a Equação 1 com coeficiente de extinção molar (ξ) para o *p*-NPB de 5,15 1/(µM cm). Uma unidade (U) de atividade enzimática de hidrólise foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 µmol de *p*-NP por minuto sob as condições experimentais (FERRAZ et al., 2015). Pelas medidas de absorbância pode-se calcular a atividade hidrolítica usando-se a seguinte equação:

$$A_h = \frac{\sigma}{\xi \times c} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

A_h = atividade hidrolítica no meio reacional [U/L];

ξ = coeficiente de extinção molar do substrato [5,15 1/(µM.cm)];

c = caminho ótico (1 cm);

σ = coeficiente angular da reta absorbância x tempo [min^{-1}];

A atividade específica do derivado enzimático foi calculada por meio da equação 2, relacionando a atividade hidrolítica total expressa em U/L, com a massa do suporte utilizada na imobilização, conforme segue:

$$A_{h,e} = \frac{A_h}{m_d} \times V_a \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$A_{h,e}$ = atividade hidrolítica específica no meio reacional [U/g];

A_h = atividade hidrolítica no meio reacional [U/L];

m_d = massa de derivado enzimático na amostra [g];

V_a = volume da amostra contendo o derivado enzimático [L].

O cálculo do rendimento experimental da imobilização foi realizado a partir da Equação 3, descrita abaixo.

$$RI = \left(1 - \frac{A_f}{A_i}\right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

RI = rendimento da imobilização [%];

A_i = Atividade enzimática total no sobrenadante, oferecida inicialmente [U/g];

A_f = Atividade enzimática total no sobrenadante, ao final da imobilização [U/g].

A atividade final do derivado enzimático, definida como atividade recuperada foi calculada através da Equação 4:

$$A_r = \frac{A_{h,e}}{A_i} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

A_r = Atividade recuperada [%];

$A_{h,e}$ = atividade hidrolítica específica no meio reacional [U/g];

A_i = Atividade enzimática específica no sobrenadante, oferecida inicialmente [U/g];

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

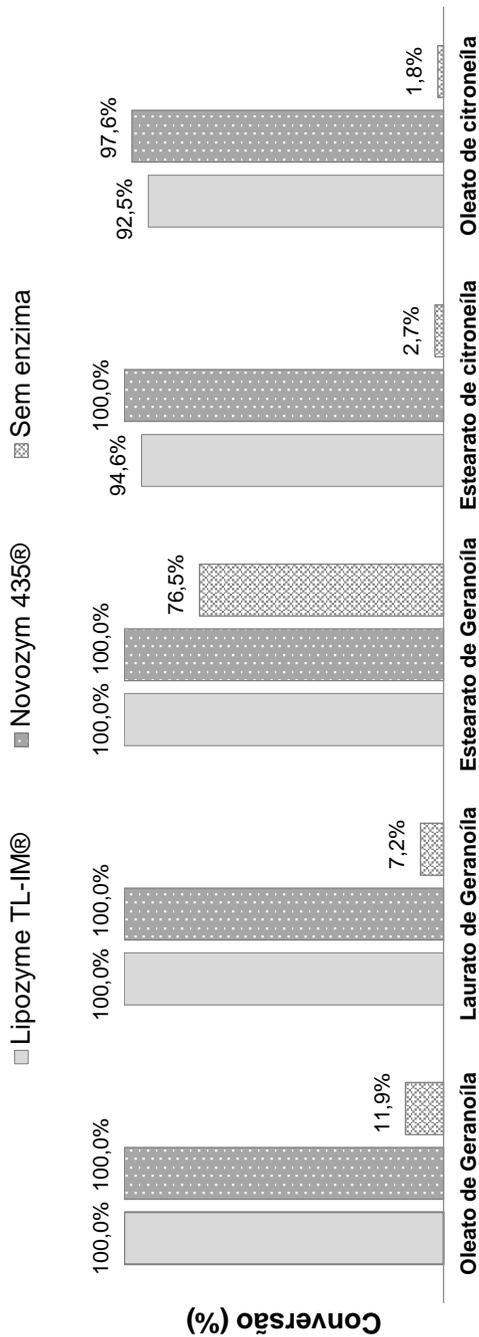
Nesta parte da dissertação, serão apresentados e analisados os resultados experimentais da síntese dos ésteres de aroma estudados, bem como as discussões acerca de cada item proposto.

4.1 SÍNTESE DOS ÉSTERES DE GERANOÍLA E CITRONEÍLA

Como testes iniciais, foi verificada a formação de ésteres de geranoíla e citroneíla a partir de ácido oleico, esteárico e láurico, realizando reações de esterificação com tempo fixo de 24 h, com o objetivo de avaliar a eficiência catalítica de enzimas imobilizadas comerciais (Lipozyme TL-IM[®] e Novozym 435[®]). A Figura 10 apresenta os resultados obtidos nestas reações.

Os resultados mostram que as conversões enzimáticas foram superiores a 90%. Fugindo ao padrão observado, a síntese do estearato de geranoíla não mostrou ser tão dependente da ação enzimática, pois atingiu-se valores altos de conversão em éster (76,5%) mesmo na ausência dos derivados enzimáticos.

Figura 10: Rendimento em ésteres de geranoíla e citronela para reações catalisadas pelas enzimas Lipozyme TL-IM® e Novozym 435®



Os ensaios foram realizados na razão molar de 3:1 (ácido:álcool), na presença do solvente hexano, com 10% (massa de derivado enzimático/massa dos substratos) de enzima comercial imobilizada (Lipozyme TL-IM®, Novozym 435® e sem enzima), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm durante 24 h, a temperatura controlada de 35 °C;

Fonte: A autora.

Além das reações de esterificação citadas anteriormente, também foi estudada a síntese de acetato de citroneíla. Nas reações de síntese do acetato de citroneíla foram utilizados o ácido acético (AA) ou anidrido acético (AnA) como doadores acila. Os resultados de conversão em ésteres de citroneíla estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Conversão em acetato de citroneíla utilizando ácido acético (AA) e anidrido acético (AnA), na ausência e presença das enzimas Lipozyme TL-IM[®] e Novozym 435[®].

| Doador acila | Enzima | Tempo (h) | Conversão (%) |
|---------------------|-----------------------------|------------------|----------------------|
| AA | Lipozyme TL-IM [®] | 48 h | 16 |
| AA | Novozym 435 [®] | 48 h | 24 |
| AA | Sem enzima | 48 h | 3 |
| AnA | Lipozyme TL-IM [®] | 1 h | 100 |
| AnA | Novozym 435 [®] | 1 h | 95 |
| AnA | Sem enzima | 1 h | 98 |

Os ensaios foram realizados na razão molar de 3:1 (ácido:álcool), na presença do solvente iso-octano, com 10% (massa de derivado enzimático/massa dos substratos) de enzima comercial imobilizada (Lipozyme TL-IM[®], Novozym 435[®] e sem enzima), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm durante 48 h ou 1 h, a temperatura controlada de 35 °C;

Fonte: A autora.

Observou-se que para produção de acetato de citroneíla a partir do ácido acético na presença de iso-octano como solvente, houve um pequeno aumento no rendimento experimental quando comparado com as reações com hexano (Lipozyme TL-IM[®] 13,1%; Novozym 435[®] 20,4%; branco 3%). Mesmo com o isooctano e após 48 h de reação, as conversões foram muito baixas apresentando no máximo 24%.

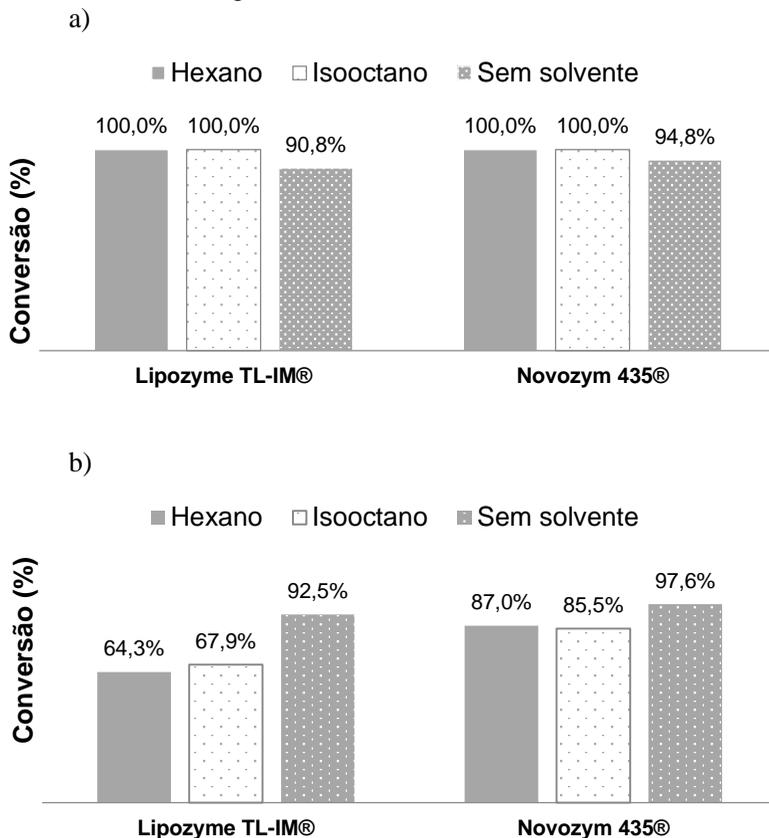
Desta forma, foi testado o anidrido acético como doador acila e percebeu-se que mesmo na ausência de enzima, a reação apresentou uma conversão próxima de 100% em apenas 1 h de reação. Deste modo, considerando o fato de os anidridos serem mais reativos que os ácidos carboxílicos, para produção de acetato de citroneíla a partir do anidrido acético, não há necessidade da aplicação de um catalisador enzimático e, portanto, não foi dado seqüência nos experimentos para tal éster.

4.1.1 Influência dos solventes orgânicos nas reações de esterificação

O solvente orgânico desempenha um papel muito importante para qualquer transformação enzimática, podendo afetar o poder catalítico da enzima (BADGUJAR; BHANAGE, 2014a). A natureza e a polaridade dos solventes orgânicos influenciam na velocidade de síntese de produtos catalisada pela lipase. O valor do logaritmo da relação de partição entre as fases orgânica e aquosa ($\log P$) é usado para descrever a hidrofobicidade de solventes orgânicos (HABULIN et al., 2008). TRUSEK-HOLOWNIA e NOWORYTA (2007) testaram a atividade e a estabilidade da lipase (CAL-B) para esterificação em diferentes solventes orgânicos de diferentes $\log P$ como: iso-octano (2,2,4-trimetilpentano) ($\log P = 4,5$), hexano ($\log P = 3,5$), pentano ($\log P = 3,0$), tolueno ($\log P = 2,5$), 1-butanol ($\log P = 0,8$) e acetato de etila ($\log P = 0,7$). A maior atividade de lipase foi observada em solventes de alto valor de $\log P$, ou seja, em pentano, hexano e iso-octano. MOHAMAD et al. (2015) fizeram testes muito parecidos ao anterior, estudando solventes com diferentes valores de $\log P$ na síntese de propionato de geranoíla, obtendo resultados que concordavam com a discussão anterior. Estes autores acrescentam ainda, que os solventes de alto $\log P$ proporcionam uma melhor dissociação de ácidos orgânicos fracos e impedem a remoção da camada de água essencial que circunda a enzima, durante o curso da reação. Neste contexto, é pertinente salientar que o uso desses solventes sustenta a estrutura da proteína e a conformação cataliticamente ativa da enzima. Sendo assim, é geralmente aceito que solventes hidrofílicos ($\log P < 2$), isto é, solventes polares tendem a remover a água essencial de moléculas de enzimas que levam à inativação da atividade enzimática, sugerindo fortemente o efeito de desidratação desses solventes no sítio ativo da enzima (MOHAMAD et al., 2015).

Por meio dos ensaios envolvendo solventes, procurou-se saber se haveria a necessidade de acrescentá-lo à reação para melhorar a miscibilidade dos reagentes e/ou diminuir a concentração de água no meio reacional favorecendo a formação do produto desejado. Nos casos em que o acréscimo do solvente foi necessário, comparou-se também diferentes solventes de $\log P$ com valores elevados iso-octano ($\log P = 4,5$) e hexano ($\log P = 3,5$) para as mesmas condições de reação. A Figura 11 apresenta a influência do uso destes solventes no meio reacional sobre as conversões de oleato de geranoíla (a) e oleato de citroneíla (b).

Figura 11: Influência dos solventes orgânicos hexano e iso-octano na síntese enzimática de oleato de geranoíla (a) e oleato de citroneíla (b).



Os ensaios foram realizados na razão molar de 3:1 (ácido:álcool), na presença dos solventes hexano, iso-octano ou sem solvente, com 10% (massa de derivado enzimático/massa dos substratos) de enzima comercial imobilizada (Lipozyme TL-IM® ou Novozym 435®), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm durante 3 h, a temperatura controlada de 35 °C;

Fonte: A autora.

Observa-se que o uso do solvente não foi essencial para as sínteses de oleato de geranoíla e oleato de citroneíla. As reações enzimáticas atingem conversões muito próximas à conversão total nos tempos pré-determinados independentemente do uso de solventes. Portanto, o uso do solvente nesses casos é dispensável. Tal resultado pode

ser justificado pelo fato de os substratos serem líquidos e miscíveis em temperatura ambiente, facilitando o acesso ao sítio ativo da enzima.

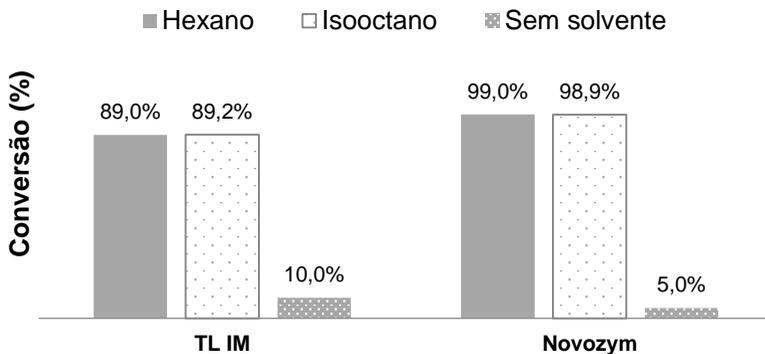
Em nenhuma parte do processo foi percebida a hidrólise do éster, ou seja, reação reversa em até 24 h de reação, onde a conversão se mantém próxima a 100%. Este fato é justificado pela concentração de água ser muito baixa no meio reacional, mesmo quando as conversões atingem taxas muito altas e próximas a 100%. Pela estequiometria de reação calcula-se que o percentual mássico de água no meio reacional não ultrapassa 4%.

Os mesmos testes anteriores de solvente foram realizados para os demais ésteres em análise neste trabalho e os resultados estão apresentados na Figura 12.

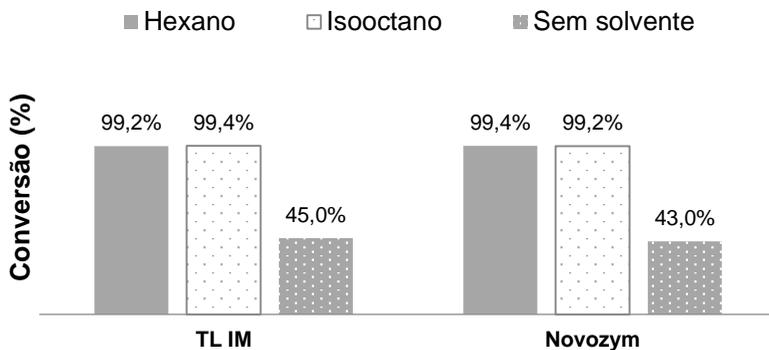
Os resultados mostram que para a síntese de laurato de geranoíla, o acréscimo do solvente desempenhou um aumento de conversão de 10% para 89% com a Lipozyme TL-IM® e de 5% para 99% com a Novozym 435®, tornando-se indispensável.

Figura 12: Influência dos solventes orgânicos hexano e iso-octano nas reações de esterificação.

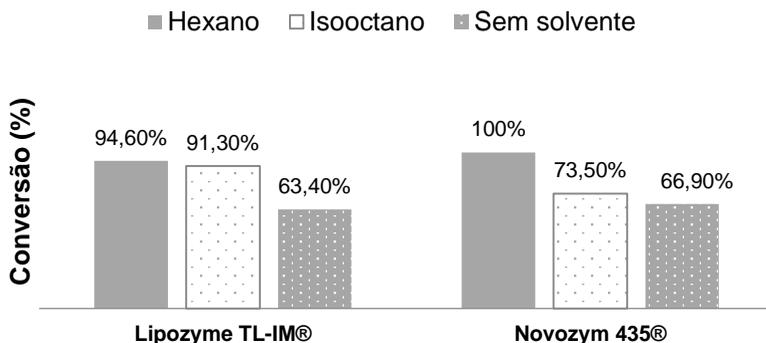
a) Laurato de geranoíla



b) Estearato de geranofila



c) Estearato de citronefla



Os ensaios foram realizados na razão molar de 3:1 (ácido:álcool), na presença dos solventes hexano, isooctano ou sem solvente, com 10% (massa de derivado enzimático/massa dos substratos) de enzima comercial imobilizada (Lipozyme TL-IM® ou Novozym 435®), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm durante 1 h, a temperatura controlada de 35 °C;

Fonte: A autora.

Quando analisado os ésteres que utilizam ácido esteárico como doador acila percebe-se que não há uma diferença tão evidente ao se comparar as conversões obtidas nas reações com solvente ou na ausência dele, em 1 h de reação, conforme apresentado na Figura 12 (b, c). Entretanto, avaliando tempos maiores das mesmas reações, percebeu-se que a conversão é aumentada gradativamente até atingir a conversão total, nos casos de reações com solventes. Mas, nas reações sem solventes a

maior conversão encontrada no decorrer de 48 h de reação para estearato de geranoíla foi de 49% e para o estearato de citroneíla foi 67%. Desta forma, o uso do solvente foi mantido nestes casos, tendo em vista que no decorrer da reação sem solvente a conversão se estabiliza em um patamar baixo. Esta dificuldade na evolução das conversões pode ser justificado pelo fato que apenas parte do ácido esteárico (sólido na temperatura reacional) é dissolvido no álcool que é líquido em temperatura ambiente, além disso, o produto da reação também é sólido em temperatura ambiente, dificultando então a transferência de massa e o acesso dos substratos ao sítio ativo da enzima. Desta forma, observou-se que o solvente foi necessário em todos os casos em que o ácido se encontrava no estado sólido em temperatura ambiente para que houvesse uma melhor miscibilidade entre os substratos e facilitasse o acesso à enzima, concordando com a discussão realizada por (MOHAMAD et al., 2015).

Quanto à comparação entre os dois solventes, de modo geral, foi possível perceber que, entre os solventes hexano e iso-octano, não houve diferenças maiores que 3,3% na quantidade de éster produzida, tendo em vista que o *log P* dos dois solventes serem muito próximos atuando de forma semelhante na questão de manter a água próxima à enzima necessária para ativação da mesma. Uma exceção ocorreu na produção de estearato de citroneíla em que o hexano apresentou um melhor desempenho com um aumento de 26,5 % na conversão. Sendo assim, foi dado sequência nos experimentos utilizando hexano como solvente, pelo fato de este possuir um menor valor agregado e em certos casos ter apresentado aumento na conversão.

4.1.2 Efeito da temperatura nas reações de esterificação

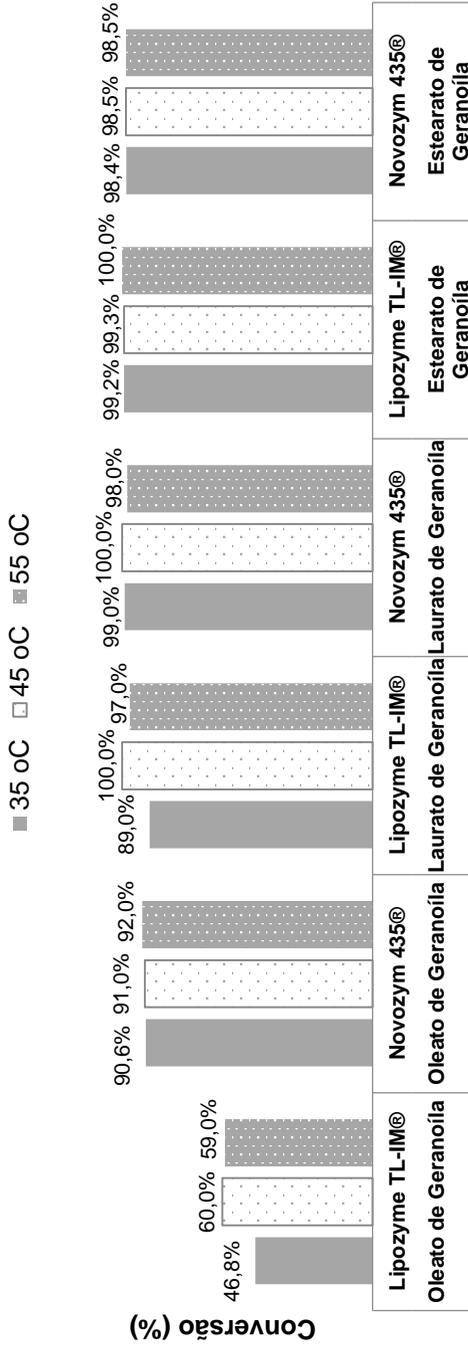
Procurou-se encontrar, também, qual a temperatura ideal para que as reações enzimáticas de esterificação fossem favorecidas. De acordo com ABDULLAH, SULAIMAN e KAMARUDDIN (2009), o aumento da temperatura de reação para sínteses que envolvem catálise enzimática tende a ser benéfico, tendo em vista que a probabilidade de colisão entre as enzimas e moléculas de substrato aumenta. Entretanto, GUPTA et al. (2013) explicitam que esta temperatura pode ser aumentada até um limite, onde passa a ter uma influência negativa, afetando a estabilidade da enzima. Desta forma, foram analisados os resultados das conversões para três temperaturas distintas 35, 45 e 55 °C. Os resultados dos ésteres de geraniol encontram-se na Figura 13 e os de citronelol na Figura 14.

Nota-se que quando a temperatura foi aumentada de 35 °C para 45 °C ou 55 °C não houve uma diferença efetiva entre as conversões. Estes resultados corroboram resultados de outros autores como os encontrados na esterificação do butanoato de geranoíla por DAMNJANOVIC et al., (2012), acetato de geranoíla por GUPTA et al., (2013) e laurato de citroneíla por ABDULLAH; SULAIMAN; KAMARUDDIN, (2009).

Para que seja possível manter as temperaturas mais altas (45 ou 55 °C), necessita-se de maiores gastos energéticos e, portanto, recomenda-se utilizar a temperatura de 35 °C, considerando essa economia de energia perante as temperaturas mais altas.

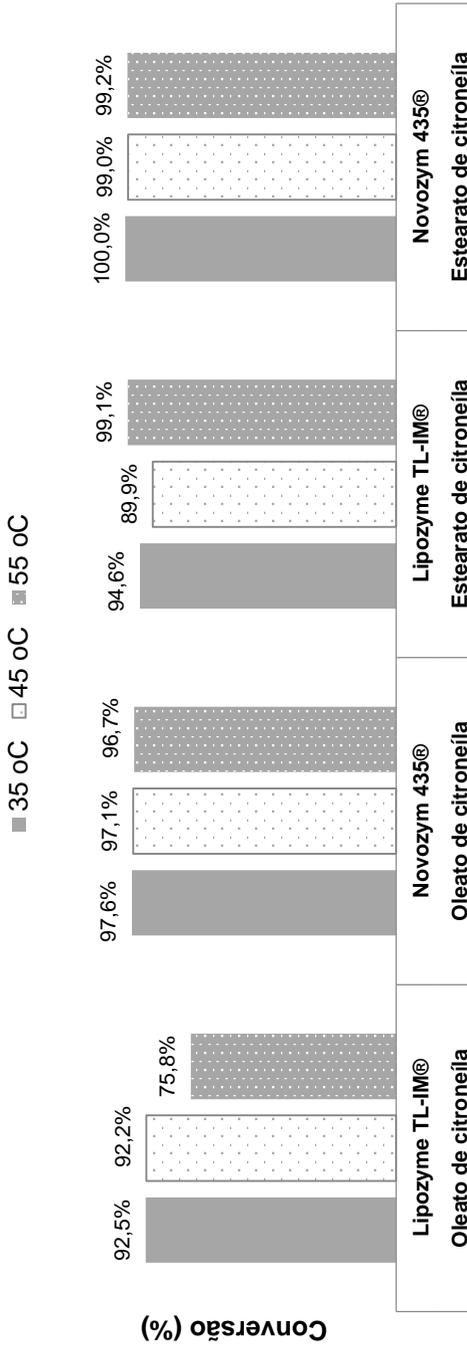
Além disso, segundo GUPTA et al. (2013) as enzimas imobilizadas em modo geral apresentam estabilidade térmica maior comparado à enzimas livres. Porém, mesmo as enzimas imobilizadas podem sofrer desnaturação térmica a temperaturas acima de 45 °C. Nas sínteses analisadas, não foi possível perceber algum decréscimo significativo para temperaturas altas, mas este fato poderia influenciar de forma negativa os testes de reuso. Desta forma, este é outro motivo para a recomendação de manter as reações de esterificação à temperaturas baixas, diminuindo, então, as chances de inativação da enzima com o tempo ou com ciclos.

Figura 13: Efeito da temperatura nos ésteres de geraniol



Os ensaios foram realizados na razão molar de 3:1 (ácido:álcool), na presença do solvente hexano, com 10% (massa de derivado enzimático/massa dos substratos) de enzima comercial imobilizada (Lipozyme TL-IM® ou Novozym 435®), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm durante 1 h, a temperatura controlada de 35, 45 ou 55 °C;
 Fonte: A autora.

Figura 14: Efeito da temperatura nos ésteres de citronelol



Os ensaios foram realizados na razão molar de 3:1 (ácido:álcool), na presença do solvente hexano, com 10% (massa de derivado enzimático/massa dos substratos) de enzima comercial imobilizada (Lipozyme TL-IM® ou Novozym 435®), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm durante 3 h, a temperatura controlada de 35, 45 e 55 °C;

Fonte: A autora.

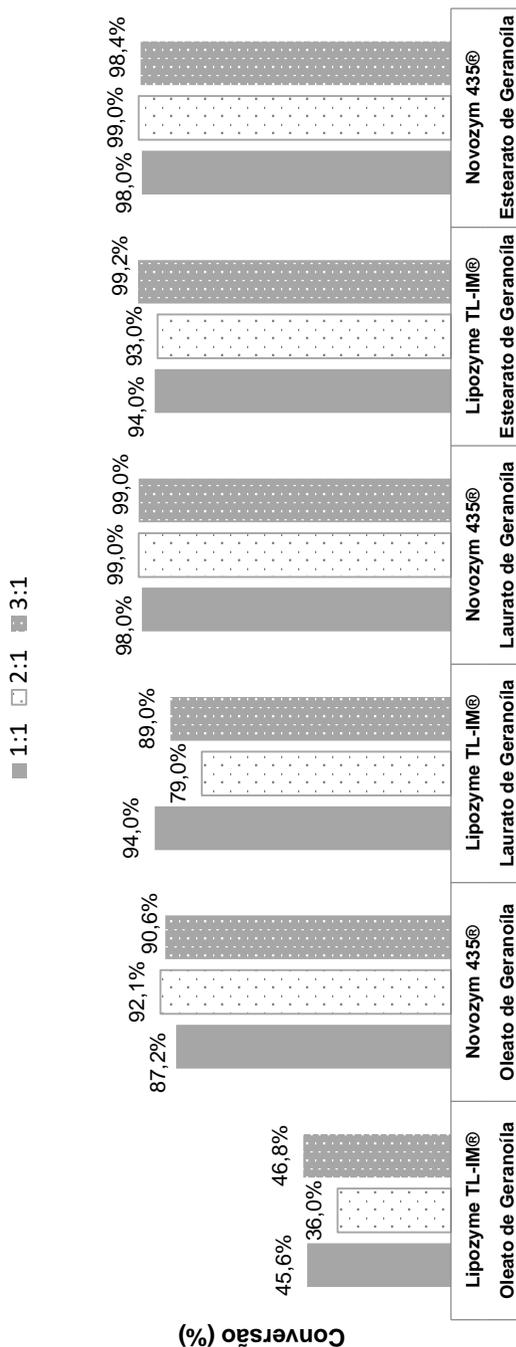
4.1.3 Efeito da razão molar dos substratos nas reações de esterificação

Outra variável analisada para as reações de esterificação foi a razão molar entre os reagentes. Isto porque, reações enzimáticas, especialmente esterificações, tornam-se desafiadoras quando elevadas concentrações de substratos causam efeitos inibitórios, tanto pelo ácido quanto pelo álcool (DAMNJANOVIC et al., 2012). Visto que os testes anteriores foram realizados com razão molar 3:1 (ácido:álcool) e obtiveram sucesso, decidiu-se diminuir a concentração de ácido em excesso no meio reacional, gradativamente e acompanhar a modificação acarretada nas conversões finais.

Os resultados dos testes da influência da razão molar (1:1, 1:2 e 1:3, álcool:ácido) para a síntese enzimática dos ésteres de geraniol estão expostos na Figura 15 e para os ésteres de citronelol apresentam-se na Figura 16.

Os resultados mostram que a razão molar não influenciou na velocidade da reação e que em nenhum momento observou-se inibições causadas por excesso de substratos. Em todos os casos, a maior diferença encontrada, quando retirado o excesso de ácido, foi de 5% nas conversões, portanto, como não houve acréscimo rentável, para os testes seguintes foi considerada razão molar 1:1, considerando que futuras purificações seriam facilitadas na ausência de excessos de substratos. Esses resultados foram semelhantes ao encontrados por GUPTA et al. (2013) na síntese de acetato de geranoíla e por LIGIANARA et al. (2016) para o propionato de geranoíla.

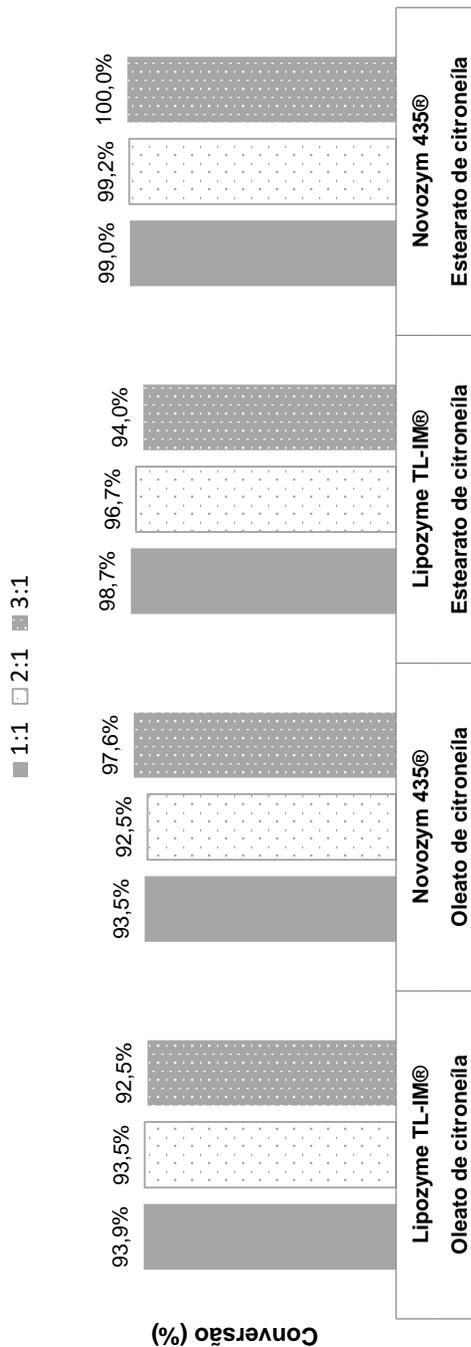
Figura 15: Comparativo de conversões em ésteres de geraniol para diferentes razões molares entre os reagentes.



Os ensaios foram realizados nas razões molares de 1:1, 2:1 e 3:1 (ácido:álcool), na presença do solvente hexano, com 10% (massa de derivado enzimático/massa dos substratos) de enzima comercial imobilizada (Lipozym TL-IM® ou Novozym 435®), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm durante 1 h, a temperatura controlada de 35 °C.

Fonte: A autora.

Figura 16: Comparativo de conversões em ésteres de citrionelol para diferentes razões molares.



Os ensaios foram realizados nas razões molares de 1:1, 2:1 e 3:1 (ácido:álcool), na presença do solvente hexano, com 10% (massa de derivado enzimático/massa dos substratos) de enzima comercial imobilizada (Lipozyme TL-IM® ou Novozym 435®), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm durante 3 h, a temperatura controlada de 35 °C.

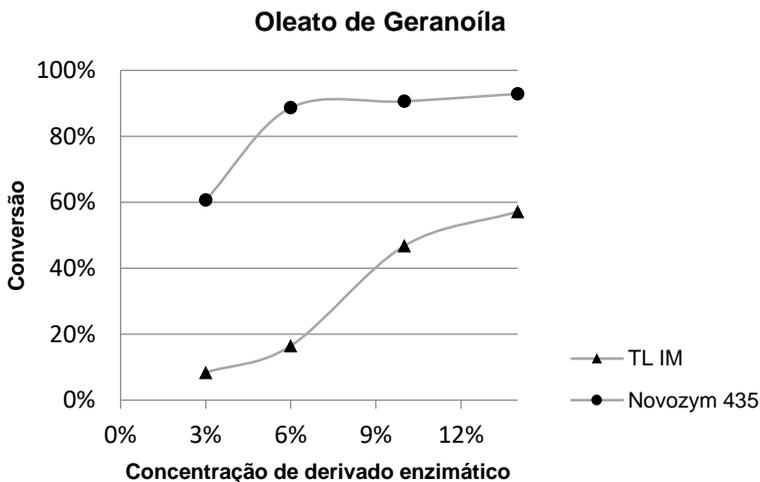
Fonte: A autora.

4.1.4 Efeito da concentração de derivado enzimático nas reações de esterificação

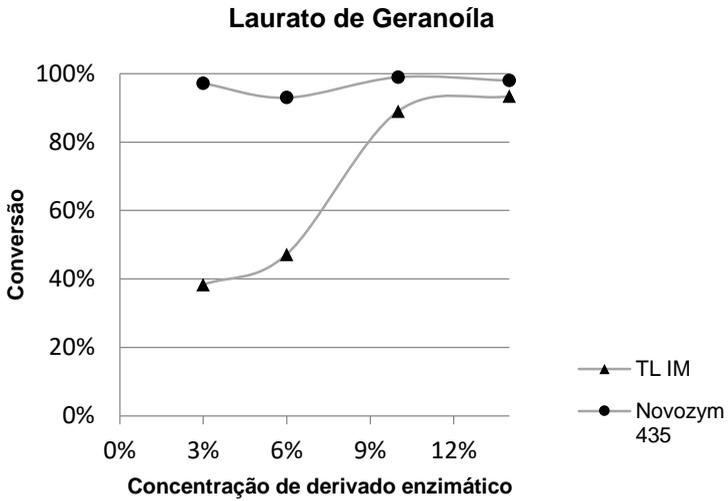
De modo geral, quanto maior for a massa de enzima em relação à massa dos substratos incluída em um meio reacional, maior será a velocidade de reação (VARMA; MADRAS, 2010). Porém, a quantidade de enzimas é um fator importante do ponto de vista econômico, tornando-se necessário um estudo para se alcançar a máxima eficiência nas esterificações, com uma baixa concentração de enzimas (KIM; PARK, 2017). Portanto, foram testadas diferentes cargas enzimáticas (3%, 6%, 10% e 14% $m_{\text{substratos}}/m_{\text{biocatalisador}}$) a fim de acompanhar o aumento na velocidade da reação e verificar o ponto em que a velocidade atinge seu ponto máximo. Neste caso, o aumento na quantidade de enzima estaria gerando custos adicionais e, além disso, poderia causar aglomerações entre os suportes, dificultando o acesso dos substratos à enzima, passando a não favorecer mais a reação. Os resultados experimentais estão dispostos na Figura 17.

Figura 17: Influência da concentrações de derivados enzimáticos nas conversões das reações de esterificação catalisadas pela Lipozyme TL-IM® ou Novozym 435®

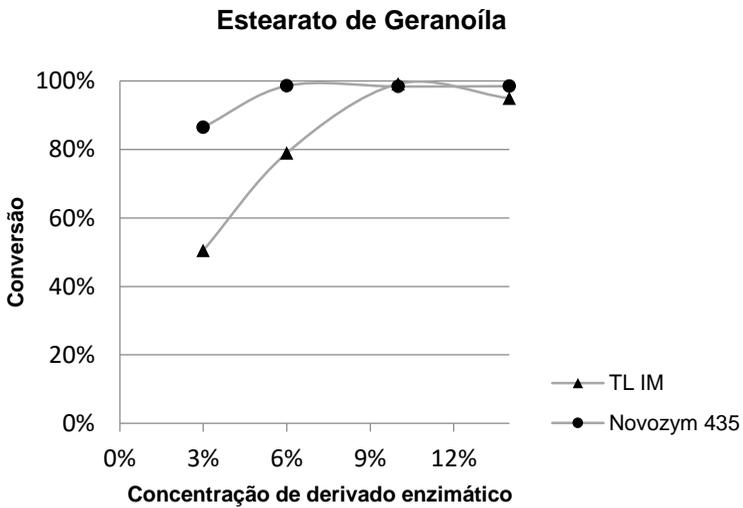
a)



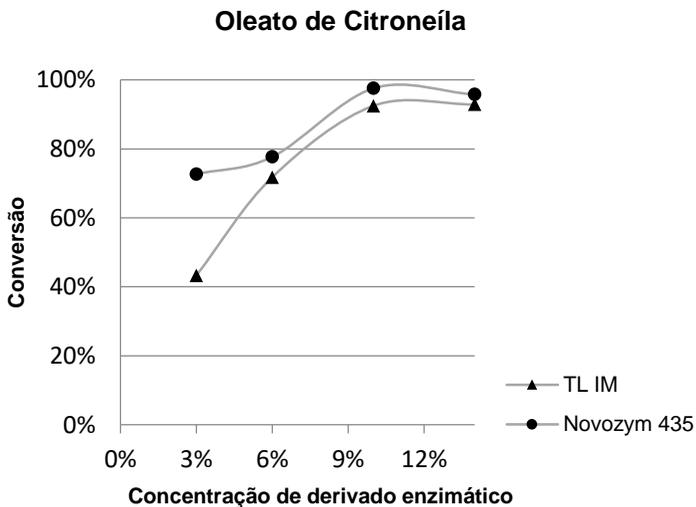
b)



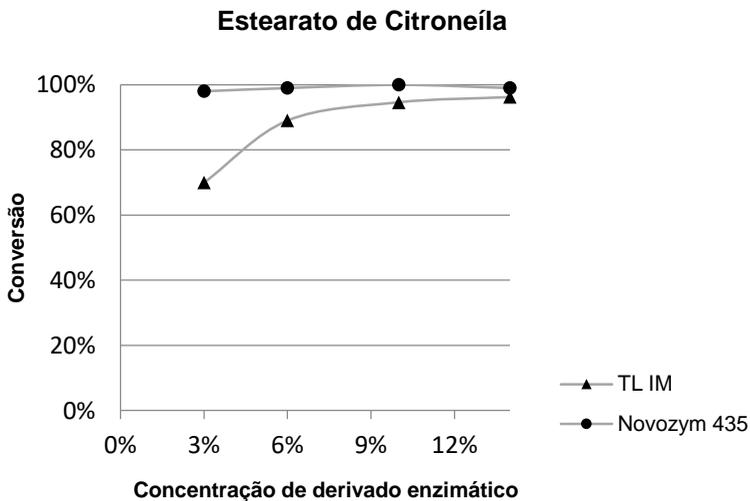
c)



d)



e)



Os ensaios foram realizados na razão molar de 1:1 (ácido:álcool), na presença do solvente hexano, com percentual mássico (massa de derivado enzimático/massa dos substratos) de enzima comercial imobilizada (Lipozyme TL-IM[®] ou Novozym 435[®]), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm durante 1 h (a, b, c) ou 3 h (d, e), a temperatura controlada de 35 °C;

Fonte: A autora.

Para todos os casos, foi acompanhado o aumento da conversão ocasionado pelo aumento de massa de enzima em relação à massa de substratos. Percebe-se que a quantidade enzimática é suficiente quando a linha do gráfico adquire uma linearidade horizontal ao invés de continuar o crescimento, demonstrando velocidade de reação constante.

De acordo com os ensaios de GOMES et al. (2018) onde as enzimas imobilizadas Lipozyme TL-IM[®] e Novozym 435[®] foram quantificadas com base na atividade de esterificação, encontraram-se atividades de 19,3 U/g e 54,6 U/g, respectivamente. A atividade de esterificação foi dada com base em 1 g de derivado enzimático. Com esses dados, foi possível converter os percentuais mássicos em unidade de atividade (U) para cada enzima, em todas as esterificações.

Desta forma, os resultados obtidos como carga enzimática ideal tanto em percentual mássico ($m_{\text{derivado enzimático}}/m_{\text{substratos}}$) quanto em atividade de esterificação, estão apresentados na Tabela 6. Assim, para os experimentos necessários para construção tanto da curva cinética quanto para o reuso enzimático, foram utilizadas as quantidades de enzima elencados na Tabela 6.

Tabela 6: Relação entre a melhor quantidade de derivado enzimático e atividade de esterificação das reações de esterificação

| Produto | Enzima | Quantidade de derivado enzimático (%) | Atividade de esterificação (U) |
|------------------------|-----------------------------|--|---------------------------------------|
| Oleato de geranoíla | Lipozyme TL-IM [®] | 14 | 4,22 |
| Oleato de geranoíla | Novozym 435 [®] | 6 | 7,21 |
| Laurato de geranoíla | Lipozyme TL-IM [®] | 10 | 3,42 |
| Laurato de geranoíla | Novozym 435 [®] | 3 | 2,95 |
| Estearato de geranoíla | Lipozyme TL-IM [®] | 10 | 4,22 |
| Estearato de geranoíla | Novozym 435 [®] | 6 | 7,21 |
| Oleato de citroneíla | Lipozyme TL-IM [®] | 10 | 4,22 |

| | | | |
|-------------------------|-----------------|----|-------|
| Oleato de citroneíla | Novozym 435® | 10 | 11,96 |
| Estearato de citroneíla | Lipozyme TL-IM® | 10 | 4,25 |
| Estearato de citroneíla | Novozym 435® | 3 | 3,6 |

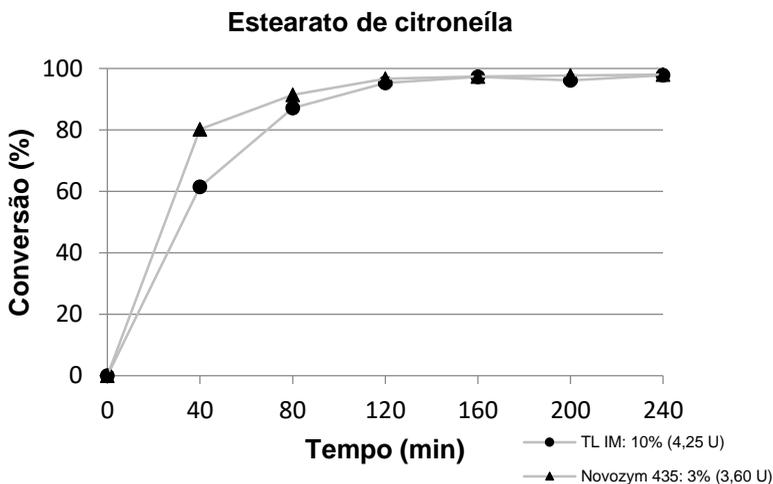
Fonte: A autora.

4.2 CINÉTICAS PARA AS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO

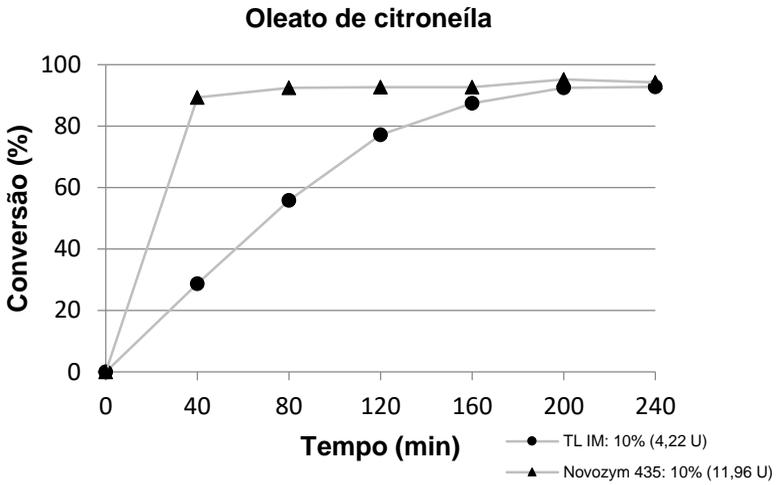
Nesta etapa, foram reunidas as melhores condições de reação encontradas para cada enzima, Novozym 435® e Lipozyme TL-IM®, nos ensaios anteriores e assim realizada a cinética de reações baseadas nas conversões de ésteres ao longo do tempo, avaliando qual das enzimas viria e desempenhar o melhor resultado como catalisador. Os resultados encontram-se na Figura 18.

Figura 18: Cinética dos ésteres nas condições ótimas de reação.

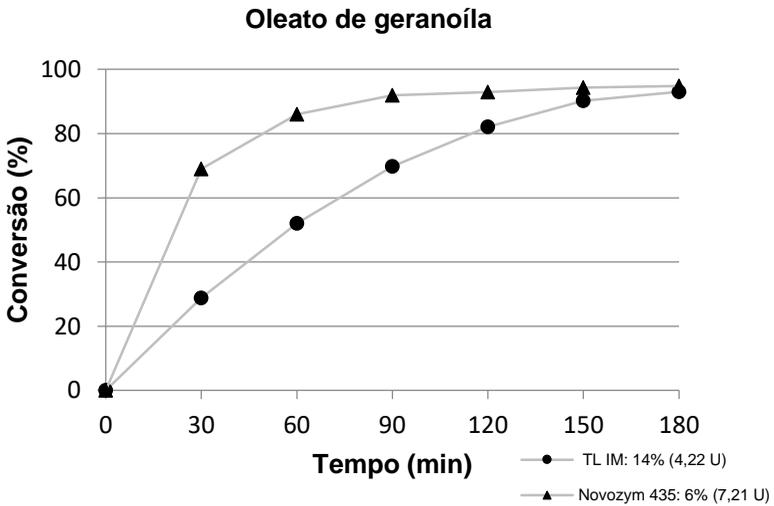
a)



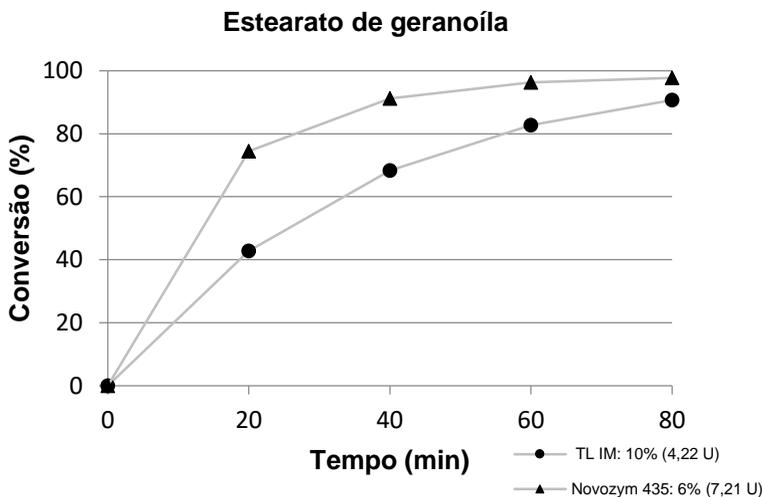
b)



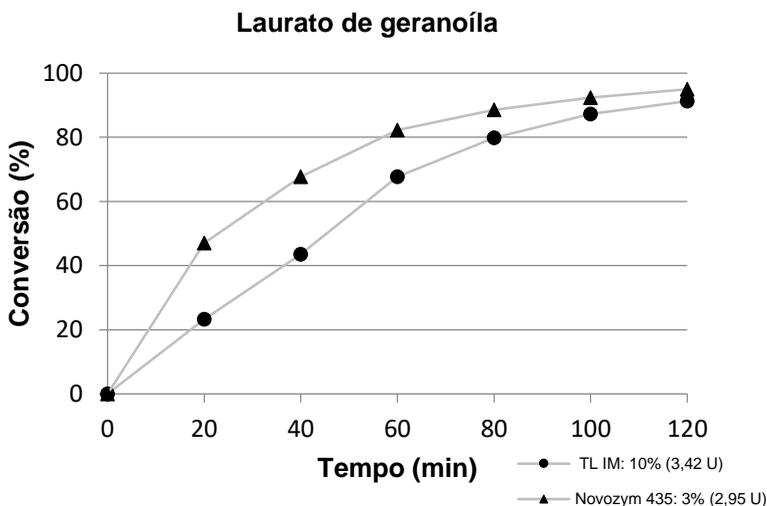
c)



d)



e)



Os ensaios foram realizados na razão molar de 1:1 (ácido:álcool), na presença do solvente hexano (a, d, e) ou sem solvente (b, c), com o melhor percentual para cada éster (conforme discutido na seção 4.1.4) de enzima comercial imobilizada (Lipozyme TL-IM® ou Novozym 435®), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm, a temperatura controlada de 35 °C;
 Fonte: A autora.

Diante desses resultados, destaca-se que para a síntese dos ésteres em questão, ambas as enzimas obtiveram bom desempenho, em meios

reacionais brandos e tempo de reações curtos, onde em no máximo 4 h todos os ésteres estudados atingiram conversões próximas à 100%.

Ao comparar as duas enzimas utilizadas, percebeu-se que, se levado em consideração à quantidade mássica de derivado enzimático (enzima e suporte), em todos os casos a Novozym 435[®] obteve maiores conversões em menores tempos e com menor quantidade de derivado enzimático. Ao observar as cinéticas com base na atividade enzimática em cada caso, pode-se perceber que o resultado se confirmou, embora com pouca diferença. Para o laurato de geranoíla, por exemplo, a atividade total da enzima no meio reacional foi menor quando utilizada a Novozym 435[®] (2,95 U) do que com a Lipozyme TL-IM[®] (3,42 U). Ainda assim a conversão foi maior para os ensaios com a Novozym 435[®] para qualquer tempo observado. O mesmo aconteceu com o estearato de citroneíla, onde, mesmo que com menores diferenças comparadas ao anterior, a Novozym 435[®] (3,60 U) obteve o melhor desempenho comparado à Lipozyme TL-IM[®] (4,25 U), também em todos os tempos.

Desta forma, a Novozym 435[®] obteve melhores conversões em menores tempos e condições brandas de reação, corroborando com os resultados de MARTINS et al., (2014), KIM; PARK, (2017) e BHAVSAR; YADAV, (2018). Esse fato pode estar associado à própria enzima, onde a lipase de *Candida antarctica B* se adaptou melhor tornando-se mais ativa (YADAV; DHOOT, 2009) e menos sensível às condições expostas no meio reacional (MATAA et al., 2017) perante lipase de *T. laguginosus*. Outro fator relacionado é o material no qual essas enzimas foram imobilizadas. Conforme a revisão bibliográfica realizada, na Novozym 435[®] a enzima é envolta a uma resina macroporosa de superfície hidrofóbica (VERDASCO-MARTÍN et al., 2016; JOSÉ et al., 2013). Já na Lipozyme TL-IM[®] a enzima é imobilizada em um gel de sílica de superfície hidrofílica (YANG et al., 2014). Como a superfície da Lipozyme TL-IM[®] é hidrofílica, as moléculas de água produzidas como subproduto nas reações podem ter ficado muito próximas às superfície das enzimas o que pode ter dificultado a difusividade dos substratos no sítio ativo da enzima (GOMES et al., 2018; MENESES et al., 2017).

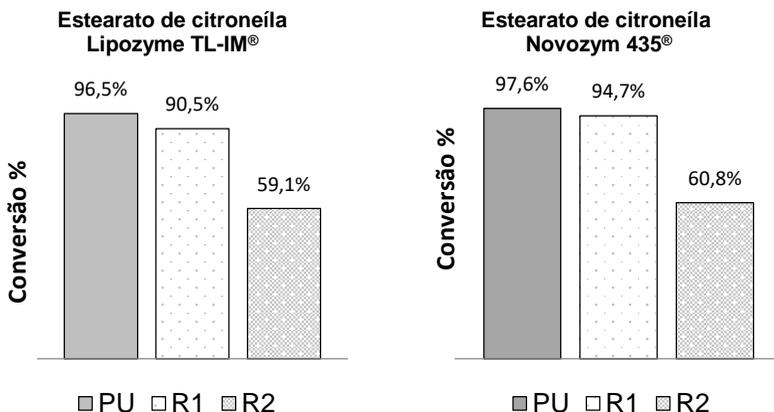
Os resultados encontrados com relação ao desempenho das enzimas comerciais imobilizadas estão de acordo com a síntese de laurato de citroneíla estudada por HABULIN et al. (2008) e também com a síntese de propionato de benzila estudada por GOMES et al. (2018).

4.3 REUTILIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR EM REAÇÕES CONSECUTIVAS

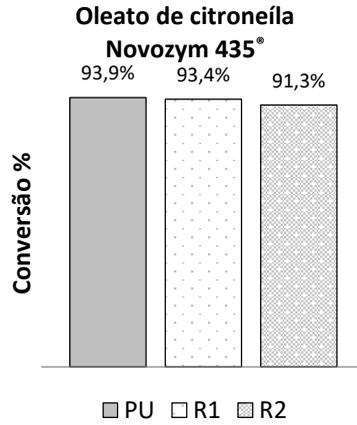
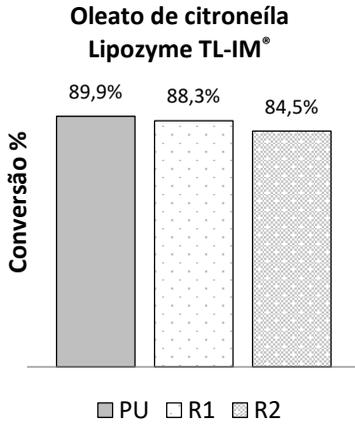
Conforme discutido anteriormente, um dos maiores benefícios do uso de enzima imobilizada é a possibilidade do reuso da mesma em vários ensaios, do ponto de vista econômico (BADGUJAR; BHANAGE, 2014b) e a melhoria da estabilidade operacional das enzimas (DAMNJANOVIC et al., 2012). Foram então avaliados e comparados os rendimentos das enzimas no primeiro uso (PU) e após dois ciclos (R1 e R2) para cada éster estudado e os resultados estão apresentados na Figura 19.

Figura 19: Ensaio de reuso enzimático.

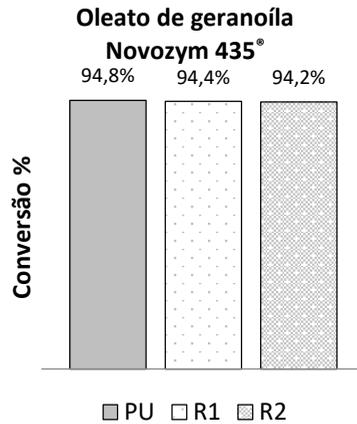
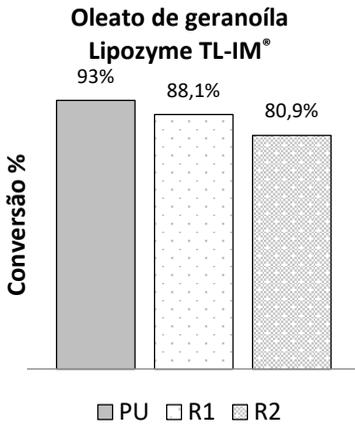
a)



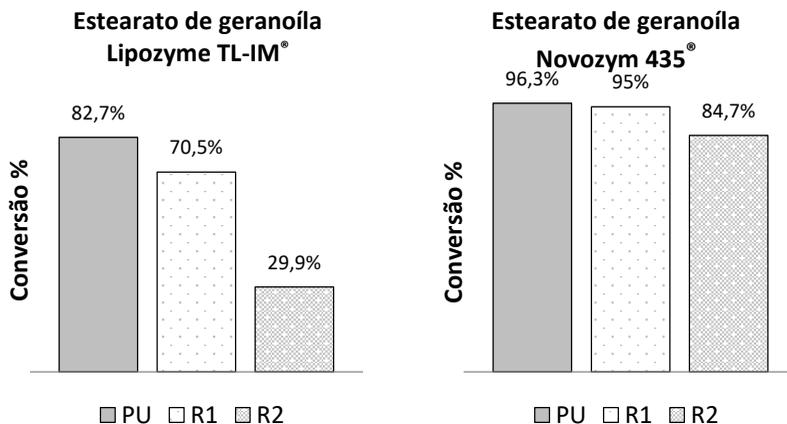
b)



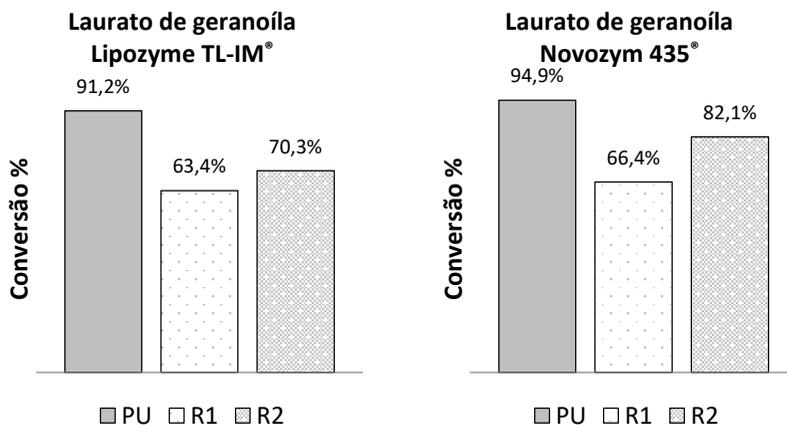
c)



d)



e)



Os ensaios foram realizados na razão molar de 1:1 (ácido:álcool), na presença do solvente hexano (a, d, e) ou sem solvente (b, c), com o melhor percentual para cada éster (conforme discutido na seção 4.1.4) de enzima comercial imobilizada (Lipozyme TL-IM® ou Novozym 435®), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm durante 3 h (a, b, c) ou 2 h (e) ou 1 h (d), a temperatura controlada de 35 °C. PU representa o primeiro uso da enzima e R1 e R2 os ciclos com a enzima sendo reutilizada uma ou duas vezes, respectivamente.

Fonte: A autora.

De modo geral, na medida em que os derivados imobilizados são submetidas à novos experimentos, a conversão tende a diminuir pelo fato

de que a enzima fica a exposição alcoólica e ácida dos substratos (DAMNJANOVIC et al., 2012).

Nos casos estudados, percebeu-se que a exposição alcóolica não influenciou diretamente na redução da conversão, tendo em vista que para os dois álcoois houve exemplos em que a conversão foi mantida próxima ao primeiro uso (oleato de geranoíla e oleato de citroneíla) e outros casos em que foi bastante diminuída (estearato de geranoíla e estearato de citroneíla). Desta forma, leva-se ao entendimento que o responsável pela diminuição na conversão após os ciclos foi a exposição ácida, visto que houve uma queda menos acentuada nas catálises quando o biocatalisador era exposto ao ácido oleico e um decréscimo mais acentuado ao contato dos ácidos esteárico e láurico.

Além disso, foi possível perceber que, em todos os casos, a Novozym 435[®] manteve maiores conversões nos dois ciclos, levando a entender que esta é menos sensível à exposição ácida e que a Lipozyme TL-IM[®] é mais sensível a tal contato (MARTINS et al., 2014). Outro fator que pode estar associado ao menor rendimento da Lipozyme TL-IM[®] é que alguns suportes tornam o reuso enzimático desfavorecido por não conseguir remover completamente o substrato adsorvido, resultando no acúmulo de ácido na superfície do suporte causando limitações difusionais aos substratos que migram da reação para enzima (DAMNJANOVIC et al., 2012).

4.4 REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO LIPASE IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Nesta etapa, serão apresentados os resultados da catálise enzimática com a lipase TL imobilizada em nanopartículas de magnetita.

4.4.1 Síntese dos suportes de NPM-SDS

As nanopartículas de magnetita funcionalizadas com lauril sulfato de sódio (NPM-SDS) estão apresentadas nas figuras a seguir, onde na Figura 20 as partículas estão em suspensão e na Figura 21 mostram-se os suportes após o processo de liofilização, ou seja, secas. Nos dois casos, na imagem da direita há ação de campo magnético provocado pela presença de um ímã.

Figura 20: Suportes NPM-SDS em suspensão



Fonte: A autora.

Figura 21: Suportes NPM-SDS secas



Fonte: A autora.

Conforme a metodologia proposta, o derivado em questão já havia sido caracterizado por HENRIQUES et al. (2018). Segundo a autora, o tamanho médio das partículas obtidas foi de $5,5 \pm 0,3$ nm, a área superficial das partículas é $36,6 \text{ m}^2/\text{g}$, o volume dos poros $0,23 \text{ cm}^3/\text{g}$ e o diâmetro médio dos poros $62,6 \text{ \AA}$. Desta forma, de acordo com a classificação de nanopartículas da IUPAC, os suportes são classificados como um material mesoporoso.

4.4.2 Quantidade de proteínas imobilizadas

Através do método de Bradford descrito anteriormente, foi possível, primeiramente, construir a curva linear padrão e obter a equação da reta (Apêndice A), por meio de análises em amostras conhecidas de proteínas dissolvidas. Com esses dados, foi possível acompanhar a quantidade de enzimas que estavam no sobrenadante e a partir desses dados, calcular a quantidade que estavam sendo adsorvidas nos suportes, em função do tempo de contato. A Tabela 7 traz tais resultados, apresentados pela média de triplicata.

Tabela 7: Resultado da quantificação de proteínas no sobrenadante

| Tempo de agitação | ABS (λ 595 nm) | Quantidade de proteína mg/mL |
|--------------------------|--|---|
| 0 h | 0,231 \pm 0,018 | 0,0694 \pm 0,0127 |
| 0,5 h | 0,046 \pm 0,025 | 0,0202 \pm 0,0145 |
| 1 h | 0,007 \pm 0,005 | 0,0098 \pm 0,0093 |
| 1,5 h | 0,007 \pm 0,004 | 0,0098 \pm 0,0089 |

Fonte: A autora.

Pelos resultados, é possível concluir que dos 0,0694 mg/mL de proteína quantificado inicialmente, 0,0596 mg/mL foram adsorvidos por completo pelos suportes, apresentando 85,88% de adsorção.

4.4.3 Determinação da atividade hidrolítica

Além de quantificar a lipase que estava sendo adsorvida pelos suportes, foi mensurada também, em paralelo, a atividade de hidrólise do sobrenadante no início e no final das imobilizações. Além disso, após a liofilização de cada lote de imobilização realizada, quantificou-se também a atividade no derivado enzimático. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos através da média de triplicata da leitura de absorbância do teste colorimétrico.

Tabela 8: Atividade hidrolítica no sobrenadante

| Tempo de agitação | ABS (λ 348 nm) | Atividade total U/L | Atividade específica U/g |
|--------------------------|--|--------------------------------|-------------------------------------|
| 0 h | 0,763 \pm 0,088 | 1,482 \pm 0,172 | 0,18530 \pm 0,021 |
| 1,5 h | 0,023 \pm 0,107 | 0,004 \pm 0,021 | 0,00056 \pm 0,003 |

Fonte: A autora.

Por meio dos dados relativos às atividades hidrolíticas do sobrenadante, pode-se calcular o rendimento da imobilização realizada, obtendo-se 96,98% de atividade reduzida no sobrenadante. Posteriormente, realizou-se quantificação da atividade no derivado enzimático para que fosse possível comparar os resultados verificando se a atividade enzimática havia sido recuperada do sobrenadante para os suportes. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos através da média de triplicata da leitura de absorbância.

Tabela 9: Atividade hidrolítica no derivado enzimático NPM-TLL

| ABS (λ 348 nm) | Atividade total U/L | Atividade específica U/g |
|--|--------------------------------|-------------------------------------|
| 0,304 \pm 0,021 | 7,496 \pm 0,004 | 0,936 \pm 0,0005 |

Fonte: A autora.

Com estes dados, foi possível calcular o percentual de atividade recuperada na imobilização enzimática realizada, obtendo um percentual de 39,77%. Assim, foi possível concluir que a atividade recuperada não obteve bons resultados. De certa forma, percebeu-se que a lipase TL estava ativa no início da imobilização, mas que, quando adsorvida pelos suportes, apresentou algum problema com relação ao sítio ativo enzimático. Isso não quer dizer que a enzima tenha sido inativada, tendo em vista que a lipase é uma enzima estável do ponto de vista operacional, conforme discutido no ítem 2.2.1 desta dissertação.

Tendo em vista que os suportes de magnetita são classificados como mesoporosos, conforme discutido no ítem 4.4.1 desta dissertação, este possui uma porosidade classificada como mediana. Desta forma, acredita-se que nestes lotes analisados, as moléculas de proteína possam

ter sido depositadas em maior quantidade na superfície do suporte, o que pode ter dificultado a transferência de massa e, conseqüentemente, o acesso ao sítio ativo das mesmas. Esse fato deve estar associado às condições de imobilização ou ao lote da lipase utilizada, tendo em vista que tal método foi desenvolvido por HENRIQUES et al. (2018) que obteve hiperativação na atividade recuperada pela derivado enzimático.

4.4.4 Síntese de ésteres via catálise enzimática NPM-TLL

Ao realizar as esterificações aplicando o derivado enzimático NPM-TLL como catalisador, percebeu-se que vários resultados de conversões foram muito próximos aos obtidos com as enzimas comerciais, e em alguns casos até melhores.

Tabela 10: Reações de esterificação via catálise NPM-TLL.

| Éster | Enzima | Conversão |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------|
| Oleato de geranoíla ^a | Lipozyme TL-IM [®] | 99,8% |
| Oleato de geranoíla ^a | Novozyme 435 [®] | 99,9% |
| Oleato de geranoíla ^a | NPM-TLL | 99,7% |
| Acetato de Citroneíla ^b | Lipozyme TL-IM [®] | 15,9% |
| Acetato de Citroneíla ^b | Novozyme 435 [®] | 20,4% |
| Acetato de Citroneíla ^b | NPM-TLL | 21,2% |
| Oleato de Citroneíla ^a | Lipozyme TL-IM [®] | 67,9% |
| Oleato de Citroneíla ^a | Novozyme 435 [®] | 85,5% |
| Oleato de Citroneíla ^a | NPM-TLL | 59,3% |

Os ensaios foram realizados na razão molar de 1:1 (ácido:álcool), na presença do solvente hexano, com 10% (massa de derivado enzimático / massa de substratos) de enzima imobilizada (Lipozyme TL-IM[®], Novozym 435[®] ou NPM-TLL), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm durante 3 h^a ou 24 h^b, a temperatura controlada de 35 °C;

Fonte: A autora.

A Tabela 10 apresenta os resultados de conversão de substratos em ésteres nas mesmas condições realizadas com as enzimas comerciais. Embora os resultados apresentados pela NPM-TLL tenham sido bastante similares às enzimas comerciais, algumas vezes, no mesmo experimento realizado em duplicata, foram encontradas conversões muito diferentes, conforme constam alguns exemplos na Tabela 11.

Tabela 11: Reações de esterificação via catálise enzimática NPM-TLL com baixas conversões.

| Éster | Tempo | Conversão |
|------------------------|--------------|------------------|
| Oleato de Citroneíla | 3 h | 59,3% |
| Oleato de Citroneíla | 3 h | 0,9% |
| Oleato de Citroneíla | 25 h | 14,1% |
| Oleato de Citroneíla | 25 h | 1,0% |
| Estearato de Geranoíla | 24 h | 45,0% |
| Estearato de Geranoíla | 24 h | 6,0% |
| Oleato de Geranoíla | 3 h | 93,9% |
| Oleato de Geranoíla | 3 h | 0,8% |

Os ensaios foram realizados na razão molar de 1:1 (ácido:álcool), na presença do solvente hexano, com 10 % (massa de derivado enzimático/massa de substratos) de enzima imobilizada (NPM-TLL), em uma câmara incubadora com agitação constante de 200 rpm durante 3, 24 ou 25 h, a temperatura controlada de 35 °C;

Fonte: A autora.

Levando-se em consideração que durante as reproduções de reações de esterificações de produtos iguais, perante as mesmas condições de reação, foram encontradas conversões muito diferentes, entende-se que houve certa instabilidade do derivado afetando diretamente na atividade enzimática do catalisador. Esse fato pode estar relacionado com o tempo no qual o derivado enzimático permanece ativo após a liofilização, como também com as condições de armazenamento do derivado. Outro fator que pode ter influenciado nos resultados negativos, diz respeito à atividade recuperada calculada no item 4.4.3 desta dissertação, onde trata da deposição das proteínas na superfície das partículas dificultado o acesso dos substratos ao sítio ativo da enzima. Tal fato, justifica também a divergência nos resultados do ponto de vista reprodutível das esterificações realizadas.

Diante disso, constatou-se que a NPM-TLL trouxe resultados promissores para a realização de reações de esterificação via catálise enzimática de ésteres terpênicos, pois apresentou certos resultados muito próximos às catálises com imobilizações comerciais. Porém, é necessário

realizar um estudo mais efetivo quanto à atividade de esterificação e em relação à estabilidade do derivado em diferentes tempos e condições de armazenagem além de reavaliar cada etapa da produção do derivado e de imobilização. Desta forma, destina-se esta etapa a trabalhos futuros.

5. CONCLUSÕES

Todos os ésteres estudados, estearato de geranoíla e de citroneíla, oleato de geranoíla e de citroneíla, laurato de geranoíla e acetato de citroneíla, foram sintetizados com conversões muito próximas à 100%, em no máximo 4 h de reação com agitação constante e condições brandas de reação, como temperatura de 35 °C e 1:1 de razão molar. As enzimas imobilizadas comerciais desempenharam a atividade de catálise com sucesso para os cinco ésteres analisados. Apenas para o éster acetato de citroneíla produzido a partir de anidrido acético e citronelol, constatou-se que não foi necessário o uso do biocatalisador.

Foi verificado que as temperaturas testadas no meio reacional (35, 45 ou 55 °C) não influenciaram na velocidade das reações. O uso do solvente foi mantido quando utilizado como substratos os ácidos que são sólidos em temperatura ambiente (láurico e esteárico) e dispensado quando utilizado o ácido que se encontra no estado líquido em temperatura ambiente (oleico). Foi percebido que o excesso de substratos também não favoreceu as reações, resultando na melhor razão molar 1:1.

Ao comparar as cinéticas de reação catalisadas pelas enzimas Novozym 435[®] e Lipozyme TL-IM[®] adotando a melhor carga enzimática para cada derivado enzimático por reação de esterificação, averiguou-se que os dois biocatalisadores obtiveram resultados muito próximos e que a Novozym 435[®] apresentou velocidades de reação levemente melhores.

Com os estudos de reuso enzimático verificou-se que com ambas enzimas obteve-se formação de ésteres mesmo após o segundo reuso das enzimas. Além disso, novamente a Novozym 435[®] obteve o melhor desempenho, proporcionando melhores conversões em decorrência das consecutivas esterificações.

Por fim, foram produzidas nanopartículas de magnetita como suporte enzimático e imobilizado a lipase TL como forma alternativa para catálise enzimática de ésteres terpênicos. Com esta imobilização foi possível adsorver 85% de enzima ativa no suporte, mas a atividade recuperada foi de apenas 40%.

Quando as NPM-TLL foram aplicadas como biocatalisadoras nas reações de esterificação, observou-se que os resultados por um lado se mostraram promissores para tal função apresentando resultados bem próximos às conversões atingidas com as enzimas imobilizadas comerciais, necessitando, porém, de mais estudos para resolver problemas de estabilidade ou reacionais.

Como sugestões para trabalhos futuros, destaca-se uma melhor caracterização dos ésteres produzidos, com relação às aplicabilidades

possíveis em indústrias de alimentos, farmacêuticas, agroindustriais, entre outras. Além disso, para catálise destas reações via NPM-TLL, será necessário um estudo mais efetivo para sanar o problema encontrado na atividade recuperada do derivado enzimático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, A. Z.; SULAIMAN, N. S.; KAMARUDDIN, A. H. Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on aminopropyl-grafted mesoporous SBA-15. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 263–270, 2009.

ADENUBI, O. T. et al. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: A systematic review and meta-analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 123, n. August 2017, p. 779–806, 2018.

ALI, Z. et al. Synthesis of fi brous and non- fi brous mesoporous silica magnetic yolk–shell microspheres as recyclable supports for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 103, n. April, p. 42–52, 2017.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Synthesis of geranyl acetate in non-aqueous media using immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase on biodegradable polymer film: Kinetic modelling and chain length effect study. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 1304–1313, 2014a.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Application of lipase immobilized on the biocompatible ternary blend polymer matrix for synthesis of citronellyl acetate in non-aqueous media: Kinetic modelling study. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 57, p. 16–25, 2014b.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Immobilization of lipase on biocompatible co-polymer of polyvinyl alcohol and chitosan for synthesis of laurate compounds in supercritical carbon dioxide using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1224–1236, 2015.

BEN, N.; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. October, p. 675–706, 2015.

BEZBRADICA, D. et al. The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 97–101, 2007.

BHAVSAR, K. V.; YADAV, G. D. Microwave assisted solvent-free synthesis of n-butyl propionate by immobilized lipase as catalyst. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, n. November 2017, p. 264–269, 2018.

BIAŁECKA-FLORJA, E. et al. Synthesis of 2-phenylethyl acetate in the presence of *Yarrowia lipolytica* KKP 379 biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, p. 241–245, 2012.

BILAL, M. et al. Horseradish peroxidase immobilization by copolymerization into cross-linked polyacrylamide gel and its dye degradation and detoxi fi cation potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 983–990, 2018.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, SP: Blucher, 2001.

CAMPOS, M. DE M. et al. **Química Orgânica**. São Paulo, SP: Editora Edgard Blucher Ltda, 1979.

CHIARADIA, V. et al. Simultaneous single-step immobilization of *Candida antarctica* lipase B and incorporation of magnetic nanoparticles on poly (urea-urethane) nanoparticles by interfacial miniemulsion polymerization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 131, p. 31–35, 2016.

CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. Industrial applications of enzyme biocatalysis : Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1443–1454, 2015.

DAMNJANOVIC, J. J. et al. Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 50–59, 2012.

DHAKE, K. P. et al. Improved activity and stability of *Rhizopus oryzae* lipase via immobilization for citronellol ester synthesis in supercritical carbon dioxide. **Journal of Biotechnology**, v. 156, p. 46–51, 2011.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 197–212, 2010.

FERRAZ, L. I. R. et al. Application of home-made lipase in the production of geranyl propionate by esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 44–48, 2015.

GENNARI, A. et al. Chelation by collagen in the immobilization of *Aspergillus oryzae* - galactosidase: A potential biocatalyst to hydrolyze lactose by batch processes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 303–310, 2018.

GOMES, A. et al. Biocatalysis of aromatic benzyl-propionate ester by different immobilized lipases. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 5, p. 585–591, 2018.

GUPTA, A. et al. Geranyl acetate synthesis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on electrospun polyacrylonitrile nanofiber membrane. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 124–132, 2013.

HABULIN, M. et al. Enzymatic synthesis of citronellol laurate in organic media and in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 6–12, 2008.

HENRIQUES, R. O. **Desenvolvimento de Metodologias para a Imobilização e Coimobilização de Enzimas em Nanopartículas**

Magnéticas. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2016.

HENRIQUES, R. O. et al. Co-immobilization of lipases and β -D-galactosidase onto magnetic nanoparticle supports: Biochemical characterization. **Molecular Catalysis**, v. 453, n. April, p. 12–21, 2018.

INÊS, L. et al. Application of home-made lipase in the production of geranyl propionate by esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 44–48, 2015.

JAVED, S. et al. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23–34, 2018.

JOSÉ, C. et al. Investigation of the stability of Novozym® 435 in the production of biodiesel. **Catalysis Today**, v. 213, p. 73–80, 2013.

JUNQUEIRA, M. et al. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization. **Fuel Processing Technology**, v. 156, p. 421–428, 2017.

KIM, H.; PARK, C. Enzymatic synthesis of phenethyl ester from phenethyl alcohol with acyl donors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 100, p. 37–44, 2017.

LAKOUD, S. G.; DJEROUROU, A. Esterification and etherification of steroid and terpene under Mitsunobu conditions. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. 889–892, 2016.

LEE, D. et al. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 62–66, 2009.

LIGIANARA, N. et al. In situ immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 52–61, 2016.

LIU, D.; CHEN, J.; SHI, Y. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332–342, 2018.

MADHAVAN, A. et al. Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. **Bioresource Technology**, 2017.

MARTINS, A. B. et al. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 18–25, 2014.

MATAA, T. M. et al. Acidity reduction of mammalian fat by enzymatic esterification. **Energy Procedia**, v. 136, p. 000–000, 2017.

MENESES, A. C. DE et al. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 95–105, 2017.

MOHAMAD, N. et al. Simple adsorption of *Candida rugosa* lipase onto multi-walled carbon nanotubes for sustainable production of the flavor ester geranyl propionate. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 32, p. 99–108, 2015.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Organic Chemistry**. United States of America: Allyn and Bacon, Inc., 1983.

MUNCINELLI, E. et al. Pore size effect in the amount of immobilized enzyme for manufacturing carbon ceramic biosensor. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 247, p. 95–102, 2017.

MURCIA, M. D. et al. Kinetic modelling and kinetic parameters calculation in the lipase-catalysed synthesis of geranyl acetate. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 138, p. 135–143, 2018.

NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 931–957, 2017.

PAROUL, N. **Síntese enzimática de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico**. [s.l.] Universidade de Caxias do Sul, 2011.

RAMYASREE, S. et al. Immobilized lipase from *Lactobacillus plantarum* in meat degradation and synthesis of flavor esters. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, p. 8–11, 2017.

RODRIGUES, R. C. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

SATTAR, H. et al. Agar-agar immobilization: An alternative approach for the entrapment of protease to improve the catalytic efficiency, thermal stability and recycling efficiency. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 917–922, 2018.

SCHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering**. Prentice Hall ed. New York: [s.n.].

SERRI, N. A.; KAMARUDDIN, A. H.; LEN, K. Y. T. A continuous esterification of malonic acid with citronellol using packed bed reactor: Investigation of parameter and kinetics study. **Food and Bioprocess Processing**, v. 8, n. December, p. 327–332, 2008.

SIKORA, A. et al. Enantioselective acetylation of (R,S)-atenolol: The use of *Candida rugosa* lipases immobilized onto magnetic chitosan nanoparticles in enzyme-catalyzed biotransformation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, p. 43–50, 2016.

SOLOMONS, T. W. G. **Organic Chemistry**. Florida: John Wiley & Sons, Inc., 1996.

TANG, J. et al. Immobilization of *Y. lipolytica* lipase and the

continuous synthesis of geranyl propionate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, p. 1–6, 2017.

TAO, D. et al. Tuning the acidity of sulfonic functionalized ionic liquids for highly efficient and selective synthesis of terpene esters. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 41, p. 122–129, 2016.

TAVARES, M. et al. Trends in insect repellent formulations: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 539, n. 1-2, p. 190–209, 2018.

TRUSEK HOLOWNIA, A.; NOWORYTA, A. An integrated process: Ester synthesis in an enzymatic membrane reactor and water sorption. **Journal of Biotechnology**, v. 130, p. 47–56, 2007.

TRUSEK-HOLOWNIA, A.; NOWORYTA, A. An integrated process: Ester synthesis in an enzymatic membrane reactor and water sorption. **Journal of Biotechnology**, v. 130, p. 47–56, 2007.

VARMA, M. N.; MADRAS, G. Kinetics of enzymatic synthesis of geranyl butyrate by transesterification in various supercritical fluids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 250–255, 2010.

VERDASCO-MARTÍN, C. M. et al. Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 75–86, 2016.

WEBER, D. **Suportes poliméricos à base de quitosana: preparação, caracterização e aplicações biocatalíticas na síntese de ésteres terpênicos**. Florianópolis SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. England: [s.n.].

XIE, W.; ZANG, X. Immobilized lipase on core-shell structured Fe₃O₄-MCM-41 nanocomposites as a magnetically recyclable biocatalyst for interesterification of soybean oil and lard. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1283–1292, 2016.

YADAV, G. D.; DHOOT, S. B. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 34–39, 2009.

YANG, H. et al. Sn⁻¹, 3-specific Interesterification of Soybean Oil with Medium-chain Triacylglycerol Catalyzed by Lipozyme TL IM ☆. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 1016–1020, 2014.

YOU, P. et al. Carica papaya lipase-catalyzed synthesis of terpene esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 152–158, 2011.

APÊNDICES

Apêndice A: Curva padrão para quantificação de proteínas através do método de Bradford

