

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**SÍNTESE DE ÉSTERES DE AROMA POR LIPASES MICROBIANAS EM
MEIO LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO**

Gabriela Alves Macêdo
Engenheira de Alimentos

Prof.^a Dr.^a Gláucia Maria Pastore
Orientador

PARECER

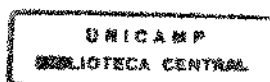
Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
GABRIELA ALVES MACÊDO
aprovada pela Comissão Julgadora
em 12 de dezembro de 1997.

Campinas, 12 de dezembro de 1997.


Profa. Dra. GLÁUCIA M. PASTORE
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Doutor em Ciências de Alimentos

1997



915208
1802516

N.º CHAMADA: 1/UNICAMP
 V. M. 15.1.18
 TCMBO BC/ 3283P
 PROC. 095/98
 C ☐ D ☒ X
 PREÇO 124,11.00
 DATA 28/01/98
 N.º CPD

CM-00105131-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M151s

Macêdo, Gabriela Alves

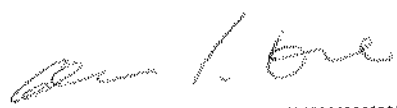
Síntese de ésteres de aroma por lipases microbianas em meio livre de solvente orgânico / Gabriela Alves Macedo. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.

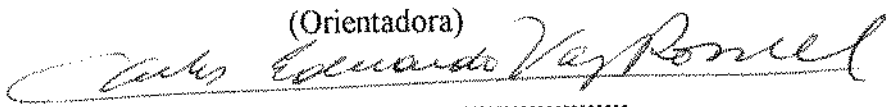
Orientador: Gláucia Maria Pastore

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

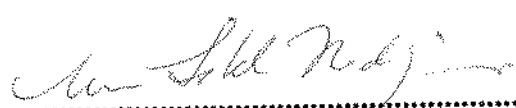
1.Lipase. 2.Ésteres. 3.Aroma. 4.Síntese. I.Pastore, Gláucia Maria. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

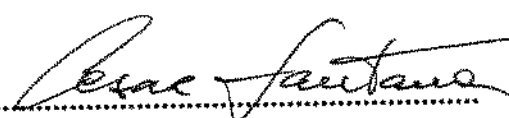
BANCA EXAMINADORA

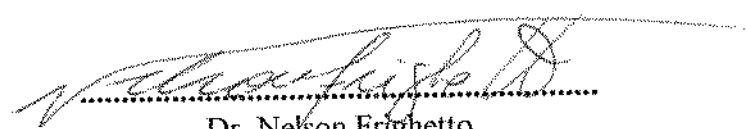

.....
Profª Drª Gláucia Maria Pastore
(Orientadora)


.....
Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossel
(Membro)

.....
Prof. Dr. Nelson C. Durán
(Membro)


.....
Profª Drª Maria Isabel Rodrigues
(Membro)


.....
Prof. Dr. César C. Santana
(Membro)


.....
Dr. Nelson Frighetto
(Suplente)

.....
Prof. Dr. Geraldo Lippel Sant'Anna Jr.
(Suplente)

Campinas, de dezembro de 1997.

*Este trabalho é fruto do companheirismo e incentivo que recebi de meus pais,
meus irmãos e especialmente de meu marido Gabriel.*

A todos vocês, dedico mais esta pequena conquista.

Gabriela

*“Tudo que é digno de ser aprendido
não pode ser ensinado,
pode apenas ser encontrado”.*

Oscar Wilde

AGRADECIMENTOS

À professora Gláucia Maria Pastore por ter propiciado todas as condições para a realização deste trabalho.

À professora Maria Isabel Rodrigues pela atenção, auxílio e amizade que surgiu durante a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores Carlos Vaz Rossel e Nelson Friguetto pela atenção dispensada na avaliação e sugestões ao trabalho .

Ao professor Geraldo Lippel Sant 'Anna, que vem acompanhando e auxiliando meus trabalhos desde a realização do mestrado. Um agradecimento antigo.

Aos professores Nelson C. Durán e César C. Santana, pelas sugestões e auxílio na redação final da tese.

A todos os alunos, professores e funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA pela amizade, colaboração e convívio durante todos os anos de trabalho.

À Margarete Randi Moraes pela atenção e auxílio sempre presentes.

Aos funcionários e professores da FEA com os quais convivi desde 1991, enquanto aluna de graduação, especialmente àqueles que me acompanharam de perto nesta jornada.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

ÍNDICE GERAL

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Considerações gerais sobre lipases.....	4
3.1.1. Classificação.....	4
3.1.2. Fontes e produção de lipases.....	5
3.1.3. Propriedades gerais das lipases.....	6
3.1.4. Especificidade e estereoespecificidade.....	6
3.2. Aplicações industriais das lipases.....	7
3.2.1. Interesterificação de óleos e gorduras.....	8
3.2.2. Avaliação de plásticos biodestrutíveis.....	9
3.2.3. Produção de monoglicerídeos.....	9
3.2.4. Produção de compostos opticamente ativos.....	10
3.2.5. Produção de amidas.....	10
3.2.6. Tratamento de efluentes.....	11
3.2.7. Indústria de papel.....	11
3.2.8. Indústria de detergentes.....	11
3.2.9. Produção de lipídeos com fins nutracêuticos.....	12
3.2.10. Produção de ésteres.....	12
3.2.11. Síntese de compostos de aroma e fragrâncias.....	16
3.3. Considerações sobre Aromas e Fragrâncias.....	17
3.3.1. O mercado de aromas e fontes de obtenção.....	17
3.3.2. Biotecnologia na produção de aromas.....	18
3.4. Lipases como biocatalisadores na síntese de ésteres de aroma.....	19

4. MATERIAIS.....	38
5.METODOLOGIA.....	39
5.1. Estudos preliminares para seleção de lipases e substratos para a síntese de ésteres em meio aquoso	
5.1.1. Seleção dos ésteres de interesse.....	39
5.1.2. Seleção das lipases.....	40
5.1.2.1. Produção das lipases microbianas.....	40
5.1.2.2. Determinação da atividade lipolítica e concentração de proteína.....	42
5.1.3. Seleção dos substratos.....	43
5.1.3.1. Condições da reação de esterificação.....	44
5.1.3.2. Análise dos resultados e cálculo da porcentagem de esterificação.....	44
5.2. Estudo da otimização da síntese dos ésteres acetato, butirato e propionato de isoamila utilizando Planejamento Experimental e Análise da Superfície de Resposta.	
5.2.1. Introdução aos métodos de Planejamento Experimental na Otimização de processos.....	45
5.2.2. Definição das variáveis de processo e os níveis a serem estudados.....	48
5.2.2.1. Estudos iniciais para definição das variáveis de processo...48	
5.2.2.2. Definição dos níveis para a variável temperatura.....	49
5.2.2.3. Definição dos níveis para a variável concentração enzimática.....	49
5.2.2.4. Comparação entre as lipases de <i>Geotrichum sp</i> e <i>Rhizopus sp</i>	50
5.2.2.5. Definição dos níveis para a variável relação molar entre os substratos.....	50
5.2.2.6. Delineamento experimental dos ensaios.....	50
5.2.3. Condições das reações de esterificação.....	52
5.2.4. Análise e quantificação dos ésteres por Cromatografia Gasosa - FID.....	53
5.2.5. Análise por Cromatografia Gasosa com detetor seletivo de massa.....	54

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Resultados dos estudos preliminares para seleção das lipases e substratos a serem empregados.....	55
6.2. Obtenção de propionato de isoamila	77
6.3. Obtenção de butirato de isoamila	94
6.4. Obtenção de acetato de isoamila	107
7.CONCLUSÕES.....	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
ANEXOS.....	133
ANEXO 1- Listagem dos compostos comercializados pela Fleurchem Inc..	134
ANEXO 2- Dados numéricos da seleção das lipases e substratos.....	135
ANEXO 3- Ilustração dos cromatogramas de quantificação e identificação dos ésteres acetato, butirato e propionato de isoamila.....	140

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Exemplo de preparações de lipases comercializadas.....	5
TABELA 2 - Aplicações industriais das lipases.....	8
TABELA 3 - Aplicações comerciais de ésteres.....	13
TABELA 4 - Síntese de ésteres por lipases.....	14
TABELA 5 - Ésteres de aroma comercializados pela Fleurchem Inc.....	39
TABELA 6 - Variáveis e níveis para Delineamento experimental 1.....	50
TABELA 7 - Delineamento experimental 1 em valores codificados.....	51
TABELA 8 - Delineamento experimental 1 em valores reais.....	52
TABELA 9 - Concentração de água nos substratos.....	53
TABELA 10 - Concentração inicial de água nos sistemas de síntese	53
TABELA 11 - Resultados obtidos para o planejamento experimental 1 com a lipase de <i>Geotrichum sp</i> na síntese de propionato de isoamila.....	79
TABELA 12 - Efeitos calculados para o planejamento experimental 1 com a lipase de <i>Geotrichum sp</i> na síntese de propionato de isoamila.....	79
TABELA 13 - Resultados obtidos para o planejamento experimental 1 com a lipase de <i>Rhizopus sp</i> na síntese de propionato de isoamila.....	81
TABELA 14 - Efeitos calculados para o planejamento experimental 1 com a lipase de <i>Rhizopus sp</i> na síntese de propionato de isoamila.....	81
TABELA 15 - Variáveis e níveis para o delineamento experimental 2 ³ + estrela + ponto central para síntese do propionato de isoamila.....	82
TABELA 16 - Delineamento experimental 2 ³ + estrela+ ponto central para síntese do propionato de isoamila em valores codificados.....	83
TABELA 17 - Delineamento experimental 2 ³ + estrela+ ponto central para síntese do propionato de isoamila em valores reais.....	83
TABELA 18 - Resultados obtidos para o Planejamento Experimental 2 com a lipase de <i>Rhizopus sp</i> na síntese de propionato de isoamila.....	87
TABELA 19 - Efeitos calculados para o Planejamento Experimental 2 com a lipase de <i>Rhizopus sp</i> na síntese de propionato de isoamila.....	87
TABELA 20 - Análise de Variância - Propionato de Isoamila.....	88
TABELA 21 - Resultados obtidos para o Planejamento Experimental 1 com a lipase de <i>Geotrichum sp</i> na síntese de butirato de isoamila.....	96
TABELA 22 - Efeitos calculados para o Planejamento Experimental 1 com a lipase de <i>Geotrichum sp</i> na síntese de butirato de isoamila.....	96
TABELA 23 - Resultados obtidos para o Planejamento Experimental 1 com a lipase de <i>Rhizopus sp</i> na síntese de butirato de isoamila.....	98
TABELA 24 - Efeitos calculados para o Planejamento Experimental 1 com a lipase de <i>Rhizopus sp</i> na síntese de butirato de isoamila.....	98
TABELA 25 - Variáveis e níveis para o Delineamento Experimental 2 para síntese do butirato de isoamila.....	100

TABELA 26 -	Delineamento experimental 2^2 + estrela+ ponto central para síntese do butirato de isoamila em valores codificados.....	100
TABELA 27 -	Delineamento experimental 2^2 + estrela+ ponto central para síntese do butirato de isoamila em valores reais.....	101
TABELA 28 -	Resultados obtidos para o Planejamento Experimental 2 com a lipase de <i>Rhizopus sp</i> na síntese de butirato de isoamila.....	103
TABELA 29 -	Efeitos calculados para o Planejamento Experimental 2 com a lipase de <i>Rhizopus sp</i> na síntese de butirato de isoamila.....	104
TABELA 30 -	Análise de Variância - Butirato de Isoamila.....	104
TABELA 31 -	Resultados obtidos para o Planejamento Experimental 1 com a lipase de <i>Geotrichum sp</i> na síntese de acetato de isoamila.....	109
TABELA 32 -	Efeitos calculados para o Planejamento Experimental 1 com a lipase de <i>Geotrichum sp</i> na síntese de acetato de isoamila.....	109
TABELA 33 -	Resultados obtidos para o Planejamento Experimental 1 com a lipase de <i>Rhizopus sp</i> na síntese de acetato de isoamila.....	111
TABELA 34 -	Efeitos calculados para o Planejamento Experimental 1 com a lipase de <i>Rhizopus sp</i> na síntese de acetato de isoamila.....	111
TABELA 35 -	Variáveis e níveis para o Delineamento Experimental 2 para síntese do acetato de isoamila.....	113
TABELA 36 -	Delineamento experimental 2^2 + estrela+ ponto central para síntese do acetato de isoamila em valores codificados.....	113
TABELA 37 -	Delineamento experimental 2^2 + estrela+ ponto central para síntese do acetato de isoamila em valores reais.....	114
TABELA 38 -	Resultados obtidos para o Planejamento Experimental 2 com a lipase de <i>Rhizopus sp</i> na síntese de acetato de isoamila.....	116
TABELA 39 -	Efeitos calculados para o Planejamento Experimental 2 com a lipase de <i>Rhizopus sp</i> na síntese de acetato de isoamila.....	117
TABELA 40 -	Análise de Variância - Acetato de Isoamila.....	117

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1- Processos para obtenção de aromas naturais.....	18
FIGURA 2- Tecnologia enzimática relacionada a aromas para alimentos.....	19
FIGURA 3- Atividade enzimática e concentração proteica das lipases.....	42
FIGURA 4 - Resultados da seleção da lipase de <i>Geotrichum sp</i>	
A- Síntese de ésteres de metanol.....	56
B- Síntese de ésteres de etanol.....	56
C- Síntese de ésteres de propanol.....	56
D- Síntese de ésteres de isopropanol.....	56
E- Síntese de ésteres de butanol.....	56
F- Síntese de ésteres de isobutanol.....	56
G- Síntese de ésteres de isopentanol.....	57
H- Síntese de ésteres de óleo fúsel.....	57
I- Síntese de ésteres de citrônolol.....	57
J- Maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de <i>Geotrichum sp</i>	57
FIGURA 5 Resultados da seleção da lipase de <i>Alcaligenes sp</i> .	
A- Síntese de ésteres de metanol.....	59
B- Síntese de ésteres de etanol.....	59
C- Síntese de ésteres de propanol.....	59
D- Síntese de ésteres de isopropanol.....	59
E- Síntese de ésteres de butanol.....	59
F- Síntese de ésteres de isobutanol.....	59
G- Síntese de ésteres de isopentanol.....	60
H- Síntese de ésteres de óleo fúsel.....	60
I- Síntese de ésteres de citrônolol.....	60
J- Maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de <i>Alcaligenes sp</i>	60
FIGURA 6 Resultados da seleção da lipase de <i>Aspergillus sp</i> -1060	
A- Síntese de ésteres de metanol.....	62
B- Síntese de ésteres de etanol.....	62
C- Síntese de ésteres de propanol.....	62
D- Síntese de ésteres de isopropanol.....	62
E- Síntese de ésteres de butanol.....	62
F- Síntese de ésteres de isobutanol.....	62
G- Síntese de ésteres de isopentanol.....	63
H- Síntese de ésteres de óleo fúsel.....	63
I- Síntese de ésteres de citrônolol.....	63
J- Maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de <i>Aspergillus sp</i> -Lb 1068...63	63
FIGURA 7 Resultdos da seleção da lipase de <i>Aspergillus sp</i> - 1099	
A- Síntese de ésteres de metanol.....	64
B- Síntese de ésteres de etanol.....	64
C- Síntese de ésteres de propanol.....	64

D-	Síntese de ésteres de isopropanol.....	64
E-	Síntese de ésteres de butanol.....	64
F-	Síntese de ésteres de isobutanol.....	64
G-	Síntese de ésteres de isopentanol.....	65
H-	Síntese de ésteres de óleo fúsel.....	65
I-	Síntese de ésteres de citrônolol.....	65
J-	Maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de <i>Aspergillus sp</i> - 1099.....	65
FIGURA 8	Resultados da seleção da lipase de <i>Rhizopus sp</i>	
A-	Síntese de ésteres de metanol.....	67
B-	Síntese de ésteres de etanol.....	67
C-	Síntese de ésteres de propanol.....	67
D-	Síntese de ésteres de isopropanol.....	67
E-	Síntese de ésteres de butanol.....	67
F-	Síntese de ésteres de isobutanol.....	67
G-	Síntese de ésteres de isopentanol.....	68
H-	Síntese de ésteres de óleo fúsel.....	68
I-	Síntese de ésteres de citrônolol.....	68
J-	Maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de <i>Rhizopus sp</i>	68
FIGURA 9	Resultados da seleção da lipase de <i>Candida rugosa</i>	
A-	Síntese de ésteres de metanol.....	70
B-	Síntese de ésteres de etanol.....	70
C-	Síntese de ésteres de propanol.....	70
D-	Síntese de ésteres de isopropanol.....	70
E-	Síntese de ésteres de butanol.....	70
F-	Síntese de ésteres de isobutanol.....	70
G-	Síntese de ésteres de isopentanol.....	71
H-	Síntese de ésteres de óleo fúsel.....	71
I-	Síntese de ésteres de citrônolol.....	71
J-	Maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de <i>Candida rugosa</i>	71
FIGURA 10-	Resumo das maiores taxas de conversão obtidas na seleção.....	76
FIGURA 11-	Planejamento Experimental 1 para propionato de isoamila com <i>Geotrichum</i> <i>sp</i>	78
FIGURA 12-	Planejamento Experimental 1 para propionato de isoamila com <i>Rhizopus</i> <i>sp</i>	80
FIGURA 13-	Planejamento Experimental 2 para propionato de isoamila	86
FIGURA 14-	Valores Observados vs. Valores previstos - Propionato de isoamila.....	88
FIGURA 15-	Efeito da relação molar e concentração enzimática na porcentagem de esterificação de propionato de isoamila após 48 horas de reação e temperatura de 50 °C	
	(a) Superfície de Resposta e (b) Curvas de contorno.....	91
FIGURA 16-	Efeito da relação molar e temperatura na porcentagem de esterificação de propionato de isoamila após 48 horas de reação com 5,5 % de lipase.	
	(a) Superfície de Resposta e (b) Curvas de contorno.....	92
FIGURA 17-	Efeito da concentração enzimática e temperatura na porcentagem de	

	esterificação de propionato de isoamila após 48 horas de reação com RM de (3:1)	
	(a) Superfície de Resposta e (b) Curvas de contorno.....	93
FIGURA 18-	Planejamento Experimental 1 para butirato de isoamila com <i>Geotrichum</i> <i>sp.</i>	95
FIGURA 19-	Planejamento Experimental 1 para butirato de isoamila com <i>Rhizopus sp.</i>	97
FIGURA 20-	Planejamento Experimental 2 para butirato de isoamila	103
FIGURA 21-	Valores Observados vs. Valores previstos - Butirato de isoamila.....	104
FIGURA 22-	Efeito da relação molar e concentração enzimática na porcentagem de esterificação de butirato de isoamila após 48 horas de reação e temperatura de 40°C	
	(a) Superfície de Resposta e (b) Curvas de contorno.....	106
FIGURA 23-	Planejamento Experimental 1 para acetato de isoamila com <i>Geotrichum sp.</i>	108
FIGURA 24-	Planejamento Experimental 1 para acetato de isoamila com <i>Rhizopus sp.</i>	110
FIGURA 25-	Planejamento Experimental 2 para acetato de isoamila	116
FIGURA 26-	Valores Observados vs. Valores previstos - Acetato de isoamila.....	117
FIGURA 27-	Efeito da relação molar e concentração enzimática na porcentagem de esterificação de acetato de isoamila após 48 horas de reação e temperatura de 40°C	
	(a) Superfície de Resposta e (b) Curvas de contorno.....	120

RESUMO

A síntese por esterificação direta de 54 ésteres de cadeia curta, componentes de aroma, foi testada utilizando lipases microbianas não comerciais de *Geotrichum sp*, *Alcaligenes sp*, *Aspergillus linhagens 1068 e 1099 sp*, *Rhizopus sp* e a lipase comercial de *Candida rugosa*.

Os ésteres testados foram os derivados dos ácidos acético, butírico, propiônico e láurico com os álcoois metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, isopentanol, citrionelol e óleo fúsel, constituído por uma mistura de álcoois onde predomina o álcool isoamílico. As lipases não comerciais foram produzidas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da UNICAMP.

A síntese foi realizada em meio livre de solvente orgânico e adição de água. Muitos ésteres foram sintetizados com boas taxas de conversão, as quais dependeram do tipo de substrato e da especificidade da lipase empregada.

Foram selecionadas as lipases de *Geotrichum sp* e *Rhizopus sp* bem como os ésteres acetato, propionato e butirato de isoamila, para o estudo e otimização das condições de síntese.

Foi realizado um delineamento experimental inicial do tipo fatorial completo com pontos centrais a fim de se avaliar o efeito das variáveis: temperatura, relação molar entre substratos, quantidade de lipase e tipo de lipase no processo. Como resultado deste delineamento experimental inicial foi selecionada a lipase de *Rhizopus sp* dentre as duas lipases testadas por ter apresentado melhor rendimento e produtividade na síntese dos três ésteres. A concentração enzimática e relação molar entre os substratos foram as variáveis mais importantes na síntese dos ésteres acetato e butirato de isoamila. Para a síntese do propionato, a temperatura também foi importante no processo.

Em seguida foi realizado um segundo delineamento experimental fatorial completo com dois níveis mais os pontos central e axiais, totalizando 5 condições para cada variável estudada na síntese de cada éster a fim de se otimizar as condições do processo proposto para a síntese dos ésteres acetato, propionato e butirato de isoamila.

Baseado nos resultados obtidos, foi possível estabelecer as condições ótimas para a síntese de acetato e butirato de isoamila: relação molar entre ácido e álcool de (1,5 :1), concentração enzimática em massa dos reagentes de 5,5 %, temperatura de 40 °C, após 48 horas de reação.

Foi também possível estabelecer as condições ótimas para a síntese de propionato de isoamila: relação molar entre ácido e álcool de (3 :1), concentração enzimática em massa dos reagentes de 5,5 %, temperatura de 50 °C, após 48 horas de reação.

SUMMARY

The preparative synthesis of 54 short chain flavour esters by non commercial lipases from *Geotrichum sp*, *Rhizopus sp*, *Aspergillus sp*, *Alcaligenes sp* and commercial *Candida rugosa*, was investigated in organic solvent free medium. Acetic, propionic, butyric and lauric acids as well as methanol, ethanol, butanol, i-butanol, propanol, i-propanol, i-pentanol, citronellol and fusel oil, were used as substrates. The non commercial lipases were isolated and produced in the Laboratório de Bioquímica de Alimentos of UNICAMP. Most of the esters were synthesized in good yield by at least one of the lipase specificity toward the acid or alcohol moiety of the ester.

It was selected the lipases from *Geotrichum sp* and *Rhizopus sp* to continue the study and optimize the synthesis of isoamyl acetate, butyrate and propionate esters. A two level Factorial Design (with central point) was used to evaluate the effects of synthetic variables, such as temperature, molar ratio of isoamyl to acid, enzyme amount and type of lipase used.

Rhizopus sp lipase was the most effective in the synthesis. Molar ratio and amount of lipase were the most important variables for the isoamyl acetate and butyrate synthesis. Temperature was important to propionate synthesis.

Another five level central composite design were used to optimize the synthesis of these three esters.

Based on surface plots, optimum conditions to the isoamyl acetate and butyrate synthesis were: time reaction 48 hours, temperature 40°C, enzyme amount 5,5 % and molar ratio (alcohol: acid) (1,5:1).

Based on surface plots, optimum conditions to the isoamyl propionate synthesis were: time reaction 48 hours, temperature 50°C, enzyme amount 5,5 % and molar ratio (alcohol: acid) (3:1).

1. INTRODUÇÃO

Triacil glicerol hidrolases, as lipases, são enzimas que pertencem ao grupo das serina hidrolases (E.C. 3.1.1.3) e catalisam preferencialmente a hidrólise de acilglicerídeos na interface óleo / água . As reações hidrolíticas catalisadas por lipases são essencialmente reversíveis e o potencial destas enzimas na síntese de ésteres tem sido bem documentado.

O reconhecimento das vantagens da utilização de lipases em relação aos processos químicos convencionais tem estimulado a produção e a utilização dessas enzimas pela indústria.

Estudos sobre a capacidade das lipases em catalisar reações de síntese de ésteres têm sido realizados principalmente pelas vantagens que a síntese enzimática apresenta frente às reações de síntese convencionais. Há lipases comerciais com grande capacidade, relatada na literatura, em catalisar a síntese de ésteres com estereoespecificidade, pureza e alto grau de rendimento. As reações podem ocorrer com variados substratos desde ácidos e álcoois de baixo e alto peso molecular até aminas e amidas.

Ésteres de ácidos carboxílicos são componentes importantes de aromas naturais usados na indústria alimentícia que contribuem na formação dos aromas em alimentos. Pode-se citar como exemplos os ésteres butirato de etila e acetato de isoamila que são, respectivamente, encontrados nos aromas de morango e banana.

Dentre os ésteres de ácidos graxos, os de baixo peso molecular representam uma importante classe de aromas. Muitos deles são responsáveis por odores de frutas e fragrâncias de alimentos, que são constituídos principalmente por ácidos e seus derivados, especialmente os ésteres de cadeia curta como acetatos, propionatos e butiratos.

São conhecidos muitos ésteres componentes de aromas naturais que têm sido obtidos de fonte natural ou por métodos tradicionais de síntese química. O custo desses processos é elevado em função do grau de pureza e estereoespecificidade requeridos. Os ésteres produzidos por síntese química não podem ser considerados aromas naturais sendo, portanto, menos valorizados no mercado que os ésteres obtidos de fontes naturais. Já aqueles produzidos por via biotecnológica podem ser considerados naturais.

Devido à complexidade de muitos aromas naturais, tanto em relação à composição, como estrutura química individual, a aplicação de métodos biotecnológicos, particularmente enzimáticos, na produção destes produtos tem atraído muita atenção desde a última década. Adicionalmente, aromas produzidos biotecnologicamente podem ser caracterizados como “naturais” ou “idênticos ao

natural” e portanto são preferidos pelo mercado consumidor. A presença de aromas adiciona valor ao produto em tal magnitude que o custo da biocatálise passa a ser menos significativo. Durante os últimos 15 anos, processos biotecnológicos têm-se estabelecido nas indústrias de aroma para produção de aromatizantes naturais.

O principal objetivo deste trabalho foi demonstrar a habilidade de preparações brutas de lipases não comerciais na síntese de ésteres componentes de aromas em alimentos, em sistema reacional livre de solvente orgânico, sistema cujas vantagens serão expostas posteriormente.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é investigar a habilidade de preparações brutas de lipases microbianas não comerciais em sintetizar ésteres formadores de aromas de alimentos em sistema reacional livre de solventes orgânicos.

A procura por aromatizantes para alimentos que sejam considerados naturais, motivou a investigação de um processo de síntese que empregasse novos biocatalisadores em sistema reacional livre de solventes orgânicos, a fim de se obter a recuperação e aplicação dos produtos mais facilmente.

Finalmente, diante de um vasto conjunto de variáveis de processo o que resulta em um grande número de ensaios exploratórios, fez-se necessária a utilização da técnica de planejamento experimental propiciando inclusive a otimização dos processos de síntese propostos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

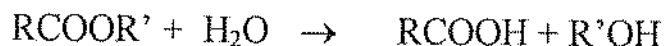
3.1. Considerações gerais sobre lipases

3.1.1. Classificação

As lipases pertencem ao grupo das serina hidrolases (E.C. 3.1.1.3) . Os triglicerídeos são os substratos naturais e o modo de ação das lipases está relacionado às suas propriedades de atuar na interface óleo/ água dos sistemas bifásicos. (BORGSTON & BROCKMAN, 1984; MUKESH e col., 1997).

As lipases são capazes de catalisar as seguintes reações :

1. Hidrólise:



2. Esterificação:



3. Transesterificação :

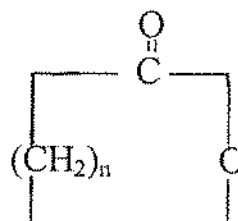
(LINKO & WU, 1996)

- Alcolise : $\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{OH} \rightarrow \text{RCOOR}'' + \text{R}'\text{OH}$
- Acidólise: $\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{COOH} \rightarrow \text{RCOOR}'' + \text{R}'\text{COOR}''$
- Interesterificação: $\text{RCOOR}' + \text{R}''\text{COOR}''' \rightarrow \text{RCOOR}'' + \text{R}'\text{COOR}'''$

4. Lactonização: $\text{RCOO}-(\text{CH}_2)_n-\text{OH} \rightarrow$

(Esterificação intramolecular)

(GATFIELD, 1997)



3.1.2. Fontes e produção de lipases

Lipases podem ser encontradas em tecidos e secreções animais e vegetais. Podem ser produzidas por fermentação empregando diferentes espécies de microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras (BORGSTON & BROCKMAN, 1984).

Do ponto de vista industrial e econômico, as lipases microbianas são mais importantes pois podem ser produzidas em grandes quantidades com mais facilidade que as demais (tabela 1).

TABELA 1 - Exemplos de preparações de lipases comercializadas reportadas em (VORDERMULBECKE e col., 1992).

LIPASES	FONTES COMERCIAIS
<i>Aspergillus niger</i>	Amano, Roehm
<i>Rhizopus delemar</i>	Amano, Biocatalysis
<i>Porcine pancreas</i>	Fluka, Serva, Sigma, Merck,
<i>Candida cylindracea</i>	Amano, Sigma, Genzyme Biochemicals
<i>Candida lipolytica</i>	Amano, Biocatalysis, Fluka
<i>Geotrichum candidum</i>	Amano, Biocatalysis
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano
<i>Mucor javanicus</i>	Amano
<i>Rhizopus niveus</i>	Amano, Fluka,
<i>Mucor miehei</i>	Gist-Brocades, Biocatalysis
<i>Wheat germ</i>	Sigma
<i>Aspergillus oryzae</i>	Roehm
<i>Bacillus subtilis</i>	Roehm
<i>Pregastric esterase</i>	Biocon
<i>Lipoprotein lipase</i>	Biocon
<i>Cholesterol esterase</i>	Biocon
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Gist-Brocades, Fluka
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Genzyme Biochemicals
<i>Pseudomonas sp</i>	Genzyme Biochemicals
<i>Biolipase A</i>	Biocon
<i>Penicillium sp</i>	Amano
<i>Penicillium roquefortii</i>	Amano, Biocatalysis
<i>Humicola lanuginosa</i>	Amano, Biocatalysis
<i>Lipomod AC</i>	Biocatalysis
<i>Lipomod RD</i>	Biocatalysis
<i>Animal lipase</i>	Biocatalysis
<i>Penicillium cyclopium</i>	Biocatalysis
<i>Rhizopus japonicus</i>	Biocatalysis
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Fluka

Embora os estudos científicos tenham se concentrado mais na aplicação dessas enzimas, alguns grupos de pesquisa ainda se dedicam ao isolamento de novos microrganismos produtores de lipase. Isto tem sido considerado muito importante,

no sentido de se conseguir sempre lipases novas com características diferenciadas de atuação, tanto nas reações de hidrólise como nas reações de síntese.

3.1.3. Propriedades gerais das lipases

O peso molecular das lipases pode variar de 20000 a 200000 daltons dependendo de sua fonte de origem. As lipases podem ser ativas na faixa de pH entre 4 e 9 e à temperaturas que variam de ambiente a 70°C. De modo geral, são enzimas que são ativadas quando encontram a interface óleo/água, ligando-se ao substrato e à água com suas porções hidrofóbica e hidrofílica respectivamente.

Podem ser diferenciadas das esterases por que além de atuarem na interface óleo/água preferem ácidos graxos de cadeia longa como substratos.

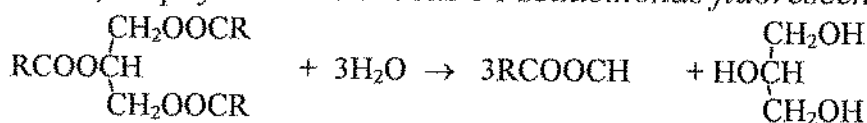
Algumas lipases podem ser consideradas induzíveis, ou seja, sua síntese pode ser induzida ou suprimida pela presença de determinados compostos no meio fermentativo. Sua produção é inibida na presença de açúcares simples como glicose ou frutose ou ainda quando glicerol está presente no meio de fermentação. Por outro lado, ácidos graxos e lipídeos, incluindo triglicerídeos, podem efetivamente estimular a produção ou síntese da enzima. Os meios fermentativos são formulados geralmente usando polissacarídeos complexos como amido ou trigo, triglicerídeos ou ácidos graxos como fonte de carbono e energia. As fontes de nitrogênio provêm de peptonas, extrato de carne ou caseína hidrolisada (MACRAE & HAMMOND, 1985).

O reconhecimento das vantagens na utilização de lipases em relação aos processos químicos convencionais tem estimulado tanto a produção quanto a utilização dessas enzimas na indústria (WU e col, 1996).

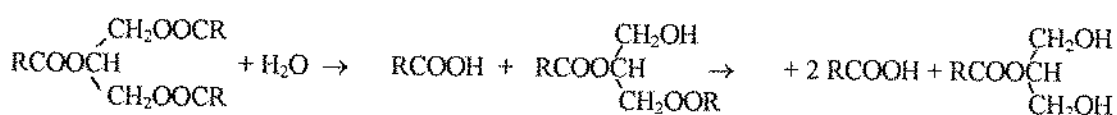
3.1.4. Especificidade e Estereoespecificidade

Uma grande vantagem dos uso das lipases em relação às reações químicas convencionais reside no fato destas enzimas apresentarem, ou não, especificidade que pode ser dividida em tres grupos principais, segundo MACRAE & HAMMOND, 1985 e SONNET, 1988 :

1) Lipases não específicas: Catalisam a hidrólise completa do triglicerídeo em ácidos graxos e glicerol, apresentando mono e diglicerídeos como intermediários, atuando de modo aleatório. As lipases de *Candida cylindracea*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* pertencem a esse grupo.



2) Lipases 1,3 específicas : Na presença dessas lipases, os triglicerídeos são hidrolisados nas ligações dos C₁ e C₃ do glicerol produzindo ácidos graxos, 2 monoglicerídeos e 1,2 ou 2,3 diglicerídeos, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acil para produzir 1,3 diglicerídeos e 1 ou 3 monoglicerídeos. Pertencem a este grupo as lipases de *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus delemar* entre outras.



3) Lipases ácido graxo específicas: São lipases com ação específica na hidrólise de ésteres cujos ácidos graxos sejam de cadeia longa insaturada com duplas ligações em cis, no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos saturados ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum* usada na alcóólise de óleos selecionados para produtos específicos.

A especificidade das lipases pode ser explorada para produzir misturas específicas dos triglicerídeos como, por exemplo, na produção de substitutos da manteiga de cacau a partir de óleos vegetais de menor valor comercial. (CHANG e col., 1990).

As lipases podem ainda possuir um tipo de especificidade denominada estereoespecificidade, que é a habilidade em discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica. Um exemplo de aplicação é a separação do R-isômero do aspartame que tem gosto doce enquanto o S-isômero tem gosto amargo. A enantioespecificidade das lipases pode mudar com o substrato. Esta mudança pode estar relacionada à natureza química do éster, segundo CASTRO & ANDERSON, 1995.

3.2 Aplicações industriais das lipases

Possíveis aplicações das lipases na indústria são ilustradas na tabela 2 (CASTRO & ANDERSON, 1995; GANDHI, 1997).

TABELA 2 - Aplicações industriais das lipases.

Indústria	Efeito utilizado
Alimentos	
• Laticínio	Hidrólise da gordura do leite
• Panificação	Aumento do aroma, da qualidade e da vida de prateleira
• Cervejaria	Aumento do aroma e aceleração de fermentação em função de lipídeos
• Molhos	Aumento da qualidade do ovo pela hidrólise dos lipídeos
• Processamento de carne	Desenvolvimento do aroma, remoção do excesso de gordura
Química	
• Processamento de óleo	Transesterificação dos óleos
• Química fina	Síntese de ésteres; resolução de racematos
• Detergentes	Hidrólise de gorduras
Miscelânea	
• Farmacêutica	Digestão de óleos e gorduras em alimentos
• Médica	Determinação de triglicerídeos no sangue
• Cosmética	Remoção de lipídeos
• Couro	Remoção de lipídeos da pele de animais
• Tratamento de resíduos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas

Como pode ser verificado, as lipases podem ser empregadas nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas, química, farmacêutica, couro, médica, de detergentes e tratamento de efluentes.

3.2.1. Interesterificação de óleos e gorduras

A reação de interesterificação é usada na indústria a fim de modificar as propriedades físicas e funcionais dos triglicerídeos. A indústria química realiza a interesterificação através do aquecimento de misturas de óleos e ácidos graxos na presença de catalisadores, como o sódio metálico ou alcoóxido de sódio, induzindo a migração aleatória dos ácidos graxos para os triglicerídeos.

As lipases são aptas em catalisar esse tipo de reação com vantagens como a seletividade e especificidade posicional e por ácidos graxos. A comparação entre a interesterificação química e enzimática de estearina foi descrita por POSORSKE e col. em 1988, onde os autores afirmaram que o método enzimático é viável economicamente.

Um dos principais exemplos do uso da lipase nessas reações é a interesterificação de 1,3 - dipalmitoil- 2 monoleína (POP), principal triglicerídeo do óleo de palma com ácido esteárico para produzir 1,3 palmitoil-3 (1)- estearil-monoleína (POSt) e 1,3 diesteroil 2 monoleína (StOST) principais componentes da manteiga de cacau. (MACRAE, 1983).

3.2.2. Avaliação de plásticos biodestrutíveis.

Um tipo de material que pode ser transformado por microrganismos em um produto inócuo é chamado de biodestrutível. Polietileno misturado com amido usado frequentemente em embalagens de restaurantes do tipo “fast food “ é um exemplo deste tipo de material. A diferença entre biodegradável e biodestrutível é o grau de decomposição alcançado pelo material. A técnica padrão de avaliação do grau de degradação desses materiais é muito demorada, leva meses. Um Instituto de Pesquisas no Japão desenvolveu uma nova técnica de avaliação do grau de degradação de diferentes materiais usando lipases que tenham habilidade em degradar policaprolactonas. A técnica consiste em misturar a policaprolactona com plásticos e avaliar a diferença no grau de degradação entre os materiais. A policaprolactona é hidrolisada e o polietileno que está junto permanece inerte, porém fragmenta-se. Além de ser mais rápida, esta técnica permite ainda determinar tipos de materiais que possam ser misturados aos plásticos a fim de aumentar sua degradação (CASTRO & ANDERSON, 1995).

3.2.3. Produção de monoglicerídeos

Monoacilgliceróis são os emulsificantes mais utilizados em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. São produzidos em escala industrial pela glicerólise química contínua de óleos e gorduras a 220 - 250 °C, empregando catalisadores alcalinos. Esse processo demanda etapas sucessivas de purificação do produto pois promove escurecimento, degradação e formação de compostos colaterais.

O processo alternativo é baseado na alcólise dos triglicerídeos por lipases. A reação enzimática ocorre e os produtos são isolados por simples filtração ou

cristalização. Este processo foi desenvolvido para vários tipos de óleos e gorduras. As taxas de obtenção e pureza são maiores de 90% (BORNSCHEUER, 1995).

3.2.4. Produção de compostos opticamente ativos

A atividade biológica, toxicidade e absorção de uma droga quiral podem ser drasticamente diferentes em função de um ou outro enantiômero. A talidomida por exemplo, cujo S-enantiômero provoca morte e deformação fetal, possui o R-enantiômero com propriedades sedativas. No entanto, até recentemente a maioria das drogas era comercializada como racematos. (MARGOLIN, 1993).

Em 1992, devido à complexidade da quiralidade na atividade biológica, a FDA (Food and Drug Administration) adotou um programa, a longo prazo, que permite às indústrias farmacêuticas a escolha de um desenvolvimento de drogas quirais como racematos ou como simples enantiômeros.

O desenvolvimento de racematos não está proibido, mas tais drogas quirais terão que ser rigorosamente justificadas para que sejam aprovadas pelo FDA. Consequentemente a maioria das indústrias tem desenvolvido simples enantiômeros em vez de racematos.

Recentes avanços na síntese de compostos opticamente puros tem levado as indústrias farmacêuticas a investirem em pesquisas sobre os métodos viáveis para obtenção destes compostos. Dentre estes métodos, o biocatalítico tem despertado grande interesse. Enzimas como proteases, hidrolases e lipases são utilizadas hoje em mais de 50% das biotransformações publicadas (FURUTAMI e col, 1997). A aplicação, principalmente das lipases, tem sido fácil devido ao grande número de fontes comerciais, devido a sua estabilidade em solventes orgânicos e ao não requerimento de cofatores (FABER & FRANSSEN, 1993).

Nestes casos, a lipase catalisa a resolução cinética de compostos biologicamente ativos em solventes orgânicos (BOTTA e col, 1997). Muitos compostos quirais como fluoroprostaglandinas, antiinflamatórios não esteróides, β bloqueadores, etc. tem sido sintetizados usando hidrólise estereoseletiva em água ou transesterificação estereoseletiva em meio não aquoso. (CASTRO & ANDERSON, 1995).

3.2.5. Produção de amidas

Alguns derivados de amida do ácido propiônico têm mostrado atividade bactericida, enquanto amidas α , β insaturadas têm sido utilizadas na síntese de materiais poliméricos.

As lipases, por serem ativas em solventes orgânicos, possuírem especificidade relativa ao substrato e não catalisarem a hidrólise da ligação amida, podem ser usadas em reações de síntese com amidas.

A lipase de *Candida antarctica* catalisou a produção de amidas acrílicas opticamente ativas com alto excesso enantiomérico a partir de amidas racêmicas (PUERTAS e col., 1993).

3.2.6. Tratamento de efluentes

Os fungos filamentosos são capazes de assimilar, por difusão direta, lipídeos de cadeia longa encontrados em alguns efluentes industriais. RATLEDGE, em 1992, usou fungos no tratamento de efluentes reduzindo a produção de espumas devida à biomassa, facilitando o tratamento posterior.

3.2.7. Indústria de papel

Além de celulasas e lignases a indústria de papel tem empregado lipases para melhoria do processo (MILAGRES e col., 1992).

A pasta de celulose apresenta um acúmulo de compostos com alto teor de gordura que se depositam nas máquinas (cilindros) causando queda na produção e na qualidade final do papel. Pesquisas sobre a natureza destes compostos mostraram que os triglicerídeos são polimerizados. A hidrólise enzimática destes triglicerídeos por ação das lipases liberam ácidos graxos que são saponificados com hidróxido de sódio na lavagem. Este método tem apresentado bons resultados, pois, além das vantagens técnicas, um tempo menor de estocagem da madeira, bem como redução da quantidade de compostos químicos adicionados ao processo de pré tratamento das resinas têm sido alcançado (FISCHER & MESSNER, 1992).

3.2.8. Indústrias de detergentes

As lipases têm sido largamente utilizadas nos últimos anos para remoção de manchas de gordura em tecidos, em formulações de detergentes e sabão em pó. As lipases usadas em conjunto com as proteases em detergentes devem possuir características específicas como atividade ótima em pH alcalinos, estabilidade ao ataque de proteases e serem ativas até 60 °C.

O uso destas enzimas no mercado de detergentes é muito promissor uma vez que seu emprego leva à redução de temperatura e tempo de lavagem, resultando em um processo mais eficiente e economizando energia (MACRAE & HAMMOND, 1985).

3.2.9. Produção de lipídeos com fins nutracêuticos

As lipases podem ser usadas para promover novas propriedades físicas e nutricionais aos triglicerídeos.

Em relação às propriedades físicas, a interesterificação enzimática pode melhorar a estrutura e/ou o ponto de fusão para aplicação em produtos como cremes sem leite empregados em confeitaria. O uso desses triglicerídeos modificados pode melhorar ainda as propriedades organolépticas, reduzir o total de gorduras saturadas, aumentar o tempo de estocagem, etc..

Além de todas estas aplicações, ainda tem-se a vantagem da esterificação enzimática ser seletiva e possibilitar controle total das reações. Triglicerídeos estruturados para fins nutracêuticos podem também ser sintetizados por lipases.

Ácidos graxos saturados de cadeia longa (C16 ou maior), em geral, são menos absorvidos que os insaturados nas posições 1,3. Foi desenvolvido um triglicerídeo derivado de óleos vegetais que possui estrutura lipídica semelhante aos lipídeos presentes no leite humano. Este triglicerídeo só pode ser estruturado utilizando lipases 1,3 específicas e reagindo tripalmitina com ácidos graxos insaturados (QUILAN & MOORE, 1993).

A síntese de triglicerídeos ricos em n-6 ácidos graxos polinsaturados, n-3 polinsaturados e ácidos graxos monoinsaturados de cadeia muito longa foi discutida por MUKHERJEE, 1994. Esses triglicerídeos possuem propriedades biomédicas, tendo sido largamente comercializados como alimentos nutracêuticos.

3.2.10. Produção de ésteres

Embora os ésteres de ácidos graxos possam ser produzidos com altos rendimentos e razoável pureza por reações químicas convencionais, as reações de síntese catalisadas por lipases apresentam uma série de vantagens.

Estereoespecificidade, regioesletividade, baixo consumo de energia são algumas das características que fazem com que os processos catalisados por lipases se tornem mais atrativos do que os convencionais (HIRANO, 1986).

Ésteres de ácidos graxos são utilizados em uma extensa classe de produtos. As aplicações mais comuns são: lubrificantes, plastificantes, cosméticos, agentes anti-ferrugem, etc.

As aplicações mais conhecidas dos ésteres podem ser observadas na tabela 3, onde se comprova a grande importância comercial desses compostos (MEFFERT, 1984).

TABELA 3 - Aplicações comerciais de ésteres.

Tipo de éster	Aplicação	Indústria
Monoglicéridos	Emulsificantes	Alimentícia
Fosfolípidos		Farmacêutica
Alquil ésteres		Cosmética
Sugar ésteres		
Ésteres de álcoois normais e terpênicos	Aromatizantes	Cosmética
		Alimentícia
Ésteres de ácidos e álcoois graxos	Lubrificantes	Indústrias em geral
Poliésteres		
Ésteres opticamente ativos	Pesticidas	Agrícola
	Fármacos	Farmacêutica

Estudos sobre a síntese de ésteres catalisada por lipases têm sido muito relatados na literatura. Processos de síntese realizados com Lipozyme, uma lipase comercial de *Mucor miehei* que apresenta capacidade de sintetizar ésteres com especificidade de ação atuando em um grande número de substratos, desde ácidos e álcoois de baixo e alto peso molecular até aminas e aminoácidos, com alto grau de conversão têm sido publicados por diversos autores tais como LANGRAND e col. em 1988, WELSH e col. em 1990, MANJÓN e col. em 1991, BHIRUD e col. em 1991 e GATFIELD e col. em 1995.

Um sumário da literatura mais recente sobre este assunto está apresentado na tabela 4.

TABELA 4 : Síntese de ésteres por lipases

Enzima	Estado em que é usada	Solvente	Doador Acil	Álcool	Referência
Lipozyme	imobilizada	isopropil álcool	estearil amina	C8-C14	Bhirud e col, 1991
		hexano	ác. C14	etanol	Dumont e col, 1992
		SCCO ₂	C18 e C22 insat.	oleil	Bloomer e col, 1992
		sem solv.	ác. oleico	C1-C5, primário e glicerol	Knez e col, 1990
CCL	solúvel	hexano	ác C2,C4	C2, C4, C5	Welsh e Willians, 1989
MUCMIE	imobilizada	decano, octano	ác C2,C4	C2, C4, C5	Welsh e col, 1990
PFL	solúvel	octano	ác C2,C4	C2, C4, C5	Welsh e Willians, 1990
RHIDEL, CV, PFL, MUCMIE,	solução	água	ác. oleico	glicerol	Hoq e col, 1985
MUCMIE	solúvel	hexano	ác.butírico	butanol	Borzeix e col, 1992
MUCMIE	solúvel	hexano	ác. oleico	etanol	Gatfield e col, 1995
MUCMIE	celite	hexano	ác.butírico	etanol	Manjón e col, 1991
CCL	silica gel	heptano	ác. C4	C2	Gillies e col, 1987
CCL	imobilizada	hexano	ác. C3	etanol	Carta e Gainer, 1991
CCL, RHIDEL	micelas	isooctano	ác laurico	butanol	Hayes e Gulari, 1990
CCL	solúvel	-----	ác. oleico	heptanol	Goldberg e col, 1990
GEO, ASPNIG, RHIDEL	solúvel	água	C2,C3,C4,C6	terpênicos	Iwai e col, 1980
ASPNIG, MUCMIE	solúvel	heptano	C2, C4	isoamílico e geraniol	Langrand e col, 1988
GEO	solúvel	água	ác. oleico	álcool terciário	Okumura e col, 1979

CCL *Candida rugosa* (*cylindracea*)

RHIDEL *Rhizopus delemar*

MUCMIE *Mucor miehei*

ASPNIG *Aspergillus nige*

CV *Chromobacterium viscosum*

PFL *Pseudomonas fluorescen*

GEO *Geotrichum candidum*

Observando a tabela 4 podemos ter uma idéia da variedade de substratos nos quais as lipases podem agir. As lipases que são usadas predominantemente na síntese de ésteres são as de *Mucor miehei* e *Candida rugosa* (JÄÄSKELAINEN e col, 1996)

Em muitos casos é usado um solvente no meio reacional, normalmente hidrófobo. As regras para otimização de sistemas biocatalíticos em vários tipos de meio contendo solventes orgânicos são derivadas da combinação de dados da literatura e do log do coeficiente de partição ($\log P$), uma medida quantitativa da polaridade do solvente (LAANE e col, 1987). A biocatálise em solventes orgânicos é menor nos solventes polares que possuam $\log P < 2$, é moderada nos solventes com $\log P$ entre 2 e 4 e é maior nos solventes apolares com $\log P > 4$. Isso porque a relação entre polaridade e atividade enzimática está envolvida com a capacidade do solvente orgânico de diminuir a hidratação da enzima, essencial à reação de biocatálise.

Segundo DORDICK, 1989 e LAANE e col, 1987, as vantagens de se conduzir reações em sistema com solvente orgânico são, entre outras, a alta solubilidade de muitos compostos em solventes orgânicos; a habilidade de reverter reações de hidrólise; menor possibilidade de formação de produtos colaterais, como a hidrólise de anidridos ou polimerização de quinonas; o processo de imobilização da enzima torna-se desnecessário, uma vez que as mesmas podem ser retiradas do meio por filtração; a facilidade na recuperação do produto final; a maior termoestabilidade da enzima e a eliminação da possibilidade de contaminação microbiana no meio de reação .

Em contrapartida, o uso de solventes orgânicos em síntese é seriamente limitado pela desnaturação da enzima provocada pelo solvente (TORRES & OTERO1996), problemas como a limitação das condições de ensaio, como temperatura e pressão, recuperação e descarte dos solventes orgânicos, detoxificação do produto para uso alimentício, etc. Por isso, neste trabalho, propõem-se um sistema de síntese sem adição de solvente orgânico .

Porém, como as características de ação das lipases mudam de acordo com sua fonte, muitos outros meios reacionais e substratos ainda podem ser explorados tendo em vista a grande variedade de lipases disponíveis no mercado (HERNÁIZ e col 1997).

A reação de esterificação pode ser classificada com base no tipo de éster sintetizado. A síntese de ésteres de ácidos graxos com polióis (ésteres de açúcares, glicerídeos, etc.) tem sido estudada exaustivamente. Utiliza-se lipase ainda, para esterificar enantiômeros específicos de ácidos graxos e ou álcoois. Ésteres alifáticos de álcoois de cadeia média (C4 - C10) e ácidos graxos (C6-C12), têm recebido atenção especial.

3.2.11. Síntese de compostos de aromas e fragrâncias

Ésteres de ácidos carboxílicos são componentes importantes de aromas naturais usados na indústria alimentícia que contribuem na formação e incremento dos aromas em alimentos. Os ésteres de baixo peso molecular representam uma importante classe de aromas. Muitos deles são responsáveis por odores de frutas e fragrâncias dos alimentos e são constituídos principalmente por compostos derivados de ácidos de cadeia curta como acetatos, propionatos e butiratos. Pode-se citar exemplos como os ésteres butirato de etila e acetato de isoamila que são, respectivamente, encontrados nos aromas de morango e banana (GATFIELD e col, 1995).

São conhecidos muitos ésteres componentes de aromas naturais que têm sido obtidos de fonte natural ou por métodos tradicionais de síntese química a um custo elevado em função do grau de pureza e estereoespecificidade requeridos. Os ésteres produzidos por síntese química não podem ser considerados aromas naturais, sendo portanto menos valorizados no mercado que os ésteres obtidos de fontes naturais. Contudo, aqueles produzidos biotecnologicamente podem ser considerados naturais (CHRISTEN & LOPEZ-MUNGUÍA, 1994).

O recente crescimento da preferência dos consumidores por produtos naturais, indica que a biocatálise pode ser uma alternativa frente às reações de síntese química tradicionais, por seus produtos poderem ser denominados e aceitos como naturais (GATFIELD e col, 1995).

Além deste aspecto, reações biocatalíticas possuem menor requerimento energético que as catálises químicas e podem ser usadas para sintetizar produtos de melhor qualidade com maior diversificação.

Como alternativa para as exigências de pureza e estereoespecificidade, bem como problemas com os custos e origem dos ésteres produzidos por catálise química, a síntese enzimática pode vir a solucionar grande parte das dificuldades citadas. Lipases (triacil glicerol acil hidrolase - E.C. 3.1.1.3) podem ser usadas como biocatalizadores para a produção de ésteres de aroma pelas reações de transesterificação e esterificação direta dos substratos (SCHREIER, 1997). Entre a síntese direta de ésteres por esterificação de álcoois e ácidos catalisada por lipases e a síntese por transesterificação, a segunda reação traz mais vantagens: 1) Não são formadas ou consumidas moléculas de água durante a reação; 2) A estabilidade enzimática geralmente é maior nestas condições. Têm-se obtido ésteres metílicos de ácidos graxos e ésteres naturais provenientes de triglicerídeos de manteiga, por este tipo de reação (KYOWA, 1991).

Alguns trabalhos vêm sendo realizados no sentido de produzir compostos de aromas de frutas através da biosíntese direta, ou seja, por fermentação de açúcares

por variados microrganismos. Contudo, a concentração e o isolamento desses compostos ainda constitui um problema que nem sempre pode ser solucionado, pela alta volatilidade dos compostos e baixa concentração no meio de cultura (KRINGS e col, 1995 ; PASTORE e col, 1994).

3.3. Considerações sobre Aromas e Fragrâncias

3.3.1. O mercado de aromas e fontes de obtenção

A síntese de compostos de aromas obtidos biotecnologicamente vem crescendo muito na indústria de alimentos. Isto é resultado, entre outras coisas, dos avanços científicos em processos biológicos, fazendo uso de microrganismos ou enzimas como alternativa às síntese químicas, combinado aos recentes desenvolvimentos de técnicas analíticas como HPLC, CG, IV e espectrometria de massa. As pesquisas nesta área à procura de novos produtos e bioprocessos também aumentaram devido ao desenvolvimento de um mercado consumidor que procura ingredientes alimentares não tóxicos e naturais (CHRISTEN & LOPEZ-MUNGUÍA, 1994).

De um mercado mundial de 6 bilhões de dólares para a indústria de aromas e fragrâncias em 1990, aromas para alimentos representaram cerca de 25% com um crescimento de 5 % ao ano. O mercado de aromas foi estimado em US\$ 675 milhões em 1991 e era esperado um aumento de US\$ 376 milhões para o Mercado Comum Europeu (VULFSON, 1993; CHRISTEN & LOPEZ-MUNGUÍA, 1994).

Por outro lado a indústria alimentícia vem sendo fortemente influenciada pelo aumento do conhecimento dos consumidores sobre as características nutricionais e os insumos de sua dieta bem como dos aditivos empregados nos produtos industrializados. Isso pode ser observado não só pelo aumento do número de produtos com baixo índice de gordura, sódio, cafeína ou colesterol, como também pela troca da sacarina pelo aspartame e pela busca de corantes, antioxidantes e preservativos naturais.

Devido à complexidade de muitos aromas naturais, tanto em relação à composição, como estrutura química individual, a aplicação de métodos biotecnológicos, particularmente enzimáticos, na produção destes produtos tem atraído muita atenção desde a última década (ROSSITER, 1996).

Aromas produzidos biotecnologicamente podem ser caracterizados como “naturais” ou “idênticos ao natural” e portanto são preferidos pelo mercado consumidor. A presença de aromas adiciona valor ao produto, o que significa que o custo da biocatálise passa a ser menos significativo no custo final.

Durante os últimos 15 anos processos biotecnológicos têm-se estabelecido nas indústrias de aroma para produção de aromas naturais (GATFIELD e col,1995).

As leis de regulamentação de aditivos em alimentos reconhecem o fato de que aromas e constituintes de aromas naturais possam ser obtidos biotecnologicamente.

Contudo, algumas condições devem ser garantidas para se assegurar que o produto final seja natural. Estas condições estipulam que a matéria prima ou substrato sejam naturais e somente processos físicos ou biotecnológicos sejam empregados para o isolamento e purificação dos materiais formados. Exemplos típicos destes processos são a destilação, extração e concentração (Figura 1).

• Extração:	Animal (bovinos, aves, peixes, etc.) Vegetal (cogumelos, ervas, etc.)
• Destilação:	Citrus, pimentas, mentas, etc.
• Concentração:	Extratos, sucos de frutas, etc.
• Biotecnologia:	Fermentação (ácidos, álcoois, ésteres, etc.) Catálise Enzimática (queijos, sopas, etc.)

FIGURA 1 - Processos para obtenção de aromas naturais

3.3.2. Biotecnologia - Catálise enzimática na produção de aromas

Este ramo da biotecnologia tem sido empregado há anos na produção de alimentos com a grande vantagem de aumentar a vida de prateleira do produto. Além deste aspecto, o aumento no aroma destes alimentos pela ação de enzimas e microrganismos usados pode ser positivo (GATFIELD e col, 1995). Diferentes classes de aromas podem ser obtidos biotecnologicamente incluindo ácidos, ésteres, lactonas, álcoois, aldeídos e cetonas (GATFIELD, 1997).

Enzimas como biocatalizadores oferecem uma larga escala de aplicação na produção de aromas para uso em alimentos. Podem ser utilizadas diretamente no alimento como aditivos não só para liberar ou produzir precursores de aroma como também como corretivas de aromas indesejáveis causados pela presença de compostos específicos.

As enzimas envolvidas em processos formadores de aromas podem ser endógenas, inerentes do sistema alimentar, ou provenientes de fonte microbiana, adicionadas intencionalmente ou ainda podem ser contaminantes (DEMEYER, 1997 ; TOLDRA e col, 1997). Na figura 2 apresenta-se o resumo dos principais objetivos do uso de enzimas na biotecnologia de aromas.

- Aditivos para aumentar ou produzir precursores de aroma.
- Processo de biocatálise para produção de compostos de aroma.
- Aditivos na extração de aromas de matéria prima natural.
- Ativação de enzimas endógenas que induzam reações de produção de aroma.
- Inativação de enzimas endógenas para evitar a formação de compostos de aroma indesejável.
- Uso de enzimas para eliminação de compostos de aroma indesejável.

FIGURA 2 - Tecnologia enzimática relacionada a aromas para alimentos

3.4. Lipases como biocatalisadores na síntese de ésteres de aroma.

A fim de testar a aplicação de lipases na síntese de ésteres de álcoois terpênicos, IWAI e col., 1980, empregaram as lipases de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* em sua forma purificada.

As reações de esterificação foram realizadas a 30°C, com 200 rpm de agitação por 18 horas. O meio reacional foi composto de 0,1 mL de ácido (C3-C6), 0,2 mL de álcool (geranil e farnesol), 1 mL de água e 0,1 mL de lipase (100 Unidades). A reação foi paralisada com a adição de 20 mL de etanol e titulada contra KOH 0,5 M para o cálculo da porcentagem de esterificação em função da quantidade de ácido consumida.

A lipase que obteve as maiores taxas de conversão foi a de *Aspergillus niger*.

A lipase de *Geotrichum candidum* não foi capaz de esterificar nenhum éster nas condições testadas. Já as lipases de *P. cyclopium* e *R. delemar* só esterificaram quando o substrato ácido foi o capróico.

Os autores concluem o trabalho afirmando que a lipase de *Aspergillus niger* é mais estável a diferentes pH e possui menor especificidade de substrato quando comparada às outras. A lipase de *Aspergillus niger* sintetizou bem os ésteres mono, di e sesquiterpênicos, mas não catalisou a esterificação de álcoois secundários e terciários.

É importante observar que o ácido acético não foi esterificado por nenhuma lipase em estudo. Ao analisarem as condições ótimas de produção de butirato de geranila, catalisada pela lipase de *Aspergillus niger*, encontraram que a melhor relação molar foi de 1 mol de ácido para 2 moles de álcool na presença de 1 mL de água. A temperatura ótima mostrou ser de 30 °C e 18 horas de reação, com uma porcentagem de esterificação de 80 % usando 800 unidades de lipase.

GILLIES e col. 1987, relataram que a lipase de *Candida cylindracea*, adsorvida em sílica gel, sintetizou uma variedade de ésteres de aroma, quando hidratada e agitada em n-heptano juntamente com os substratos. A produção em escala piloto de etil butirato, éster de grande interesse comercial, pois compõe o aroma de frutas como banana e abacaxi, foi realizada em coluna empacotada com reciclagem de solução dos substratos em n-heptano. A temperatura ótima de atividade da lipase imobilizada está entre 20-30 °C, temperaturas de baixo valor energético portanto, consideradas econômicas. Os autores examinaram ainda a capacidade da lipase de *Candida cylindracea* sintetizar os ésteres laurato, butirato, octanoato, hexanoato, heptanoato e propionato de etila; acetato e butirato de isoamila e acetato de isobutila. A melhor taxa de conversão de ácido butírico e etanol em butirato de etila ocorreu quando a concentração de etanol foi de 0,4 M e 0,5 M de ácido butírico.

Em 1988, TAKASHI e col. modificaram enzimas como lipase, chimotripsina, catalase e peroxidase utilizando polietileno glicol, com o objetivo de tornar as mesmas solúveis e ativas em solventes orgânicos como benzeno.

A lipase modificada de *Pseudomonas fluorescens* catalisou várias reações de síntese de ésteres em benzeno, a 25 °C. Foram realizadas reações de esterificação onde a concentração do álcool amílico foi fixada em 0,75 M e variados os tipos de ácidos : pentanóico, octanóico, dodecanóico, benzóico, entre outros. Posteriormente, fixou-se a concentração do ácido pentanóico em 0,5 M e variou-se os tipos de álcoois: pentil, hexil, octil e dodecil.

A lipase modificada de *Pseudomonas fragi* catalisou reações de síntese de ésteres em benzeno na concentração de 0,33 mg/mL com os álcoos terpênicos como citrionelol, farnesol, geranil e fitol e os ácidos acético, propiônico, butírico e valérico. Os resultados estão relacionados a seguir e foram medidos após 8 horas de reação:

Álc:Ác	% Esterificação			
	Acético	Propiônico	Butírico	Valérico
Citrionelol	18	52	88	74
Geranil	19	81	94	83
Farnesol	19	78	90	81
Fitol	29	86	95	92

As lipases modificadas foram extremamente termoestáveis, mas em todos os casos foi necessária uma pequena quantidade de água no meio de reação para a expressão da atividade enzimática.

LANGRAND e col. 1988, testaram trinta preparações de lipases comerciais quanto à habilidade de catalisar a formação dos ésteres acetato, propionato e butirato de isoamila ou de geranila como compostos de aroma. As reações foram de esterificação direta ou éster solvólise em n-heptano. A formação de butirato de isoamila e geranila e propionato de isoamila e geranila por esterificação direta foi catalisada pela maioria das lipases testadas. Ésteres de ácido acético mostraram-se mais difíceis de se obter. As reações de transesterificação mostraram ser uma boa alternativa para a síntese dos ésteres, pois as lipases se mostraram mais estáveis neste tipo de reação. As condições da reação testadas pelos autores não foram ainda otimizadas.

WELSH & WILLIAMS 1989, estudaram a conversão de óleo fúsel, mistura de álcoois de cadeia alifática de C3, C4 e C5, em seus ésteres acetato e butirato, usando lipase de *Candida cylindracea*. As reações foram realizadas em fluido imiscível em água, como hexano. A temperatura de incubação foi de 30°C com 150 rpm de agitação. A produção máxima para ésteres butíricos foi de 65,8% de conversão e para ésteres acéticos de 46,4 % após 48 horas de reação. A enzima pode ser reutilizada três vezes antes de perder a atividade para a síntese de ésteres de ácido acético, mas somente uma vez para ésteres de ácido butírico.

GOLDBERG e col. 1990, estudaram as reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipase de *Candida cylindracea*. Os autores tinham como objetivo comparar o efeito de diferentes substratos aumentando a concentração de água do sistema na fase líquida e a atividade de água do sistema consequentemente. Analisaram os efeitos da água adicionada e da água produzida no sistema reacional durante a atividade enzimática.

As reações foram realizadas em sistema bifásico sólido/líquido, com os substratos previamente desidratados. Água foi adicionada ao sistema posteriormente pois a lipase em estudo foi inativa em sistemas desidratados.

No caso da esterificação direta, a conversão aumentou com o aumento da atividade de água no sistema. Por outro lado, a reação de transesterificação do propionato de etila, foi 48 vezes maior com nonanol do que na presença de heptanol desidratados, e somente 2,2 vezes maior quando os substratos estavam saturados com água. Esses resultados comprovam segundo GOLDBERG e col., 1990, a absoluta necessidade em se considerar a polaridade de cada substrato, pela própria habilidade em modificar a água de partição entre as fases sólida (preparação enzimática) e a fase líquida (produto e substrato), atuando drasticamente na atividade enzimática.

O efeito das moléculas de água produzidas durante a reação enzimática foram exatamente da mesma ordem de magnitude para os dois tipos de reação.

ISHII e col. 1990, investigaram a síntese de ésteres em sistema aquoso, utilizando lipase bruta de *Rhizopus oligosporus*. Foi usado o ácido oleico como substrato a fim de avaliar o grau de esterificação obtido pela lipase, com álcoois primários (C1 - C10). O meio reacional foi composto por 2 g de álcool, 1 g de ácido oleico e 1mL de solução enzimática diluída em tampão fosfato.

Dentre os álcoois estudados, o máximo de conversão obtida foi com o 1-propanol com 38,5%. As baixas taxas de esterificação obtidas com o metanol e etanol (menos de 20%), são devidas, segundo ISHII e col. 1990, à desnaturação da lipase. A lipase de *Rhizopus oligosporus* mostrou ainda ser hábil em esterificar álcoois secundários obtendo a taxa máxima de conversão com o 2-propanol, de 36,5%. Segundo os autores, é uma importante característica da enzima.

LANGRAND e col. 1990, reportaram detalhadamente a influência do tamanho da cadeia carbônica dos ácidos (C2 a C6) e dos álcoois (C1 a C6, primários), bem como a influência da natureza do álcool (terpênico ou não) na síntese de ésteres de aroma.

A preparação de 35 ésteres de cadeia curta, componentes de aroma, foi realizada pelas lipases de *Mucor miehei*, *Aspergillus sp*, *Candida rugosa* e *Rhizopus arrhizus* em sistema com adição de solvente orgânico. Os substratos utilizados foram os ácidos: acético, propiônico, butírico, valérico e capróico assim como os álcoois: metanol, etanol, butanol, isopentanol, hexanol, citronelol e geranil. Cada preparação de lipase testada apresentou seletividade de reação, de acordo com o ácido ou álcool testado. Por exemplo, a lipase de *Aspergillus sp* foi altamente seletiva para ácidos e álcoois de cadeia carbônica muito curta. Os autores concluem que as reações enzimáticas catalisadas por lipases são muito convenientes na síntese de ésteres. Contudo, cada síntese apresenta um problema específico onde as condições de preparação e experimentais devem ser otimizadas para se obter altos níveis de conversão.

WELSH e col. 1990, realizaram estudos para testar a capacidade de 27 lipases comerciais diferentes para sintetizar ésteres de baixo peso molecular em sistemas aquosos. Dentre as lipases testadas, as de *Candida cylindracea*, *Pseudomonas fluorescens* e *Mucor miehei* se destacaram. A produção máxima obtida após 24 horas de reação foi com as concentração de 0,05 mol/L de substrato para acetato de isopentila, 0,2 mol/L para butirato de etila e 0,3 mol/L para butirato de isopentila.

A taxa de conversão de butirato de butila foi de quase 100% quando se trabalhou com concentrações maiores que 0,2 mol/L de ácido. Os autores observaram inibição da enzima de *Pseudomonas fluorescens* pelo substrato acima da concentração de 1 mol/L, mas o mesmo efeito não foi observado com as outras lipases.

Os solventes hexano, octano e decano foram utilizados no meio reacional, exceto para a síntese de butirato de etila, onde somente o hexano foi empregado.

WELSH & WILLIAMS 1990, compararam a eficiência das lipases de *Candida cylindracea*, Pancreática e *Aspergillus niger* na catálise da síntese de butirato de etila e butirato butila de a 30 °C e 50 °C, usando hexano no meio reacional. O objetivo do trabalho foi examinar o efeito do pH da enzima, da concentração do substrato, pré-tratamento da enzima e ainda o efeito da fonte das lipases no grau de síntese de butirato de etila e butirato de butila.

Os autores concluíram que os parâmetros testados afetam realmente a síntese dos ésteres, mas têm sua extensão dependente da fonte da lipase. A lipase de *Aspergillus niger* conseguiu máxima conversão entre os pH 4-6 com 0,1 mol/l para o butirato de etila e 0,125 mol /l para o butirato de butila. Para a lipase de *Candida cylindracea* a conversão máxima ocorreu entre os pH 6 e 8.

O estudo do efeito do pré tratamento da enzima foi realizado com enzima dissolvida em água, em tampão e sem dissolver. Os resultados mostraram que a performance da enzima foi afetada mais uma vez de forma diferenciada de acordo com a fonte da enzima. Os dados para a lipase pancreática mostraram que o pré tratamento com tampão aumentou a síntese em relação ao pré-tratamento com água. Por outro lado, para a lipase de *Candida cylindracea* e *Aspergillus niger*, o pré tratamento com tampão não alterou em nada a atividade enzimática. De maneira geral o pré-tratamento das lipases afeta muito pouco a atividade em comparação às não tratadas.

CARTA & GAINER 1991 examinaram o mecanismo e os produtos da reação de esterificação catalisada por lipase de *Candida cylindracea* imobilizada em suporte de nylon. A reação de esterificação tinha como alvo a produção de variados ésteres utilizando como substratos álcoois e ácidos carboxílicos. Os autores discutiram a síntese de propionato de etila, em meio reacional composto por 0,17 mol/L de etanol e 0,2 mol/L de ácido propiônico em hexano. A concentração da lipase variou de 10 mg/ml a 250 mg/ml, tendo sido a temperatura ótima de reação entre 30-37°C. A lipase de *Candida cylindracea* foi testada também na síntese de propionato de etila, butirato de etila, butirato de isoamila e propionato de isoamila. As maiores taxas de conversão foram obtidas para os ésteres de álcool isoamílico, 0,17 mol/L após 24 horas.

Foi verificado que a cinética da esterificação é fortemente dependente da natureza dos substratos álcool e ácido e que pareceu haver uma região distinta de atividade enzimática para cada sistema reacional. Em alguns casos, o solvente orgânico pode ser totalmente eliminado do sistema, facilitando muito o processo de separação dos produtos posteriormente. Os autores desenvolveram modelos e parâmetros matemáticos a partir dos dados cinéticos obtidos nas reações enzimáticas

de formação de ésteres componentes de aroma, tanto em meio aquoso como em meio orgânico.

FAYOLLE e col. 1991, investigaram um método biológico de produção de butirato de butila a partir de fonte natural. Butanol e ácido butírico foram produzidos por processo fermentativo otimizado, de farinha de trigo hidrolisada por linhagens selecionadas de *Clostridium*. O butanol foi recuperado do meio fermentativo por destilação e o ácido butírico por extração com solvente. O éster butirato de butila foi produzido por esterificação direta usando lipase de *Mucor miehei*. O meio de reação foi composto por 0,1 moles de butanol, 0,1 moles de ácido butírico e 0,25 g/L de lipase a 40°C, em heptano.

Os autores estudaram o melhor solvente orgânico para a síntese. Testaram n-butanol, éter butílico, ciclohexano, hexano, heptano, octano e isoctano. O melhor foi heptano. As taxas de conversão foram proporcionais ao aumento da concentração enzimática (0,5 a 1 g/L) tendo sido escolhida a concentração de 1 g/L para as reações pois o tempo de reação foi menor. Os autores observaram que a temperatura ótima de reação foi de 60°C onde se atingiu a conversão de 0,52 µmol/min/mg. A adição de 1g/L de água ao sistema foi benéfica mas, as taxas de conversão caíram quando foi adicionado 5 g de água por litro de meio. Isso indica, segundo os autores, que a água tem um papel na ativação enzimática. O mesmo fenômeno foi observado quando a cinética da reação foi realizada com baixas concentrações enzimáticas. Neste caso, a máxima conversão ocorreu após algumas horas de reação quando provavelmente a enzima foi ativada pela água formada durante a esterificação.

KIM & RHEE 1991, estudaram os mecanismos de síntese enzimática de glicerídeos de cadeia média usando ácido cáprico (decanóico), ácido oleico e glicerol como substrato. A enzima empregada foi a Lipozyme sem a adição de solventes e/ou surfactantes ao meio de reação. A análise quantitativa da reação foi conduzida usando cromatografia líquida de alta resolução. A atividade de esterificação da Lipozyme foi determinada a 40 °C, em reator aberto, tendo sido obtidos os seguintes resultados: 400 e 200 unidades/g para síntese de glicerídeo cáprico e glicerídeo oleico respectivamente. A temperatura ótima de reação foi de 50°C para síntese com ácido cáprico e 60 °C para síntese com ácido oleico. Segundo os autores, a taxa de conversão foi muito influenciada pelos métodos usados para a remoção da água do sistema formada pela reação.

KYOWA 1991, autor de uma patente japonesa, publicou um novo método para produzir compostos de aroma de frutas que compreende o tratamento de lipídeos e óleo fúsel com lipase. Os lipídeos devem conter preferencialmente ácidos graxos de cadeia curta, como óleo de palma, manteiga, creme de leite, gordura de leite e os produtos da ação da lipase. As lipases utilizadas foram provenientes de animais ou microrganismos como *Rhizopus niveus*, *Rhizopus delemar*, *Aspergillus*

niger, *Mucor japonicus*, *Candida cylindracea*, *Pseudomonas sp*, *Chromobacterium viscosum*, etc. Óleo fúsel foi usado na concentração de 0,05 - 10 g/g de lipídeo. A reação foi realizada entre 20 - 50 °C por 5 - 40 horas. Os compostos de aroma produzidos podem ser usados na indústrias de alimentos, em produtos lácteos, confeitaria, sorvetes, cremes, bebidas, sobremesas, etc.

MANJÓN e col. 1991, imobilizaram a lipase de *Mucor miehei* em celite e nylon, por ligação covalente para testar sua capacidade de sintetizar ésteres que tenham aroma em meio de reação bifásico com água e solvente orgânico. A influência do método de imobilização foi considerada na porcentagem de síntese. A hidrofobicidade do solvente e quantidade de água no sistema bifásico influenciaram, segundo os autores, a estabilidade da enzima e o equilíbrio químico da reação. Deste modo, solventes com $\log P > 3,5$ e menos de 1% de água foram considerados os melhores. É importante considerar o efeito do pH na atividade da enzima, quando se usa substratos ácidos, e os autores afirmam ainda que a temperatura de atividade máxima na síntese de etil butirato esteve entre 40 e 50 °C. Neste trabalho, a lipase de *Mucor miehei* se mostrou capaz de sintetizar vários ésteres de cadeia curta e mostrou ainda que o tamanho da cadeia carbônica do álcool tem maior influência na síntese do que as características do ácido utilizado.

MONOT e col. 1991, investigaram o destino do solvente orgânico e da água residual na síntese de butil butirato por n-butanol e ácido n-butírico em hexano, catalisada por lipase de *Mucor miehei*, através da análise da cinética e balanços de massa da reação. A reação de esterificação se realizou em dois sistemas com baixa quantidade de água. Um com adição de hexano e outro um sistema bifásico com a enzima em solução aquosa num sistema com hexano. No sistema com enzima sólida, adicionada diretamente ao hexano, a enzima adsorveu a água produzida durante a reação, formando após algum tempo um sistema bifásico. Segundo os autores, como esperado, a presença de alguma quantidade de água foi indispensável para a reação, pois quando a água foi retirada, houve comprometimento da atividade enzimática. Contudo, observou-se que a remoção de água produziu pouco efeito no grau de esterificação final, tendo se observado que as velocidades de esterificação foram similares tanto no meio de reação em hexano quanto no sistema bifásico. No último caso, o butirato de butila foi encontrado quase exclusivamente na fase orgânica. Os resultados obtidos mostram que a síntese ocorre nos dois sistemas, basicamente por mecanismos similares, baseado na quantidade de água disponível no sistema, a reação dispõe o éster na fase orgânica, pelo coeficiente de partição ser assim favorável.

BLOOMER e col. 1992, demonstraram que a síntese de ésteres de ácido graxos e etanol catalisada por lipase, de maneira simplificada, pode ser útil também na síntese de ésteres polinsaturados. A evaporação da água gerada na reação

proporcionou a rápida produção de ésteres com mais e 99% de conversão em refluxo com hexano ou pentano. A água foi retirada pela condensação do vapor em refluxo passando por uma peneira molecular. Altas taxas de conversão foram rapidamente obtidas na síntese de ésteres etílicos de oleico, linoleico, α linolênico e ácido aracdônico sem peroxidação das duplas ligações. O éster oleil oleato foi também sintetizado rapidamente com pouca peroxidação. O excesso molar de etanol de 1,25 a 1,5, permitiu a melhor taxa de conversão na síntese. A síntese de etil estearato foi realizada em escala preparativa (50 g) onde foi obtido mais de 99% de conversão em 50 minutos. A lipase utilizada nos experimentos foi a Lipozyme IM 60 produto comercial da NOVO Nordisk de *Rhizomucor miehei*.

CASTRO e col. 1992, estudaram o comportamento da lipase comercial (NOVO Lipozyme) na reação de esterificação de componentes de álcoois terpênicos, frente a presença de heptano no meio reacional. Foi observado que durante a reação a quantidade de água do meio de reação diminuía, apesar da mesma ser um dos produtos da esterificação. Os autores observaram que o suporte em que a lipase estava imobilizada adsorvia a água do meio de reação, por se tratar de uma resina de troca iônica. Como resultado disto, a preparação da enzima imobilizada apresentou alto grau de hidratação no final da reação. As consequências desta hidratação em diferentes condições de reação foram então analisadas pelos autores. A principal conclusão foi que a quantidade de água adsorvida pelo suporte da enzima não influenciou em nada na síntese de butirato de citrônella. Para que a enzima fosse reutilizada, a fim de se obterem boas taxas de conversão foi preciso desidratar o suporte com heptano após cada batelada.

CASTRO e col. 1992, em outro estudo se preocuparam em investigar diferentes métodos de se desidratar o suporte da lipase (NOVO Lipozyme) após cada batelada da reação de síntese de butirato de citrônella. Dependendo do método usado para desidratação do suporte, a atividade da enzima pode ou não ser restaurada a níveis próximos aos iniciais. A aplicação de peneira molecular pareceu ser um método eficiente de remoção da água adsorvida pela enzima. Outra possível solução para o problema envolve a escolha de um material para o suporte da enzima que seja menos hidrofílico. Os autores discutem que a preferência por celite como suporte se explica por este ser menos hidrofílico que resinas de troca iônica. O suporte da Lipozyme pode ser uma restrição à sua aplicação em reações de esterificação em operação contínua, alertam os autores. Contudo, segundo eles, é necessário mais estudos sobre os parâmetros da reação pois existe uma relação complexa entre o solvente do meio, a água associada à enzima e a hidrofobicidade do solvente.

CARTA e col. 1992, testaram a lipase imobilizada de *Candida cylindracea* na esterificação direta de álcool isoamílico e etílico com os ácidos propiônico e

butírico. A lipase imobilizada se mostrou efetiva na catálise dos ésteres propionato de etila, propionato de isoamila e butirato de isoamila, em sistemas reacionais compostos por quantidades estequiométricas de substrato (0-2 M) em hexano.

Quando etanol em hexano foi substrato, a conversão inicial de esterificação foi de 0,02 moles / h .g de proteína; mas a enzima foi estável somente quando a concentração dos substratos foi inferior a 0,2 M.

Quando o álcool isoamílico foi utilizado como substrato em hexano, as taxas de conversão foram da ordem de 0,085 moles/h.g e neste caso a enzima foi estável em concentrações muito maiores deste substrato.

Os autores observaram que com a utilização do álcool isoamílico como substrato, o uso de solventes como hexano, não foi necessário para a esterificação e a enzima pode ser empregada em misturas com diferentes concentrações de ácido. Neste caso, com o ácido propiônico como substrato, a conversão aumentou gradualmente com a concentração de ácido até 1,5 M e diminuiu para concentrações maiores. As taxas de conversão máximas foram obtidas a 35°C diminuindo rapidamente com o aumento da temperatura para 40 e 60°C.

A comparação das taxas de esterificação obtidas para o propionato de isoamila foi realizada entre os sistemas reacionais com e sem hexano. Comparando os dados obtidos, os autores concluíram que as taxas de conversão foram essencialmente as mesmas nos dois sistemas . Contudo, variando a concentração de ácido propiônico no sistema sem hexano as taxas de esterificação aumentaram com a concentração de ácido até 3 M o que correspondia a 0,34 da fração molar do sistema. Assim, os autores concluem que as taxas de conversão obtidas em hexano são similares às obtidas sem hexano, com concentrações maiores de ácido. Por outro lado, a presença de excesso de álcool isoamílico pareceu ter efeito estabilizador na lipase. Foi testado ainda o efeito da adição de água ao sistema sem hexano, concluindo que a presença de mais de 5% (v/v) de água dissolvida em álcool isoamílico não foi significativa nas condições de reação.

CHULALAKSANANUKUL e col. 1992, estudaram a síntese de acetato de geranila por transesterificação catalisada pela lipase imobilizada de *Mucor miehei*. A fim de se obter alto grau de conversão na síntese, o efeito do tamanho da cadeia carbônica do éster na transesterificação foi estudado. Os autores concluíram que o melhor substrato para a síntese de acetato de geranila foi o acetato de propila. Estudando a cinética da reação, sugeriram o modelo bi-bi ping-pong como o mais adequado e verificaram que ocorreu inibição da enzima por excesso de álcool geraniol. Os autores mostraram que acetato de geranila foi sintetizado pela lipase em reação de transesterificação na presença de hexano anidro, uma alternativa para a síntese de ésteres que não possam ser obtidos por esterificação direta. Obtiveram uma taxa de conversão de 85% após 3 dias (72 horas) de reação. Observaram que

o tamanho da cadeia carbônica afeta acentuadamente a síntese de acetato de geranila. O acetato de propila serviu como excelente substrato para a lipase imobilizada de *Mucor miehei* na síntese de acetato de geranila.

Verificou-se que 0,1 g de água é necessário por grama de suporte para se obter máxima atividade enzimática.

RIZZI e col.1992, sintetizaram acetato de isoamila utilizando lipase imobilizada de *Mucor miehei* Lipozyme através da reação de transesterificação de acetato de etila com álcool isoamílico em n-hexano. Foi observado que a seletividade e a taxa de conversão diminuíram quando a quantidade de água no suporte que imobiliza a enzima excedeu 3% (p/p). Os dados experimentais indicaram que tanto os substratos quanto os produtos (etanol e acetato de isoamila) atuam como inibidores da ação enzimática. Os autores sugerem que esta inibição seja do tipo competitiva.

CLAON & AKOH 1993, reportaram o efeito da ordem de adição dos reagentes , solvente e enzima no grau de conversão de acetato de geranila usando como catalisadores da esterificação direta cinco lipases comerciais. As lipases utilizadas foram de *Mucor miehei*, *Candida antartica* e *Aspergillus niger*. O estudo foi conduzido realizando as misturas de reação com os mesmos componentes, variando a ordem de adição dos mesmos:

Mistura # 1 : Hexano + geranil + ácido acético + enzima

Mistura # 2 : Enzima + geranil + hexano + ácido

Mistura # 3 : Enzima + ácido + hexano + geranil

Os sistemas # 2 e # 3 eram homogeneizados antes da adição de hexano. Os sistemas foram incubados a 30° C por 24 horas a 200 rpm.

Os melhores resultados foram obtidos no sistema #1 seguido pelo #2 e #3. Os autores discutem que a ordem da adição dos substratos é importante para minimizar o efeito de inibição da enzima pelos reagentes.

CLAON & AKOH, 1994 (a) realizaram um estudo com duas lipases de *Candida antartica* (SP382 e SP435) na esterificação de geranil com ácido acético em n-hexano. Os autores afirmam que a quantidade de lipase utilizada no processo é um fator econômico crucial. As concentrações de lipases reportadas pela literatura são muito altas para qualquer aplicação industrial, como 38 a 93% em massa dos reagentes. Verificaram 96 % de conversão com 15 % em massa de lipase para SP382 e 2% em massa para SP435, tendo sido este último valor menor do que a faixa de utilização recomendada pelo fabricante da enzima (5-10%).

O efeito da concentração dos substratos tem sido relatado em estudos de síntese de ésteres por lipases de *Mucor miehei* e *C. cylindracea*. As lipases são geralmente inibidas pelo aumento da concentração de etanol, butanol e geranil. Os autores relatam que o geranil não inibiu a atividade de esterificação das lipases SP

382 e SP 435. O maior fator de conversão foi conseguido quando a concentração de geranil esteve por volta de 0,1M. No entanto, o aumento da concentração de ácido acético provocou a inibição das duas lipases, entre 0,2 e 0,5M. A temperatura ótima de reação esteve entre 35 - 40 °C para SP 382 e SP 435 respectivamente. A adição de 60 % (p/p) de água ao sistema causou perda de atividade das duas enzimas da ordem de 50-60 %. A polaridade do solvente orgânico usado na síntese não afetou a atividade enzimática.

CLAON & AKOH 1994, publicaram os resultados do estudo da habilidade das lipases comerciais de *Mucor miehei* (IM 60), *Candida antartica* (SP 435), *Pseudomonas sp* (PS e AK) e *Candida cylindracea* de catalisar a síntese de ésteres terpênicos por transesterificação. Como não houve síntese com os álcoois mentol e linalool, os autores reportaram os dados obtidos com as reações de geranil e citronelol. Os ésteres cuja produção foi testada foram: acetato de metila, etila, isopropila, isoamila e triacetina; butirato de metila, etila, glicila e tributirina; caproato de metila, etil e tricaproina; caprilatos de metila, etila e tricaprilina.

Este estudo foi importante para a compreensão do efeito do comprimento da cadeia do doador acil na síntese de ésteres terpênicos pela reação de transesterificação. Os autores sugerem que o efeito do tamanho da cadeia varie de uma enzima para outra e que também seja dependente da natureza do álcool terpênico usado. Dentre as lipases estudadas a lipase de *Pseudomonas sp* (AK) e *Candida cylindracea* foram as que obtiveram a pior performance. As lipases de *Pseudomonas sp* (PS) e de *Mucor miehei*, (IM 60) geralmente catalisaram melhor a reação com o aumento da cadeia do doador acil. A lipase de *Candida antartica* obteve a melhor performance mas não reagiu com tricaprilina como doador acil.

Dentro das condições estudadas, os triacil gliceróis foram os melhores doadores acil. Os álcoois mentol e linalool não foram esterificados.

CLAON & AKOH 1994, estudaram os parâmetros enzimáticos que afetam a síntese de acetato de citronelila por esterificação direta. As reações foram preparadas com 2 mL de hexano, 0,1 M de citronelol, 0,1 M de ácido acético, 10% (p/p) de lipase de *Candida antartica* (SP435) e incubadas a 30° C, 200 rpm por 24 horas. Após 14 horas de incubação foi observada uma taxa de conversão de 98%. Concentrações molares maiores de 0,3 M de ácido acético inibiram a atividade da enzima. A lipase foi capaz de converter 95,6 % após ser usada por 10 vezes, demonstrando grande estabilidade.

CLAON & AKOH 1994, estudaram a transesterificação de geranil e citronelol com triacetina catalisada pela lipase de *Candida antartica* (SP 435). As reações foram conduzidas em n-hexano com 0,1 m de álcool e 0,03 M de triacetina e 10 % da massa dos reagentes de lipase. Analisaram o efeito da adição de água, da temperatura, do tipo de solvente e reuso da lipase nas taxas de conversão. Taxas de

conversão maiores de 96% foram obtidas após 10 horas de incubação. As condições ótimas para síntese foram obtidas com a temperatura entre 30- 40° C, sem adição de água, em solvente orgânico. Para os sistemas sem adição de solvente e para aqueles cujos solventes possuíam log maior ou igual a 0,85, as taxas de conversão variaram entre 62-97%.

FONTEYN e col. 1994, obtiveram uma taxa de conversão de 74 % na síntese de acetato de citronelila utilizando lipase de *Candida antarctica* em meio reacional livre de solvente orgânico. A síntese foi realizada em Erlenmeyers onde 0,5 g de lipase foram adicionados a 0,1% de água, 55 mmoles de álcool e 35 mmoles de ácido. A incubação foi realizada a 45° C com 150 rpm de agitação. Estas foram as condições ótimas de síntese descritas em trabalho anterior ainda não publicado. Nestas condições, após 6 horas de reação foi observada 74 % de taxa de conversão.

Os autores estudaram dois modos para tentar aumentar a taxa de conversão. O primeiro foi a adição de dissecantes ao meio reacional para prevenir o acúmulo de água no sistema. Neste ensaio não foi adicionada água ao meio de reação. Os resultados obtidos para as taxas de conversão foram de 83 % sem adição de dissecante, 92% com 1 g de sulfato de magnésio e 91 % com 1,5 g de peneira molecular.

Na segunda alternativa, ao meio reacional foram acrescentadas quantidades calculadas de ácido acético no transcorrer da síntese. Os resultados indicaram que conseguiu-se aumentar a pureza do éster em até 84 % aumentando até 5 vezes o volume inicial dos reagentes. A definição de pureza para os autores foi:

$$\% \text{ Pureza} = \text{massa de éster} / \text{massa ácido} + \text{álcool} + \text{éster} \times 100.$$

HWANG & PARK 1994, estudaram a síntese de acetato de etila em fase gasosa usando lipase pancreática a 25° C. Os autores buscavam alternativas para os problemas de transferência de massa dos reagentes e recuperação do produto, segundo os mesmos, muito conhecidos nas sínteses em solventes orgânicos. As reações foram realizadas com os substratos gasosos, 5 mL de ar saturado com etanol e ácido acético a 25° C contendo 10 mg de lipase liofilizada, em frascos selados com septo de borracha.

Foram testadas várias concentrações de lipase no meio reacional. Com o aumento da concentração de lipase, observou-se a diminuição da concentração de acetato de etila no meio. Segundo os autores, este fato poderia ser explicado pela formação de água que é equimolar à formação de éster, durante a reação. Estudos subsequentes serão divulgados avaliando o efeito da temperatura, concentração de substratos e quantidade de água na porcentagem de esterificação.

RAZAFINDRALAMBO e col. 1994, escolheram a reação de síntese de acetato de isoamila como modelo para estudo da otimização da síntese por catálise enzimática. A reação foi realizada em 10 mL de n-heptano em agitador com 150

rpm. A relação molar entre os substratos álcool : ácido variou de 1 a 8, a concentração de enzima de 0,1 a 1 g, tendo sido usadas as temperaturas de 32 a 55 °C e a quantidade de água de 0,1 - 1% (p/v). As condições ótimas determinadas foram 4 para a relação molar entre os substratos, 45°C de temperatura, 0,1% de água e 0,5 g de enzima. A taxa de conversão obtida foi de aproximadamente 80% após 25 horas de reação.

YEE e col. 1995, imobilizaram a lipase de *Pseudomonas sp* em cinco suportes diferentes, para testar sua habilidade em catalisar a síntese de ésteres de geranil por transesterificação usando triacilgliceróis de cadeia curta como doadores acil. As misturas de reação foram preparadas em 2 mL de n-heptano, 0, M de geranil, 0,03 1m de triacilglicerol e 200 unidades de lipase, tendo sido incubadas a 30° C, 200 rpm por 24 horas.

Os suportes testados para imobilizar a lipase foram polivinilpirrolidona, celite 545, duolite A 340, sílica gel 12 e pérolas de vidro. Para a síntese de acetato de geranila e caproato de geranila o melhor suporte foi o duolite, com 77 % e 95% de conversão respectivamente. Para os ésteres butirato e caproato de geranila o melhor suporte foi a polivinilpirrolidona, com 80 e 95 % de síntese respectivamente. Os piores suportes foram a celite e sílica gel.

Com raras exceções, com o crescimento da cadeia carbônica do ácido, a taxa de síntese também aumentou sugerindo que a lipase de PS possui maior afinidade por ácidos graxos com mais de quatro carbonos. No presente estudo a influência do suporte não pode ser descartada, embora ainda seja pouco compreendida. Dados de taxas de conversão com a enzima não imobilizada foram obtidos e mostraram que são melhores do que quando a enzima foi imobilizada em sílica gel.

O desempenho do processo de esterificação para obtenção de butirato de citronelila foi estudado por CASTRO e col. 1995, comparando dois processos catalíticos : o químico e o enzimático. Ésteres terpênicos são usualmente preparados por via química, sendo o butirato de citronelila obtido a 120° C em uma reação com excesso de ácido butírico onde obtém-se além do éster subprodutos que devem ser separados em operações que oneram o processo.

Os autores realizaram a síntese química em balão volumétrico de fundo redondo onde foram adicionados 6,75 g (0,076 moles) de ácido butírico e 10 g (0,064 moles) de citronelol com 0,32 g de ácido sulfúrico,, como catalisador. A reação foi conduzida a 120° C durante 6 horas. A extração do éster foi realizada com diclorometano e lavado com solução aquosa de Na₂CO₃. O éster foi recolhido na fase orgânica e seco com Na₂SO₃ anidro.

A reação enzimática foi conduzida em Erlenmeyer de 250 mL bem como em balão de fundo redondo acoplado a condensador de refluxo usando hexano ou heptano. A proporção de álcool foi de 1,25 para 1 de ácido, 10% de lipozyme (p/p),

60° C e 100 rpm de agitação. A enzima foi recuperada por filtração e o éster concentrado em rotavapor.

O butirato de citronelila obtido por via química apresentou as mesmas características químicas do obtido enzimaticamente. O rendimento na síntese química foi de 53%. Já para os resultados da síntese enzimática, pôde-se observar que independentemente do tipo de solvente empregado, as taxas de conversão foram insatisfatórias quando a reação foi conduzida em Erlenmeyer. Os autores utilizaram o aparato de Deam-Stark para a síntese em meio com hexano, alcançando 75,9% de rendimento e com o emprego da peneira molecular no meio com heptano a síntese alcançou um rendimento de 86,6%.

Segundo os autores, a síntese enzimática é mais vantajosa em relação à química pois a energia despendida no processo é menor, os componentes da reação são todos recicláveis além de considerar que, no processo químico, 50 % da massa de sólido gerada não é reciclável.

CASTRO & JACQUES, 1995 estudaram a biotransformação de citronelol em butirato de citronelila, usando uma preparação de lipase imobilizada comercial Lipozyme em condições de baixa concentração de água. Mesmo controlando a concentração de água na reação, foi formado de 100 a 200 ppm de água por mol de butirato de citronelila formado. Com a finalidade de verificar a distribuição no sistema reacional desta quantidade de água formada, foi efetuado um monitoramento da concentração de água nas fases sólidas (FS) e líquidas (FL) durante a reação, em presença e ausência de dessecantes moleculares. Em ambos os casos constatou-se que a água formada durante a reação não permanece na FL, sendo adsorvida pelo suporte da preparação da enzima ou pelo agente dessecante, sendo que este último possui maior poder hidrofílico que o suporte da enzima. Concluíram os autores que a quantidade de água formada durante a reação não interfere no equilíbrio da reação desejada, tanto na presença quanto na ausência de agentes dessecantes. O desempenho da síntese foi melhor quando o contato enzima-dessecante foi restrito a um curto período de tempo.

CASTRO e col. 1995, investigaram a esterificação do citronelol com vários ácidos em sistemas constituídos predominantemente de solventes orgânicos, empregando lipase de *Mucor miehei* (NOVO) como catalisador. Os ácidos empregados como substrato foram o ácido acético, butírico, caprílico, pelargônico, cáprico, láurico, mirístico e oleico. As reações foram realizadas na presença de 20 mL de heptano contendo 0,25M de citronelol e 0,3 M de ácido em reatores fechados. A mistura foi incubada com 0,25 g de enzima a 45° C, por 24 horas.

Após 24 horas de reação, porcentagens entre 95 e 98% dos diferentes ácidos (C4 a C8) foram esterificados. A exceção foi com relação ao emprego do ácido acético onde foram alcançadas taxas de apenas 13,56% de esterificação.

Os autores estudaram mais a fundo os resultados obtidos com o ácido acético. Na literatura encontraram resultados similares que eram justificados basicamente porque a presença de ácido acético no meio, pode ocasionar danos à camada de hidratação da enzima, inibindo assim sua atividade. O ácido acético, por apresentar alta polaridade migra para a fase sólida da enzima alterando o microambiente, baixando as taxas de conversão. Variando a composição do meio reacional (razão entre os reagentes), aumentando a concentração de enzima e empregando temperaturas mais baixas além de adicionar ao meio dessecante, os rendimentos passaram de 13,56% para 20,8% nas primeiras 24 horas e para 40% após 48 horas de reação.

GANDHI e col. 1995 estudaram o efeito da temperatura, velocidade de agitação e concentração da enzima na síntese de laurato de butila usando lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme). Embora a enzima seja termoestável em solução aquosa, a mesma se desativou rapidamente a partir de 40 °C na presença de butanol. Esta enzima, que foi imobilizada em uma resina trocadora de ânions, mostrou boa estabilidade quando comparada à forma solúvel em relação à desnaturação na presença de butanol, nas mesmas condições. Segundo os autores, a desnaturação da Lipozyme mostrou ser dependente da concentração de butanol na fase aquosa.

GANDHI e col. 1995 estudaram a inativação térmica da lipase de *Mucor miehei* na presença de butanol. Este fenômeno foi observado pelo grupo em estudo relatado anteriormente (1995-a) na síntese de laurato de butila foi conduzido com reações que foram preparadas com 0,1 mol de ácido láurico e 0,2 moles de butanol, a 29, 38, 50 e 60° C. Após vários experimentos onde ao meio reacional foi adicionado ora isooctano ora excesso de butanol, os autores concluíram que a Lipozyme é altamente vulnerável à desnaturação térmica a partir de 50° C. Esta desnaturação é mais rápida na presença de butanol pois a presença de solventes não polares conferiu estabilidade à enzima, como verificado com isooctano.

A Lipozyme pode sofrer desnaturação térmica na presença de butanol até mesmo a 29° C, dependendo da concentração de butanol no meio.

O uso de lipases como biocatalisadores na síntese de oleato de butila por esterificação foi investigado por LINKO e col., 1995. Foram testadas 25 lipases comerciais na síntese de oleato de butila a partir de butanol e ácido oleico. O meio de reação foi composto pela adição dos substratos, enzima e água. As lipases que produziram as maiores taxas de conversão foram as de *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizomucor miehei* e *Pseudomonas fluorescens*. A única lipase que conseguiu esterificar sem a presença de água foi a de *Chromobacterium viscosum* com 98% de conversão após 12 horas de reação em excesso de butanol. Com excesso de ácido oleico e somente 0,3% de lipase,

Candida rugosa e *Mucor miehei* converteram 94 e 100% , na presença de 3,2 e 14 % de água respectivamente.

MESTRI & PAI 1995, testaram diferentes lipases para a esterificação de geranil (de óleo de palma rosa) com ácido butírico. A enzima imobilizada de *Mucor miehei* foi a que conseguiu o máximo de conversão. As condições ótimas de reação foram de 40° C com 5 mL de óleo de palma rosa e 3 mL de ácido butírico após 24 horas com 1 g de enzima, onde a taxa de esterificação foi de 95%. O melhor solvente orgânico testado foi o heptano.

OGUNTIMEIN e col. 1995, utilizaram a lipase de *Candida antarctica* para sintetizar ésteres de ácidos graxos de cadeia curta com o álcool terpênico geranil em um sistema livre da adição de solvente. A máxima taxa de conversão enzimática ocorreu à temperatura de 60°C. Quando foram esterificados os ácidos graxos propiônico e butírico, altas taxas de conversão foram obtidas. Já quando o ácido acético foi utilizado, a atividade da lipase foi muito baixa. Foi observado que a atividade enzimática depende da quantidade de água adsorvida pela enzima. À medida que a atividade de água crescia no sistema, a atividade enzimática se manteve constante em 175 mg/mL.h, até atividade de água de 0,5. A maior atividade enzimática foi obtida com atividade de água de 1. Os autores conseguiram reutilizar quatro vezes consecutivas a enzima com perda de atividade somente de 10%.

WANG & LINKO 1995, empregaram as lipases de *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizopus japonicus* na esterificação direta de diferentes isômeros de citrônol com ácido butírico com ou sem adição de solvente orgânico. Os autores reportaram neste estudo, 98% de taxa de conversão para R(+) - citrônol após 18 horas de reação sem adição de solvente orgânico, com 12% de água. Este resultado foi obtido pela lipase de *C. rugosa*. Para o R (-) citrônol a taxa de conversão foi de 67% com adição de 18% de água pela mesma lipase. Não foi observado qualquer síntese em hexano com até 12 ppm de água no sistema. À medida que a quantidade de água aumentou para 0,1%, as taxas de esterificação começaram a ocorrer rapidamente para todos os substratos. As lipases de *P. fluorescens* e *R. japonicus* exibiram taxas de conversão maior de 80% para R(+) citrônol após 4 horas de reação.

YEE e col. 1995, estudaram cinco lipases na síntese de ésteres terpênicos por transesterificação. A natureza da molécula de álcool terpênico e da fonte da enzima influenciaram as taxas de conversão. As lipases estudadas foram : Lipase AK, não específica em sua ação lipolítica e de transesterificação e proveniente de *Pseudomonas sp*; a lipase AY de *Candida rugosa*; a lipase L de *Candida lipolytica* específica para as posições 1 e 3; a lipase N de *Rhizopus niveus* e G de *Penicillium cyclopium*. Os álcoois testados foram: geraniol e o citrônol e os triglicerídeos

foram triacetina, tributirina, tricaproína e tricaprilina. A lipase AY mostrou as melhores taxas de conversão, seguida da lipase G. Isso mostrou que as duas lipases, especialmente AY, têm potencial para catalisar a síntese de ésteres terpênicos via transesterificação. Segundo os autores, dentro das condições estudadas, os melhores substratos foram geraniol e tributirina.

ZAIDI e col. 1995, estudaram a síntese de laurato de butila por esterificação direta de ácido láurico com o álcool n-butanol empregando lipase de *Candida cylindracea* imobilizada em nylon. Os estudos foram realizados em n-hexano e a taxa de conversão máxima foi de 37 mmol/h.g de enzima quando os substratos estavam em concentração equimolar de 0,5 moles/L. A reação foi inibida quando a concentração molar dos substratos foi maior que 0,5 mol/L. A melhor temperatura de reação foi de 40° C.

YEE e col. 1995, selecionaram cinco lipases quanto à capacidade em sintetizar ésteres dos álcoois terpênicos, geranil e citronelol por transesterificação com tributirina. As fontes das lipases testadas foram: lipase não específica de *Pseudomonas sp* (AK); lipase (AY) de *Candida rugosa*; lipases sn 1,3 específica (L) de *Candida lipolytica*, lipase de *Rhizopus niveus* (N) e lipase (G) de *Penicillium cyclopium*. Segundo os autores, todas as lipases testadas sintetizaram os ésteres terpênicos em estudo, com diferentes taxas de conversão. As maiores conversões foram obtidas na síntese de butirato de geranila pela lipase AY com 96,2% após 84 horas de reação e 31,6% para butirato de citronelila com a lipase G. As reações foram conduzidas em 2 mL de n-hexano com 0,1 mol de álcool e 0,03 moles de tributirina, sempre com 200 unidades de lipase. Segundo os autores as lipases mostraram maior afinidade pelo geranil do que pelo citronelol.

SHIEH e col. 1996, publicaram um trabalho cujo objetivo foi estabelecer a relação entre os fatores (tempo de reação, quantidade de água, quantidade de enzima, relação molar entre os substratos) e a resposta (porcentagem de conversão molar) da reação de transesterificação na síntese de butirato de geranila. Os autores procuravam, com o estabelecimento de uma relação matemática entre os fatores e a resposta, otimizar as condições de síntese do éster. Para tanto, empregaram a lipase de *Candida rugosa* e a metodologia de planejamento experimental e análise da superfície de resposta com ponto central.

O experimento foi montado com 5 variáveis onde foram requeridos 32 experimentos. As variáveis consideradas foram: o tempo (1 a 9 horas); a temperatura (25-65° C); a concentração enzimática (10- 50% do peso do geranil); a relação molar entre os substratos (1:0,33 - 1:1 de geranil : tributirina) e a quantidade de água adicionada ao sistema (0- 20 % da massa de geranil). Esses parâmetros foram escolhidos baseado em estudos anteriores.

Os primeiros resultados do estudo indicaram que as variáveis significativas nas respostas foram: o tempo, a temperatura, a quantidade de água e concentração enzimática. A relação molar não teve efeito significativo, o que mostrou que era possível usar a menor concentração molar de geranil e tributirina na síntese. Para o aspecto de aplicação industrial, este resultado foi muito bom pois reduziriam os custos da síntese.

Os autores consideraram o tempo e a temperatura como variáveis mais importantes, sendo então indicadores da performance econômica efetiva. Mantiveram constante a relação molar entre os substratos e estudaram a síntese em condições de 10 a 50 % de enzima em peso, 10 a 20 % de água, 25 a 65° C, nos tempos de 1 a 9 horas de reação. Após análise gráfica dos dados obtidos determinaram as condições ótimas de síntese do butirato de geranila a 9 horas, 35° C com 50 % de enzima e 10 % de água no sistema.

WU e col. 1996, investigaram a esterificação estereoseletiva de mentol racêmico em n-hexano usando ácidos anidros como agentes acilantes pelas lipases de *Candida rugosa* AY-0 e *Pseudomonas sp.* PS. Foram investigadas as reações de esterificação de mentol com ácido acético, butírico e propiônico. As concentrações de substratos usadas foram 1 mmol: 0,5 mmol (álcool : ácido); 1:1 e 1:2 em 2 mL de hexano. Foi empregada concentração de lipase de 7% em peso dos reagentes. Os autores realizaram experimentos-controle sem adição de lipase a fim de avaliar a porcentagem de esterificação espontânea dos reagentes e as condições dos testes. Foram testados 8 tipos diferentes de solventes orgânicos na síntese. A lipase AY-30 não imobilizada demonstrou ser um biocatalisador eficiente em hexano, de mentol com os ácidos propiônico e butírico. Produziu preferencialmente (-) ésteres mentílicos com 64% de esterificação de butirato de mentila e 200 % de propionato de mentila após 48 horas a 30° C. As porcentagens de esterificação espontânea foram de 23, 26 e 29 % após 48 horas para os sistemas com ácido acético, propiônico e butírico respectivamente.

TALON e col. 1996, testaram a habilidade das lipases de *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus xylosus* imobilizadas em sílica gel na catálise da síntese de variados ésteres. Foram testados como substratos para síntese ácidos que continham de 2 a 18 carbonos e os seguintes álcoois: etanol, butanol, hexanol, isobutanol e isoamílico. As reações foram realizadas em solventes orgânicos a 30°C. Após 24 horas de reação, a lipase de *S. warneri* chegou a produzir 230 moles de decanoato de hexila. Segundo os autores, a lipase de *S. warneri* pode ser empregada na síntese de ésteres de cadeia média de hexanoato de etila a laurato de etila, devido a sua especificidade.

YEE e col. 1997, testaram a habilidade da lipase de *Pseudomonas sp* imobilizada em catalisar a síntese de butirato de citronelila e caproato de geranila

por transesterificação em n-hexano. Os parâmetros de reação investigados foram: efeito da concentração do substrato, adição de água, temperatura, tempo, tipo de solvente orgânico, pH, reutilização da lipase e concentração da lipase. Os autores observaram taxas de conversão de 96 e 99% para butirato de citronelila e caproato de geranila respectivamente, com adição de 300 unidades de lipase (aproximadamente 15 % em massa dos reagentes). Estes resultados foram obtidos após 24 horas de reação entre 30 e 50°C. Foram testados mais de dez solventes orgânicos, mas aqueles que apresentam log P maior que 2,5 foram os mais adequados, segundo os autores. A porcentagem de 2% de água adicionada ao meio e pH entre 6 e 8 propiciaram melhores condições de síntese. Os autores observaram que a lipase pode ser reutilizada por 12 vezes consecutivas.

4. MATERIAIS

a) Reagentes

Reagentes e solventes químicos: metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, ácidos: acético, butírico e propiônico, hexano e citrônol (Merck Hexanol Riedel), álcool isoamílico e óleo fúsel (Centro de tecnologia COPERSUCAR), ácido láurico (Henckel).

Meios de cultura : agar, peptona, extrato de levedura (DIFCO), farelo de trigo, farelo de soja e farinha de trigo (comerciais).

Enzimas: preparações de lipases brutas liofilizadas obtidas no Lab. de Bioquímica de Alimentos da FEA - UNICAMP (*Geotrichum sp*, *Alcaligenes sp*, *Aspergillus sp*, *Rhizopus sp*); lipase de *Candida rugosa* produzida por Meito Sangyo Company.

Padrões para Cromatografia Gasosa: ésteres: acetato de etila, acetato de amila, acetato de isoamila, acetato de propila, butirato de isoamila, propionato de isoamila, laurato de butila. Ácidos: acético, butírico, propiônico. Álcoois: amílico, isoamílico, etílico, butílico. (Sigma).

b) Equipamentos

- Banho de água termostaticado com agitação . Fabr. Gilson.
- Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama Chrompack CP 9001 com integrador no software MOSAIC.
- Cromatógrafo a gás HP 5890 series II com detetor de massa MSD- HP 5970.

c) Outros materiais

- Colunas Capilares para Cromatografia gasosa
 1. CP WAX 52 CB; 30 m x 0.32 μ m x 0.2 mm; COT/cf
 2. FFAP 50 m x 0.32 μ m x 0.2 mm
- Microseringas Hamilton 10 μ L
- Micropipetas e ponteiras -Labsystems, Gilson ; 100-1000 μ L e 40-200 μ L
- Tubos Eppendorf - Brand.

5.METODOLOGIA

5.1. Estudos preliminares para seleção de lipases e substratos para a síntese de ésteres em meio aquoso

5.1.1. Seleção dos ésteres de interesse

Foi realizada uma intensa pesquisa na literatura a fim de se estabelecer uma listagem de ésteres comercializados como aditivos aromatizantes para alimentos e comprovar o interesse comercial pela síntese de determinados ésteres em especial. Uma listagem de alguns compostos químicos comercializados como aditivos de aroma para alimentos, pela indústria Fleurchem, Inc. está ilustrada na tabela 5. A listagem completa pode ser consultada no Anexo 1.

Os resultados obtidos na seleção das lipases avaliando sua capacidade de catalisar a síntese de variados ésteres foram cruciais na escolha daquelas a serem empregadas no estudo que se seguiu. Além disso, foi investigado o interesse comercial pelos ésteres sintetizados. Conciliou-se portanto a habilidade das lipases em teste, com o interesse comercial pelos ésteres em estudo.

TABELA 5 - Ésteres de aroma comercializados pela Fleurchem, Inc.

(Perfumer & Flavorist, v.18, p.42, 1993)

<i>Químicos Naturais</i>	
Acetato de n-butila	Acetato de propila
	Butirato de propila
Acetato de citronelila	Laurato de propila
Butirato de citronelila	Propionato de propila
Propionato de citronelila	
Acetato de etila	Acetato de isobutila
Butirato de etila	Butirato de isoabutila
Laurato de etila	Laurato de isobutila
Propionato de etila	Propionato de isobutila
Acetato de isoamila	Especiais- Kosher
Butirato de isoamila	Acetato de etila
Propionato de isoamila	Butirato de etila
laurato de isoamila	Propionato de etila

5.1.2. Seleção das lipases

Este estudo visou testar a habilidade das lipases produzidas no laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA - UNICAMP em esterificar variados álcoois e ácidos, comparando os resultados com os disponíveis na literatura para lipases comerciais. As preparações de lipases empregadas nos experimentos possuem suas fontes nos respectivos microrganismos: *Geotrichum sp*, *Alcaligenes sp*, *Aspergillus sp* (linhagens 1068 e 1099), *Rhizopus sp*, isolados no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA - UNICAMP.

Junto às lipases preparadas em escala laboratorial, foi testada a lipase comercial de *Candida rugosa* reconhecidamente empregada como catalisadora das reações de síntese em estudo.

5.1.2.1. Produção das lipases microbianas

a) Produção da lipase de *Geotrichum sp* (MACEDO & PASTORE, 1995)

Frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL de meio de cultura composto de 1,5% de farinha de soja desengordurada, 1% de farelo de trigo, 0,2% de nitrato de amônio, e 3 % de extrato de levedura, previamente esterilizados por 15 minutos a 121° C com 1 atm de pressão, foram inoculados com 0,5 mL de suspensão do inóculo de *Geotrichum sp*. Os frascos foram incubados por 48 horas em shaker a temperatura de 30° C com agitação de 200 rpm. Após o tempo de fermentação os meios foram centrifugados a 4000 rpm por 25 minutos e o precipitado foi descartado. Ao extrato aquoso enzimático recolhido foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para fornecer 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu por 24 horas a 5° C, para precipitação completa da enzima. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos sob refrigeração. O precipitado foi dialisado contra tampão fosfato pH 7,0 por 48 horas a 5° C. Após a diálise o material foi congelado e liofilizado. O pó obtido foi denominado preparação enzimática bruta onde foi medida a atividade enzimática e concentração proteica.

b) Produção da Lipase de *Alcaligenes sp* (NETO & PASTORE, 1996)

Frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de meio de cultura composto por 1% de água de maceração de milho, 1% de farinha de trigo, 0,5% de fosfato bibásico de potássio e 2% de farinha de soja torrada, previamente esterilizados por 15 minutos a 121° C com 1 atm de pressão, foram inoculados com 0,5 mL de

suspensão bacteriana. O pH do meio foi ajustado para 9,0 com solução 0,2% de carbonato de sódio. Os frascos foram incubados por 72 horas em shaker a temperatura de 30° C com agitação de 200 rpm. Após o tempo de fermentação os meios foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi descartado. Ao extrato aquoso enzimático recolhido foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para fornecer 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu por 24 horas a 5° C, para precipitação completa da enzima. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos sob refrigeração. O precipitado foi dialisado contra tampão pH 9,0 por 48 horas a 5° C. Após a diálise o material foi congelado e liofilizado. O pó obtido foi denominado preparação enzimática bruta onde foi medida a atividade enzimática e concentração proteica.

c) Produção das lipases de *Aspergillus sp* (linhagens 1068 e 1099)
(COSTA & PASTORE, 1996)

O meio de cultura para produção da lipase foi composto de farelo de trigo e água na proporção de 1:1 (m/m). Frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 20 g de meio de cultura esterilizados por 15 minutos a 121° C com 1 atm de pressão foram inoculados com 1 mL de suspensão homogênea de esporos, preparada com água destilada estéril e com esporos de cultura de 96 horas de crescimento em meio inclinado de ágar batata dextrosado. Os frascos foram incubados a 30° C por 72 horas. Após a incubação foram adicionados 100 mL de água destilada em cada frasco. Os meios de cultura foram homogeneizados com bastão de vidro e após permeneceram em extração por 1 hora com agitação ocasional, foram filtrados em papel Whatman nº 1 e coletados num único recipiente. Ao filtrado foi acrescentado sulfato de amônio em quantidade suficiente para fornecer 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu por 24 horas a 5° C, para precipitação completa da enzima. A mistura foi centrifugada a 7000 rpm por 15 minutos sob refrigeração. O precipitado foi dialisado contra água por 48 horas a 5° C. Após a diálise o material foi congelado e liofilizado. O pó obtido foi denominado preparação enzimática bruta onde foi medida a atividade enzimática e concentração proteica.

d) Produção da lipase de *Rhizopus sp*. (COSTA & PASTORE, 1997)

O meio de cultura para produção da lipase foi composto de farelo de trigo e água na proporção de 60 % de trigo para 40% de água (m/m). Frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 20 g de meio de cultura esterilizados por 15 minutos a 121° C

com 1 atm de pressão foram inoculados com 1 mL de suspensão homogênea de esporos, preparada com água destilada estéril e com esporos de cultura de 96 horas de crescimento em meio inclinado de ágar batata dextrosado. Os frascos foram incubados a 30° C por 120 horas. Após a incubação foram adicionados 100 mL de água destilada em cada frasco. Os meios de cultura foram homogeneizados com bastão de vidro e após permaneceram em extração por 1 hora com agitação ocasional, foram filtrados em papel Whatman nº 1 e coletados num único recipiente. Ao filtrado foi acrescentado sulfato de amônio em quantidade suficiente para fornecer 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu por 24 horas a 5° C, para precipitação completa da enzima. A mistura foi centrifugada a 7000 rpm por 15 minutos sob refrigeração. O precipitado foi dialisado contra água por 48 horas a 5° C. Após a diálise o material foi congelado e liofilizado. O pó obtido foi denominado preparação enzimática bruta onde foi medida a atividade enzimática e concentração proteica.

5.1.2.2. Determinação da atividade lipolítica e concentração de proteína

A atividade lipolítica das lipases foi medida em um sistema composto por: 5 mL de emulsão de óleo de oliva extra virgem e goma arábica 7% na proporção de 25% de óleo para 75% de goma; 2 mL de tampão Fosfato pH 7,0, 0,1M e 1 mL de solução enzimática na concentração de 10 mg/mL de enzima. O sistema foi incubado a 40° C por 30 minutos em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada com a adição de 15 mL de solução acetona:etanol (1:1, em volume) e os ácidos graxos liberados titulados contra solução de KOH 0,05N usando fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade de lipase é definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas.

A concentração proteica dos extratos liofilizados foi determinada de acordo com HARTREE (1972).

Enzima	Unidades de Atividade (µmoles ácido graxo/min/mg)	Proteína (mg/g de enzima)	Atividade específica (Unidades/mg de proteína)
<i>Geotrichum sp</i>	3.6	30	0,12
<i>Alcaligenes sp</i>	0.6	5.53	0,10
<i>Aspergillus sp - 1068</i>	3.7	56,8	0,06
<i>Aspergillus sp - 1099</i>	1.16	25	0,04
<i>Rhizopus sp</i>	4.16	27,4	0,15
<i>Candida rugosa</i>	12	-	-

FIGURA 3 - Atividade enzimática e concentração proteica das lipases

5.1.3. Seleção dos substratos

Neste estudo de seleção foram testados os seguintes álcoois: metanol, etanol, propanol, iso-propanol, butanol, iso-butanol, isoamílico, a mistura de álcoois óleo fúsel, e o citrônolol que tem sido muito empregado na síntese de ésteres de aroma. Os ácidos escolhidos para estes ensaios foram o acético, butírico, propiônico e ácido láurico.

O álcool isoamílico e a mistura de álcoois denominada óleo fúsel foram fornecidos pelo Centro de Tecnologia COPERSUCAR.

O óleo fúsel é um resíduo da indústria alcooleira, constituído de uma mistura de álcoois superiores, etanol, água e outros compostos. Com relação ao volume gerado no processo, são estimadas proporções entre 0,5 a 1% de óleo fúsel para cada litro de álcool produzido. Considerando que, a produção de álcool no país é da ordem de 12 bilhões de litros por ano, o volume de óleo fúsel gerado é de aproximadamente 120 milhões de litros.

Embora sua composição seja rica em álcoois superiores a taxa de recuperação deste resíduo é de apenas 25% do total produzido no país, ou seja, 30 milhões de litros por ano. Entre os possíveis processos de aproveitamento pode-se citar a sua utilização para a produção de álcoois superiores por destilação fracionada simples ou dupla, dependendo do produto final obtido. Vale lembrar que atualmente no Estado de São Paulo, existe uma unidade de produção de álcool isoamílico a partir de óleo fúsel; no entanto, nem toda a produção de óleo fúsel do Estado é processada. Apesar do aproveitamento deste resíduo não atuar diretamente na redução do custo final do álcool etílico, certamente representaria um importante passo no sentido de incrementar a eficiência global da indústria alcooleira. Neste sentido, a utilização tanto do álcool isoamílico como do óleo fúsel, matérias primas abundantes e de baixo custo, como precursores de ésteres de aromas para a indústria de alimentos, torna-se bastante atrativa sob os pontos de vista técnico-econômico.

Por se tratar de um subproduto da fermentação alcoólica de carboidratos, a composição dos álcoois superiores pode variar em função da matéria-prima empregada no processo.

No presente trabalho foi utilizado óleo fúsel proveniente da fermentação de caldo de cana-de-açúcar, possuindo a seguinte composição média (em porcentagem em peso): água (15,45%), etanol (13,27%), n-propanol (1,69%), iso-butanol (15,18%), n-butanol (0,93%) e isoamílico (51,40%).

A idéia da utilização do ácido láurico como substrato surgiu do fato de este ácido poder ser obtido com abundância e a baixo custo em nosso país, proveniente do óleo de babaçu. Ésteres de ácido láurico como: laurato de etila, butila e isoamila

são produzidos e comercializados como compostos que incrementam os aromas de frutas em alguns produtos, na Europa.

5.1.3.1. Condições da reação de esterificação

Um dos objetivos deste trabalho foi estudar a síntese de ésteres de aroma em meio reacional sem a adição de solventes orgânicos. Essa escolha pode ser justificada com base nas considerações de vários autores sobre as vantagens e desvantagens da síntese em solventes orgânicos. Utilizando sistemas livres de solventes não se corre riscos de desnaturação da enzima pelo solvente; não se geram descartes de difícil e onerosa reciclagem; a recuperação do produto é mais fácil e menos dispendiosa; não haverá limitação de temperatura de operação por parte dos reagentes; os sistemas são mais simples sem problemas de evaporação dos solventes além de considerarmos que os ésteres sintetizados sem a presença de solventes orgânicos poderão ser utilizados em alimentos sem maiores restrições.

As reações de esterificação foram realizadas em tubos plásticos cilíndricos de 10 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro com tampa de rosca, selados com parafilme. O sistema de reação foi composto por 0,02 moles de ácido graxo para 0,04 moles de álcool, 10 pérolas de vidro e adição de 1% de enzima em relação à massa total dos reagentes. Os frascos foram incubados com os substratos por 5 minutos em banho a 40°C antes da adição da enzima. As reações foram realizadas a 40°C em banho termostatzado com agitação de 130 oscilações por minuto. Foram recolhidas alíquotas após 4, 8 e 24 horas de reação.

5.1.3.2. Análise dos resultados e cálculo da porcentagem de esterificação

A análise das porcentagens de esterificação nestes ensaios de seleção das enzimas e substratos foi realizada por titulação do ácido residual do sistema após 4, 8, e 24 horas de reação. Este método foi escolhido por ser representativo e rápido, atendendo às necessidades desta fase do estudo.

Todos os resultados da seleção das lipases e substratos estão dispostos no primeiro capítulo de resultados e discussão deste trabalho.

As alíquotas foram dissolvidas em 10 mL de etanol contendo 0,1% de fenolftaleína e tituladas contra KOH 0,5 N.

A porcentagem de esterificação foi calculada considerando 100 % de ácido graxo livre no tempo zero de reação e subtraindo a porcentagem residual de ácido livre calculada pela equação abaixo.

A porcentagem residual de ácidos livres foi calculada pela fórmula :

$$\% \text{ AGR} = V \times N \times PM / 10 \times W$$

Onde: V = volume gasto de KOH na titulação;
 N = normalidade da solução de KOH utilizada;
 PM = peso molecular do ácido graxo titulado;
 W = peso da alíquota titulada.

5.2. Estudos da Otimização da síntese dos ésteres acetato, butirato e propionato de isoamila utilizando Planejamento Experimental e Análise da Superfície de Resposta.

5.2.1. Introdução aos métodos de Planejamento Experimental na Otimização de processos

A importância das variáveis em um processo pode ser determinada através da utilização de um método de planejamento experimental, o qual possibilita o planejamento e execução de forma organizada e racional de um número de ensaios reduzidos ao mínimo necessário. Estes métodos permitem a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta, a definição das variáveis mais importantes para o processo, a avaliação dos erros experimentais e de regressão, a modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas, através de programas estatísticos de regressão e conseqüentemente a definição das faixas ótimas de operação do processo, respeitando restrições quando houver.

Os métodos de planejamento experimental mais conhecidos são :

- Simplex;
- Planejamento fatorial;
- Método de análise por superfície de resposta.

O método simplex e suas derivações são adequados para ensaios rápidos já que a especificação das condições nas quais deve ser realizado o ensaio seguinte depende da resposta do ensaio anterior (BOX e col., 1978).

O método de planejamento experimental e análise de superfície de resposta tem como base o planejamento fatorial. Consiste num grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente (como rendimento e produtividade) e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas (como a temperatura, concentração, etc.). Estas técnicas são usadas para resolver principalmente as seguintes questões:

- Como uma resposta é afetada sobre uma região de interesse por um dado conjunto de variáveis de entrada;
- Quais conjuntos de variáveis de entrada resultarão num produto dentro das especificações desejadas;
- Quais os valores das variáveis de entrada que levarão ao melhor valor para uma resposta específica e como é a superfície de resposta próxima a este ponto.

Para aplicar o método de análise de superfície de resposta é necessário inicialmente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste em selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como se deseja reduzir o número de ensaios ao mínimo possível, um planejamento fatorial com 2 níveis (+1 e - 1) para cada variável é especificamente eficiente. Se "n" variáveis estiverem envolvidas no estudo de um determinado sistema, o número de experimentos que devem ser realizados para investigar todas as combinações possíveis é portanto 2^n . Acrescentam-se ainda ensaios no mínimo em triplicata realizados nas condições correspondentes às intermediárias entre as dos dois níveis atribuídos a cada variável (nível 0 ou ponto central do planejamento) com o objetivo de estimar o erro experimental associado aos ensaios (erro puro).

Neste ponto, pode-se considerar encerrado o método de planejamento fatorial. Com os dados obtidos após a execução dos ensaios é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas, determinar quais são os efeitos mais significativos, comparando o valor do efeito com o do erro experimental estimado, e até ajustar um modelo de 1ª ordem para correlacionar variáveis e respostas.

Caso se deseje explorar outras condições experimentais não previstas pelo planejamento fatorial ou se o modelo de 1ª ordem proposto não estiver bem correlacionado com os dados experimentais, pode-se completar o planejamento realizando ensaios nos pontos axiais para um modelo de 2ª ordem.

Para avaliar se os modelos empíricos obtidos através de regressão multilinear ou não linear apresentam um grau de ajuste adequado aos dados experimentais, BOX e col.1978 sugerem que seja feita uma análise estatística, utilizando como parâmetros o coeficiente de correlação da regressão e o valor estimado para o teste F descritos a seguir.

O coeficiente de correlação é um parâmetro estatístico que compara a variância dos pontos experimentais em relação ao modelo proposto, com a variância da própria população de pontos experimentais.

Quando o valor do coeficiente é 1, a correlação entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais é perfeita. Quando este valor é zero, não existe correlação. As análises dos valores intermediários não pode ser expressa de forma

tão simples, mas em termos qualitativos, quanto mais próximo da unidade estiver o valor do coeficiente de correlação, melhor será o ajuste do modelo aos pontos experimentais.

Através da realização do teste F, ou seja, comparando o valor estimado para F a partir dos dados experimentais com o valor tabelado para uma distribuição de referência, é possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas. O fundamento do teste F consiste em verificar se existe relação entre as variáveis e a resposta. Segundo BARROS e col. 1995, quando não há relação entre a resposta e a variável, pode-se demonstrar que a razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos (MQR/MQr) segue uma distribuição F (hipótese nula). Neste caso, a variação nos valores dos resultados foi devida exclusivamente a fatores aleatórios. A hipótese nula pode ser testada usando o valor efetivamente calculado para MQR/MQr. Para isso basta compará-lo com o valor de F tabelado. Se as variações nas respostas observadas experimentalmente apresentarem alta probabilidade de pertencerem a esta distribuição, não há razão para questionar a hipótese nula. Então pode-se afirmar que a equação de regressão não é significativa.

Por outro lado, se a razão MQR/MQr é maior que o F tabelado, pode-se afirmar que a equação é estatisticamente significativa e os dados experimentais são representados pelo modelo proposto.

Pode acontecer, porém, que uma regressão, embora significativa do ponto de vista do teste F, não seja útil para realizar previsões, por cobrir uma faixa de variação pequena dos fatores estudados. Tanto BOX & WETZ 1973, como BARROS e col. 1995, sugerem que para que isso não ocorra, isto é, para que uma regressão seja além de estatisticamente significativa, útil para fins preditivos, o valor da razão MQR/MQr deve ser no mínimo 4 a 5 vezes o valor de F tabelado.

Como exemplo da aplicação desta técnica em estudos de síntese enzimática, podemos citar o trabalho de SHIEH e col. 1996, que publicaram um estudo cujo objetivo foi estabelecer a relação entre os fatores (tempo de reação, quantidade de água, quantidade de enzima, relação molar entre os substratos) e a resposta (porcentagem de conversão molar) da reação de transesterificação na síntese de butirato de geranila. Os autores procuravam com o estabelecimento de uma relação matemática entre os fatores e a resposta, otimizar as condições de síntese do éster. Para tanto, empregaram a lipase de *Candida rugosa* e a metodologia de planejamento experimental e análise da superfície de resposta com ponto central.

5.2.2. Definição das variáveis de processo e os níveis a serem estudados

5.2.2.1. Estudos iniciais para definição das variáveis do processo

Foram realizados estudos iniciais, para definição das variáveis a serem estudadas nas síntese dos ésteres selecionados através dos resultados da seleção de lipases e substratos. As lipases selecionadas foram as de *Geotrichum sp* e *Rhizopus sp*. Os ésteres selecionados para o estudo de síntese foram os ésteres acetato, butirato e propionato de isoamila. As discussões e justificativas para estas escolhas estão no primeiro capítulo de resultados e discussão.

Nesta fase do estudo, a análise e quantificação das reações foi realizada por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama. A concentração residual do álcool no sistema foi determinada após intervalos de tempo com o uso de um padrão interno. Esse procedimento também foi seguido em trabalhos descritos pela literatura investigada e citada aqui.

Para os estudos iniciais das condições das reações de esterificação, foi estabelecido que a concentração enzimática do sistema e a temperatura de reação fossem mantidas constantes nos valores de 1% em peso dos reagentes e 40° C respectivamente, valores razoáveis para a detecção de atividade enzimática. Portanto, mantendo-se a temperatura e concentração enzimática constantes, resta estabelecer a melhor relação molar (ou faixa) entre os substratos álcool e ácido.

Nos estudos relatados na literatura a faixa de variação testada entre as concentrações de álcool e ácido é muito variada e não segue um padrão definido. Geralmente esta relação entre os substratos está intimamente ligada à fonte da lipase empregada que pode resistir (ou não) a maiores ou menores concentrações dos reagentes no sistema. Portanto, foram testadas as seguintes relações molares entre álcool e ácido a fim de se obter uma idéia do comportamento das lipases selecionadas de *Geotrichum sp* e *Rhizopus sp*.

Fixando a concentração de ácido em 0,02 moles, a concentração de álcool foi sendo variada em 0,01; 0,02; 0,04; 0,06 e 0,08 moles onde foram medidas as porcentagens de esterificação. Em seguida foi fixada a concentração de álcool nos pontos de maior conversão para cada éster e variada a concentração de ácido em 0,005; 0,01; 0,02 0,04 e 0,06 moles.

Alíquotas do meio de reação foram recolhidas nos tempos de 2,4,6,8,24,48 e 72 horas, a fim de se definir os melhores intervalos de tempo a serem medidos. Estes ensaios foram cruciais na definição das faixas de estudo em que deveriam ser realizados os ensaios de esterificação, empregando a metodologia de delineamento experimental.

A partir dos resultados obtidos durante os estudos iniciais, foram estabelecidas as variáveis a serem estudadas em combinação, na expectativa de se analisar o efeito proporcionado sobre a porcentagem de esterificação dos ésteres.

As variáveis escolhidas foram : temperatura de reação (T), concentração enzimática (E), tipo de lipase (tipo E) e relação molar entre álcool e ácido (RM). O tempo não foi estabelecido como variável independente, mas as respostas foram dadas em função dele, ou seja, todos os experimentos foram realizados durante 72 horas e as respostas medidas após 6, 24, 48 e 72 horas de reação.

5.2.2.2. Definição dos níveis para a variável temperatura

Com base nos dados de estabilidade térmica das lipases de *Geotrichum sp* e *Rhizopus sp* relatados em estudos anteriores por MACEDO & PASTORE (1995) e COSTA & PASTORE (1996), a faixa de variação de temperatura foi estabelecida entre 40° C e 60° C. Abaixo de 40° C a velocidade da reação seria muito lenta impossibilitando verificação de atividade em faixas razoáveis; acima de 60° C as lipases perderiam sua estabilidade.

5.2.2.3. Definição dos níveis para a variável concentração enzimática.

Embora a concentração proteica e a atividade lipolítica das lipases tenham sido determinadas, a concentração enzimática nas reações de esterificação foi sempre calculada em função da massa total dos reagentes. Foi assim definido por que a definição de atividade de esterificação mediada por lipases é muitas vezes particular ao sistema de síntese empregado. Não foi definida, portanto, uma atividade de esterificação para este estudo, não só por não ter sido considerado necessário mas também porque as lipases empregadas são preparações enzimáticas brutas.

Convém ressaltar que, para os cálculos da produtividade do sistema em estudo (gramas de éster formado / gramas de enzima), o modelo adotado é válido e tem sido exaustivamente empregado na literatura.

O nível mínimo para a concentração enzimática foi estabelecido como 1% (m/m), concentração mínima para detecção de atividade sintética e o nível máximo foi estabelecido em 10% (m/m) de enzima, dentro da possibilidade operacional, pois acima desta concentração a enzima não se dissolveria no sistema.

5.2.2.4. Comparação entre as lipases de *Geotrichum sp* e *Rhizopus sp*.

Esta variável do processo foi estabelecida a fim de se comparar o desempenho das lipases de *Geotrichum sp* e *Rhizopus sp* na síntese de acetato, butirato e propionato de isoamila, uma vez que as duas se mostraram viáveis na síntese mesmo possuindo características lipolíticas tão diferentes.

5.2.2.5. Definição dos níveis para a variável relação molar entre os substratos.

Quando se estuda relação entre os substratos procura-se descobrir quanto de excesso de um dos reagentes é possível adicionar ao sistema a fim de deslocar o equilíbrio químico da reação no sentido do produto. Com os resultados obtidos nos ensaios preliminares, pode-se estabelecer que a concentração máxima de ácido no sistema seria a representada pela relação álcool: ácido de 1:2 e que por outro lado, a concentração máxima de álcool no sistema seria representada pela relação 4:1. Estes limites foram impostos pelas características bioquímicas das lipases em estudo.

5.2.2.6. Delineamento experimental dos ensaios

Para estudar o efeito das variáveis temperatura, concentração enzimática, relação molar entre os substratos e tipo de enzima, na taxa de conversão dos ésteres, foi empregado planejamento experimental do tipo central composto rotacional de 2ª ordem (COCHRAN & COX, 1964). As variáveis foram examinadas em 2 níveis codificados como -1, +1. O delineamento de 2ª ordem com 4 variáveis independentes exigiu um número mínimo de 16 experimentos (2^4). Os valores reais correspondentes a esses níveis foram estabelecidos dentro das possibilidades operacionais do processo e com base nos diversos ensaios preliminares realizados.

A tabela 6 mostra os valores máximos e mínimos estudados para cada variável, sendo que X_3 é uma variável qualitativa e não quantitativa. O planejamento fatorial permite este tipo de estudo, o que é muito interessante quando se deseja avaliar qual tipo de lipase é mais eficiente dentro das mesmas condições estudadas.

TABELA 6 - Variáveis e níveis para Delineamento experimental I

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X_1 = Relação molar entre álcool : ácido	(1:2)	(2,25:1)	(4:1)
X_2 = Temperatura (°C)	40°C	50°C	60°C
X_3 = Tipo de lipase	<i>Geotrichum sp</i>		<i>Rhizopus sp</i>
X_4 = Concentração de lipase	1%	5,5 %	10%

O delineamento experimental está apresentado na Tabela 7 na forma codificada e na Tabela 8 em valores reais.

TABELA 7 - Delineamento experimental 1 para quatro variáveis em valores codificados.

<i>Ensaio</i>	<i>Níveis das Variáveis</i>			
	X_1	X_2	X_3	X_4
1	- 1	- 1	- 1	- 1
2	+1	- 1	- 1	- 1
3	- 1	+1	- 1	- 1
4	+1	+1	- 1	- 1
5	- 1	- 1	+1	- 1
6	+1	- 1	+1	- 1
7	- 1	+1	+1	- 1
8	+1	+1	+1	- 1
9	- 1	- 1	- 1	+1
10	+1	- 1	- 1	+1
11	- 1	+1	- 1	+1
12	+1	+1	- 1	+1
13	- 1	- 1	+1	+1
14	+1	- 1	+1	+1
15	- 1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	+1	0
18	0	0	+1	0
19	0	0	+1	0
20	0	0	- 1	0
21	0	0	- 1	0
22	0	0	- 1	0

X_1 = Relação molar entre álcool : ácido

X_2 = Temperatura (° C)

X_3 = Tipo de lipase

X_4 = Concentração de lipase

TABELA 8 - Delineamento experimental 1 em valores reais.

<i>Ensaio</i>	<i>Níveis das Variáveis</i>			
	X_1	X_2	X_3	X_4
1	(1:2)	40	G.sp.	1%
2	(4:1)	40	G.sp.	1%
3	(1:2)	60	G.sp.	1%
4	(4:1)	60	G.sp.	1%
5	(1:2)	40	R.sp.	1%
6	(4:1)	40	R.sp.	1%
7	(1:2)	60	R.sp.	1%
8	(4:1)	60	R.sp.	1%
9	(1:2)	40	G.sp.	10%
10	(4:1)	40	G.sp.	10%
11	(1:2)	60	G.sp.	10%
12	(4:1)	60	G.sp.	10%
13	(1:2)	40	R.sp.	10%
14	(4:1)	40	R.sp.	10%
15	(1:2)	60	R.sp.	10%
16	(4:1)	60	R.sp.	10%
17	(2,25:1)	50	R.sp.	5,5 %
18	(2,25:1)	50	R.sp.	5,5 %
19	(2,25:1)	50	R.sp.	5,5 %
20	(2,25:1)	50	G.sp.	5,5 %
21	(2,25:1)	50	G.sp.	5,5 %
22	(2,25:1)	50	G.sp.	5,5 %

X_1 = Relação molar entre álcool : ácido

X_2 = Temperatura (° C)

X_3 = Tipo de lipase

X_4 = Concentração de lipase

5.2.3. Condições das reações de esterificação

As reações de esterificação direta para a síntese de acetato, butirato e propionato de isoamila foram realizadas de acordo com o desenho experimental.

Seguindo as recomendações estatísticas, os experimentos foram realizados de forma aleatória.

As concentrações iniciais de água presente nos substratos foi medida por Karl Fisher (tabela 9). Os substratos não foram desidratados para as reações e a

padrão interno hexanol, 150 uL da alíquota de reação e 750 uL de hexano. Foi aplicado 1 uL desta solução no cromatógrafo.

b) Condições cromatográficas

Foi utilizado um Cromatógrafo gasoso Chrompack CP 9001 com detector de ionização de chama (FID) e uma coluna de separação do tipo CP-WAX 52 CB com 30 m; 0,32 um x 0,2 mm. As análises foram realizadas utilizando a temperatura da coluna inicial de 35° C por 2 minutos, aumentando gradativamente de 5° C por minuto até 90° C onde permaneceu por 2 minutos. A temperatura do detector foi fixada em 200° C, a temperatura do injetor a 150° C, empregando como gás de arraste hidrogênio na vazão de 1 mL por minuto em sistema de injeção split com razão de 1:100.

5.2.5. Condições de análise por Cromatografia Gasosa - detetor seletivo de massa

Foram realizadas análises de algumas reações no CG-MS a fim de se identificar através de comparação com a espectroteca do equipamento os tempos de retenção e a identidade dos compostos nos cromatogramas.

O cromatógrafo gasoso com detetor de massa utilizado foi o HP 5890 series II com detector seletivo de massa MSD- HP 5970. A coluna de separação foi a FFAP com 50 m x 0,32 um x 0,2 mm. As análises foram realizadas utilizando a temperatura da coluna inicial de 60° C mantendo-a por 1 minuto, aumentando gradativamente de 5° C por minuto até 150° C onde permaneceu por 15 minutos. A temperatura do detector foi fixada em 250° C, a temperatura do injetor a 200° C, empregando como gás de arraste hélio na vazão de 0,64 mL por minuto em sistema de injeção split com razão de 0,68:150.

Cálculo da concentração dos ésteres

O cálculo da porcentagem de esterificação foi realizado em função do cálculo de consumo do álcool isoamílico. A concentração de álcool isoamílico residual foi encontrada utilizando-se como padrão interno hexanol. A concentração inicial considerada foi sempre a limitante.

$$\% \text{ Esterificação} = 1 - \text{Concentração final de isoamílico} / \text{Concentração inicial isoamílico} \times 100$$

As concentrações iniciais de água presente nos substratos foi medida por Karl Fisher (tabela 9). Os substratos não foram desidratados para as reações e a concentração inicial de água nos sistemas de síntese foi calculada e encontra-se na tabela 10.

TABELA 9 - Concentração de água nos substratos

<i>Substrato</i>	<i>Concentração de água</i> (% m/m)
Álcool Isoamílico	0,84
Ácido Acético	0,54
Ácido Butírico	0,15
Ácido Propiônico	0,20

TABELA 10 - Concentração inicial de água nos sistemas de síntese

<i>Sistema</i>	<i>Concentração de água (% m/m)</i>	
	Relação Molar	
	(1:2)	(4:1)
Isoamílico:Acético	0,66	0,80
Isoamílico:Butírico	0,38	0,70
Isoamílico:Propiônico	0,42	0,74

Os experimentos foram conduzidos em tubos plásticos cilíndricos de 10 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro com tampa de rosca, selados com parafilme e com 10 pérolas de vidro em cada tubo. Os frascos foram incubados com os substratos por 5 minutos em banho antes da adição da enzima. As reações foram realizadas em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto. Foram recolhidas alíquotas após 6, 24, 48 e 72 horas de reação.

Foram realizados experimentos sem adição de enzima a fim de se avaliar a porcentagem de esterificação espontânea dos sistemas.

5.2.4. Análise e quantificação dos ésteres por Cromatografia Gasosa -FID

a) Preparo das alíquotas recolhidas para análise no CG.

As alíquotas recolhidas do sistema de reação foram centrifugadas a 4° C , 10000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante congelado em freezer por no máximo 24 horas. As amostras para cromatografia gasosa foram preparadas com 100 uL de

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Resultados dos estudos preliminares para seleção das lipases e substratos

Os percentuais de síntese dos ésteres de ácido acético, butírico, propiônico e láurico obtidos por esterificação direta com os álcoois: metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, isopentanol (isoamílico), citrônol e óleo fúsel nas condições descritas nos itens 4.1.4 e 4.1.5 estão dispostos neste capítulo. Os resultados foram analisados separadamente, de acordo com o tipo de lipase. As maiores taxas de esterificação obtidas pelas lipases testadas estão na figura 10 que resume e conclue esta etapa do trabalho.

Para todos os tipos de lipases testadas foram observados os aspectos da influência do tipo de álcool e do tamanho da cadeia carbônica do álcool, bem como a influência do tipo de ácido na porcentagem de síntese obtidas pelas lipases.

6.1.1. Resultados obtidos com a lipase de *Geotrichum sp*

Os gráficos das porcentagens de esterificação obtidas pela lipase de *Geotrichum sp* estão expostos nas figuras 4a a 4j. Os dados numéricos podem ser consultados no anexo 2. A figura 4j resume as maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Geotrichum sp*.

Com relação à influência da cadeia carbônica do álcool nas taxas de conversão, observou-se que com o aumento da cadeia carbônica, a porcentagem de esterificação sofreu leve acréscimo, ficando constante por volta de 60% na presença dos álcoois propanol, butanol e isopentanol. Quando o óleo fúsel foi empregado como substrato a lipase de *Geotrichum sp* apresentou uma conversão máxima por volta de 70 % a partir de 8 horas de reação. A mesma faixa de conversão foi observada para o citrônol. Aparentemente a atividade sintética da lipase em estudo não foi influenciada pela presença dos isômeros *n* ou *iso* testados.

Analisando a influência do tipo de ácido empregado, observou-se que as maiores taxas de conversão foram obtidas com o ácido acético, ficando entre 60 e 80 % após 8 horas de reação. Quando o ácido acético foi esterificado com o citrônol, as porcentagens de esterificação observadas situaram-se na faixa de 45 %. Neste caso, provavelmente, a catálise foi inibida em função da presença do citrônol junto ao ácido acético.

As porcentagens de esterificação obtidas com os ácido butírico e propiônico foram muito semelhantes neste caso (40 a 70 %), e acentuadamente maiores que as observadas para o ácido láurico (20 a 50%). Foi observado que na presença de

Lipase de *Geotrichum sp* Metanol

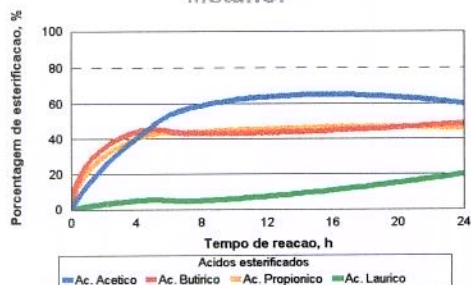


Fig. 4a - Síntese de esteres de metanol

Lipase de *Geotrichum sp* Etanol

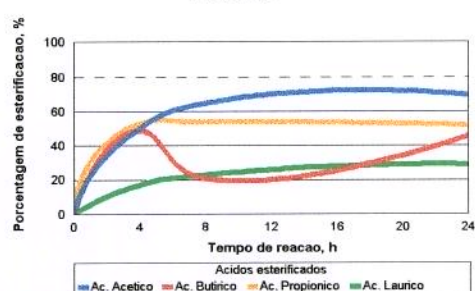


Fig. 4b - Síntese de esteres de etanol

Lipase de *Geotrichum sp* Propanol

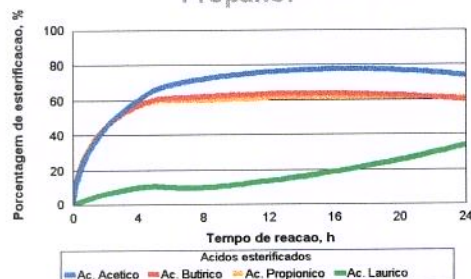


Fig. 4c - Síntese de esteres de propanol

Lipase de *Geotrichum sp* Iso propanol

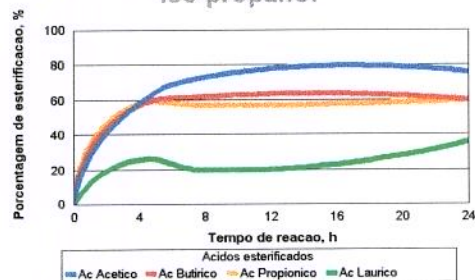


Fig. 4d - Síntese de esteres de iso propanol

Lipase de *Geotrichum sp* Butanol

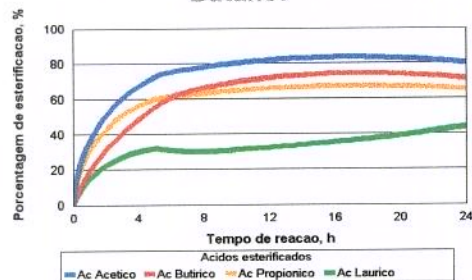


Fig. 4e - Síntese de esteres de butanol

Lipase de *Geotrichum sp* Iso butanol

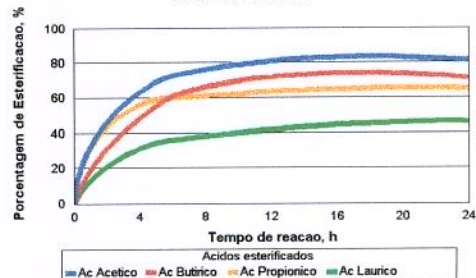


Fig. 4f - Síntese de esteres de iso butanol

Lipase de *Geotrichum sp* Iso pentanol

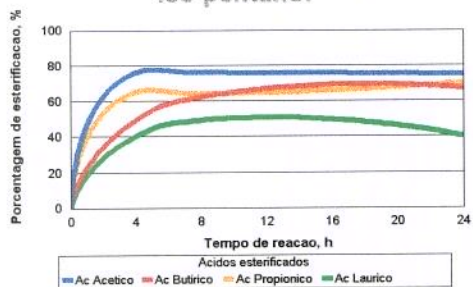


Fig. 4g - Síntese de ésteres de iso pentanol

Lipase de *Geotrichum sp* Oleo Fusel

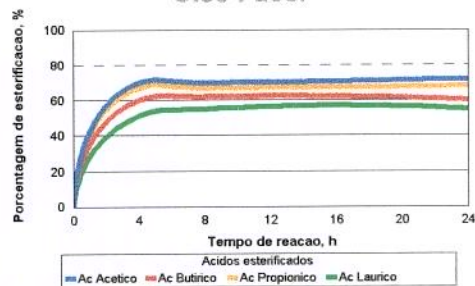


Fig. 4h - Síntese de ésteres de óleo fusel

Lipase de *Geotrichum sp* Citronelol

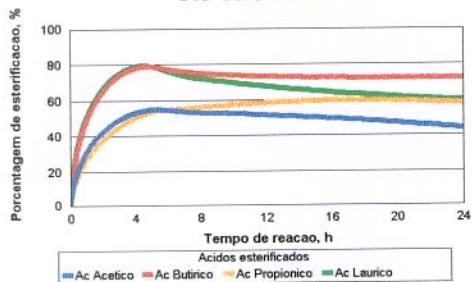


Fig. 4i - Síntese de ésteres de citronelol

Maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Geotrichum sp*

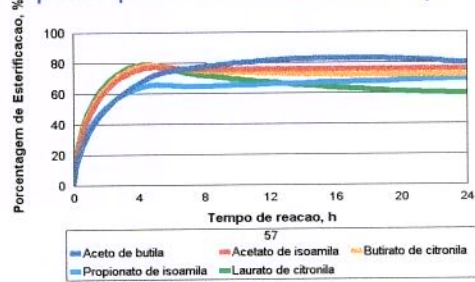


Fig. 4j - Síntese de ésteres pela lipase de *Geotrichum sp*

citronelol, as taxas de esterificação atingiram até 80% após 8 horas de reação, para o ácido láurico.

A figura 4j resume as maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Geotrichum sp*: acetato de butila, acetato de isoamila, butirato de citronelila, propionato de isoamila e laurato de citronelila.

Pode-se concluir a análise dos resultados obtidos com a lipase de *Geotrichum sp* afirmando que a mesma possui habilidade de esterificar variados substratos nas condições testadas, com preferência para os álcoois isoamílico e citronelol.

6.1.2. Resultados obtidos com a lipase de *Alcaligenes sp*.

Os gráficos das porcentagens de esterificação obtidas pela lipase de *Alcaligenes sp* estão expostos nas figuras 5a a 5j. Os dados numéricos podem ser consultados no anexo 2. A figura 5j resume as maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Alcaligenes sp*.

Com relação à influência da cadeia carbônica do álcool nas taxas de conversão, observou-se que a lipase de *Alcaligenes sp* parece ser inibida na presença de metanol onde as taxas de esterificação observadas ficaram em torno de 3%. A maior taxa de conversão foi observada para o acetato de metila com 60% após 8 horas de reação. Ao observar os perfis das curvas obtidas para os demais álcoois, verificou-se que a presença do álcool terpênico citronelol foi marcante na atuação da lipase de *Alcaligenes sp*. Para os demais álcoois, as diferenças nos valores de esterificação observados parece ser no entanto, função da natureza do ácido empregado. As maiores taxas de esterificação foram observadas com o ácido acético, em relação ao desempenho obtido com os demais ácidos testados. O perfil de preferência da lipase de *Alcaligenes sp* entre os ácidos testados foi na ordem decrescente: ácido acético, ácidos propiônico e butírico igualmente e por último ácido láurico. Este comportamento foi alterado na presença de citronelol, quando as maiores taxas de conversão foram observadas com os ácidos láurico (70-80 %), butírico nas primeiras horas de reação, seguidos pelos ácidos acético e propiônico.

As maiores taxas de esterificação obtidas com a lipase de *Alcaligenes sp* estão expostas na figura 5j com os ésteres acetato de isopropila , butirato de citronelila, laurato de citronelila e propionato de isoamila.

Lipase de *Alcaligenes sp* Metanol

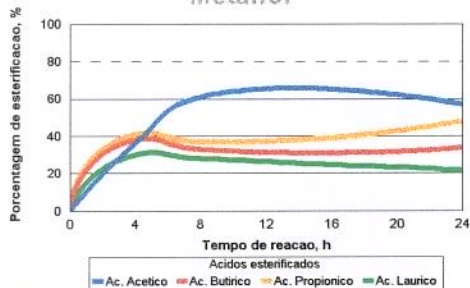


Fig. 5a - Sintese de esteres de metanol

Lipase de *Alcaligenes sp* Etanol

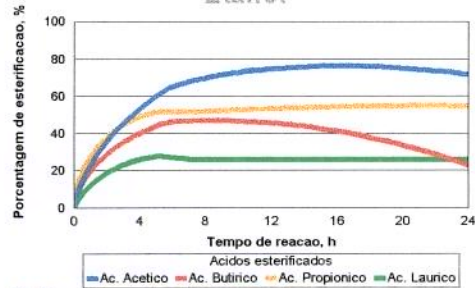


Fig.5b - Sintese de esteres de etanol

Lipase de *Alcaligenes sp* Propanol

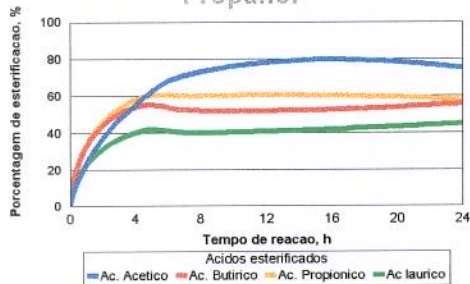


Fig. 5c - Sintese de esteres de propanol

Lipase de *Alcaligenes sp* Iso propanol

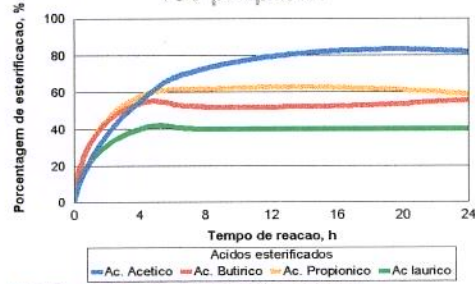


Fig. 5d - Sintese de esteres de Iso propanol

Lipase de *Alcaligenes sp* Butanol

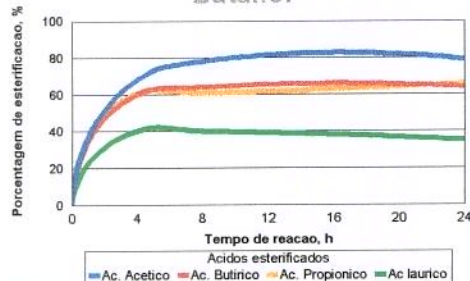


Fig. 5e - Sintese de esteres de butanol

Lipase de *Alcaligenes sp* Iso butanol

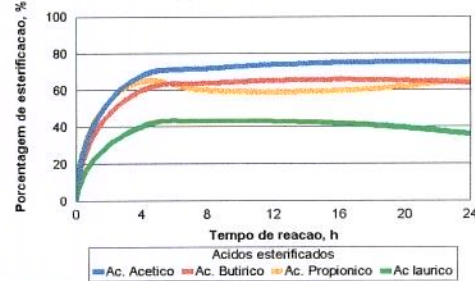


Fig. 5f - Sintese de esteres de iso butanol

Lipase de *Alcaligenes sp* Iso pentanol

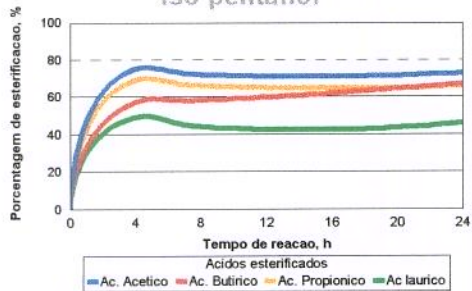


Fig. 5g - Síntese de ésteres de iso pentanol

Lipase de *Alcaligenes sp* Oleo Fusel

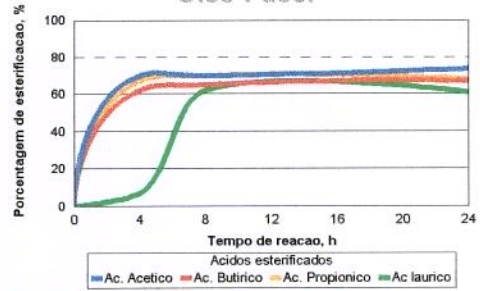


Fig. 5h - Síntese de ésteres de óleo fusel

Lipase de *Alcaligenes sp* Citronelol

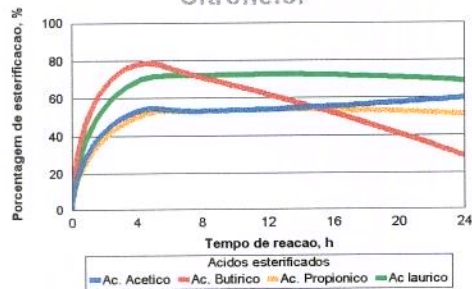


Fig. 5i - Síntese de ésteres de citronelol

Maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Alcaligenes sp*

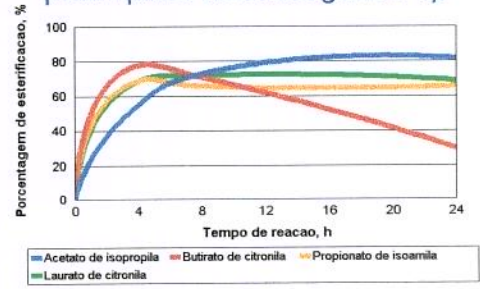


Fig. 5j - Síntese de ésteres pela lipase de *Alcaligenes sp*

6.1.3. Resultados obtidos com a lipase de *Aspergillus sp* - 1068.

Os gráficos das porcentagens de esterificação obtidas pela lipase de *Aspergillus sp* - 1068 estão expostos nas figuras 6a a 6j. Os dados numéricos podem ser consultados no anexo 2. A figura 6j resume as maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Aspergillus sp* - 1068.

Dentre os álcoois testados, as menores taxas de conversão foram obtidas com o metanol, ficando por volta de 30 a 55%. Com os demais álcoois, as taxas de conversão estiveram entre 40 e 80%. Com o ácido acético, observou-se porcentagem de esterificação destacável em relação aos demais ácidos, porém quando os álcoois metanol e etanol foram empregados, esta lipase parece ter sua atividade diminuída na presença do ácido acético. Com o aumento da cadeia carbônica dos álcoois, os ésteres dos ácidos propiônico e butírico apresentaram acréscimo em sua taxa de conversão. As taxas de conversão obtidas com o ácido láurico são sempre inferiores às demais, até quando a presença do citronelol inverte o quadro aumentando a conversão de éster de ácido láurico.

As maiores taxas de conversão observadas com a lipase de *Aspergillus sp* 1068, estão expostas na figura 6j com os ésteres acetato de isoamila, propionato de isoamila, butirato e laurato de citronelila.

6.1.4. Resultados obtidos com a lipase de *Aspergillus sp* - 1099.

Os gráficos das porcentagens de esterificação obtidas pela lipase de *Aspergillus sp* - 1099 estão expostos nas figuras 7a a 7j. Os dados numéricos podem ser consultados no anexo 2. A figura 7j resume as maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Aspergillus sp* - 1099.

Observando a influência do álcool nas taxas de conversão obtidas pela lipase de *Aspergillus sp* - 1099, pode-se perceber que o perfil de comportamento desta lipase é muito semelhante à da *Aspergillus sp* 1068. O citronelol exerceu grande influência nas taxas de conversão dos ácidos láurico e butírico, exatamente como relatado anteriormente. O aumento da cadeia carbônica dos álcoois resulta no aumento das taxas de esterificação.

Quanto à influência dos ácidos, as maiores conversões foram no sentido decrescente : ácido acético seguido pelos ácidos butírico e propiônico e pôr último o ácido láurico na presença de todos os álcoois. A exceção foi observada na presença do álcool citronelol, onde as taxas de esterificação obtidas com o ácido láurico foram as maiores, seguidas pelos ácidos butírico, propiônico e acético.

Lipase de *Aspergillus sp* - 1068 Metanol

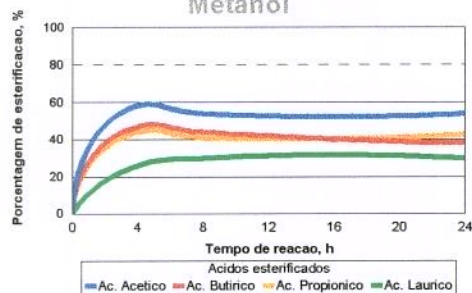


Fig. 6a - Síntese de ésteres de metanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1068 Etanol

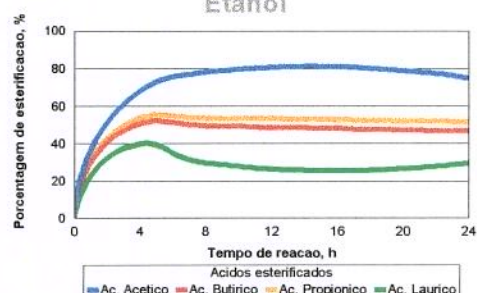


Fig. 6b - Síntese de ésteres de etanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1068 Propanol

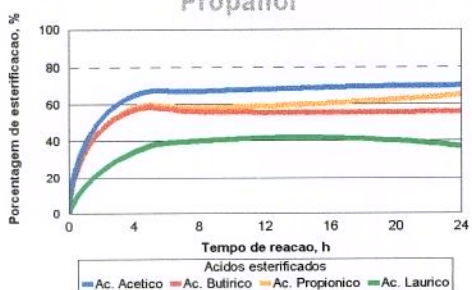


Fig. 6c - Síntese de ésteres de propanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1068 Iso propanol

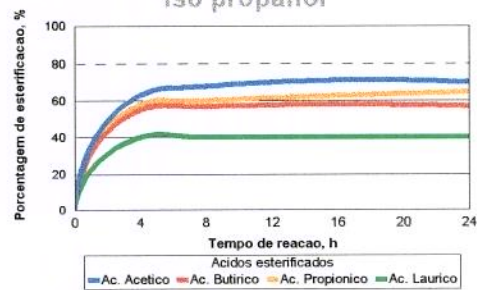


Fig. 6d - Síntese de ésteres de iso propanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1068 Butanol

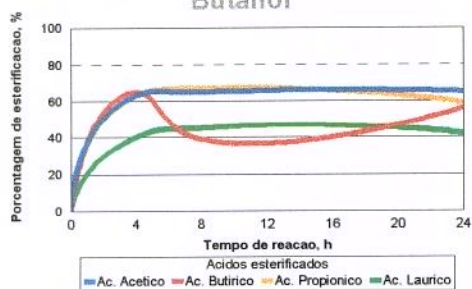


Fig. 6e - Síntese de ésteres de butanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1068 Iso butanol

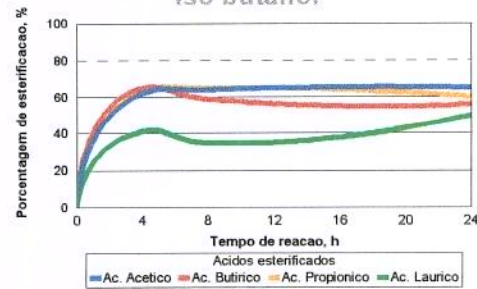


Fig. 6f - Síntese de ésteres de iso butanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1068 Iso pentanol

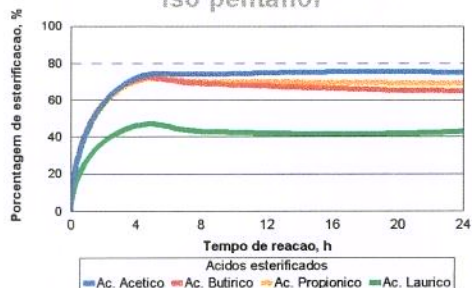


Fig. 6g - Síntese de esteres de iso pentanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1068 Oleo Fusel

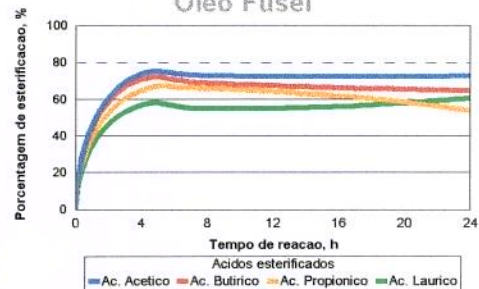


Fig. 6h - Síntese de esteres de oleo fusel

Lipase de *Aspergillus sp* - 1068 Citronelol

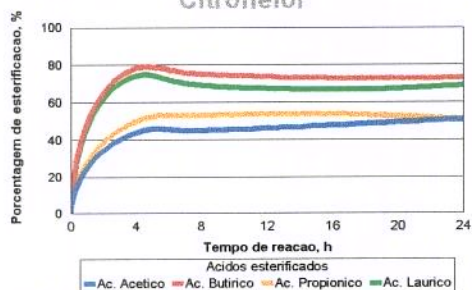


Fig. 6i - Síntese de esteres de citronelol

Maiores taxas de conversao obtidas pela lipase de *Aspergillus sp* 1068

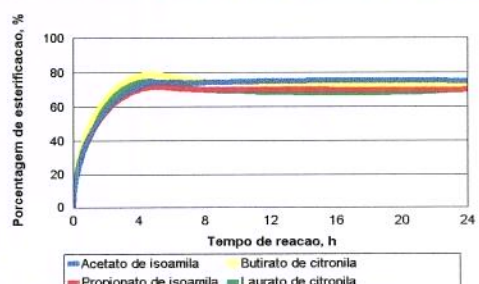


Fig. 6j - Síntese de esteres pela lipase de *Aspergillus sp* 1068

Lipase de *Aspergillus sp* - 1099

Metanol

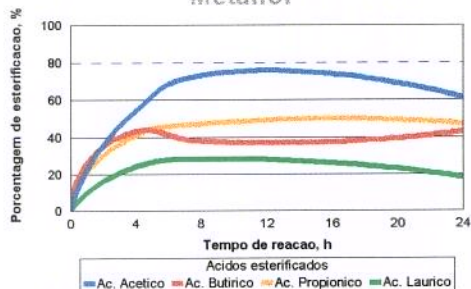


Fig. 7a - Síntese de esteres de metanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1099

Etanol

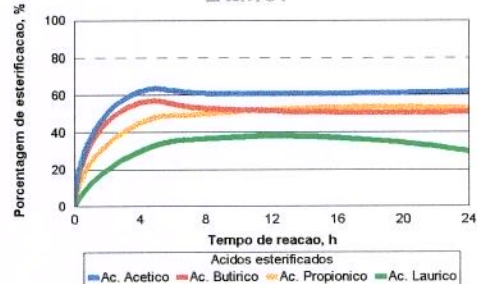


Fig. 7b - Síntese de esteres de etanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1099

Propanol

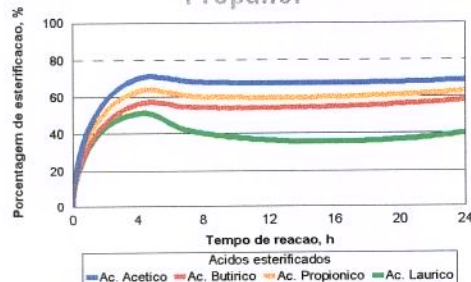


Fig. 7c - Síntese de esteres de propanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1099

Iso propanol

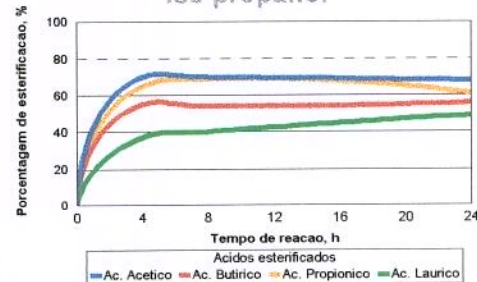


Fig. 7d - Síntese de esteres de iso propanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1099

Butanol

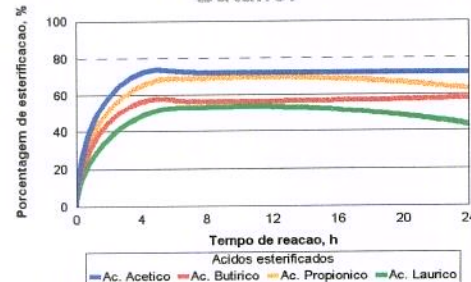


Fig. 7e - Síntese de esteres de butanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1099

Iso butanol

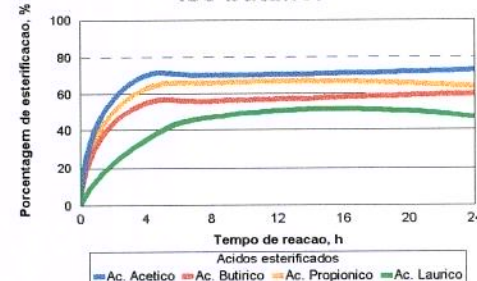


Fig. 7f - Síntese de esteres de iso butanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1099 Iso pentanol

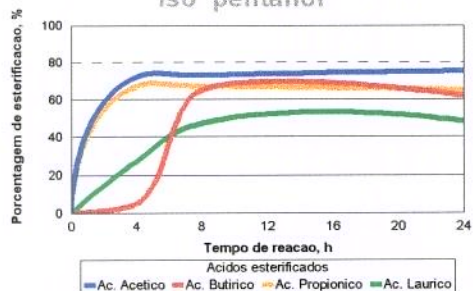


Fig. 7g - Sintese de esteres de iso pentanol

Lipase de *Aspergillus sp* - 1099 Oleo Fusel

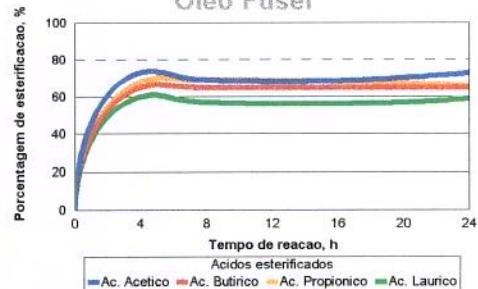


Fig. 7h - Sintese de esteres de oleo fusel

Lipase de *Aspergillus sp* - 1099 Citronelol

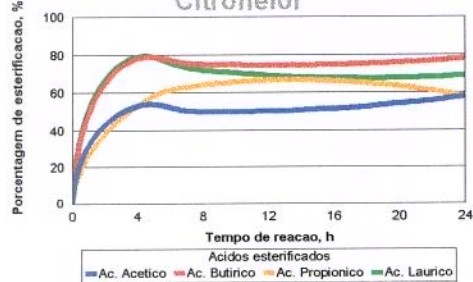


Fig. 7i - Sintese de esteres de citronelol

Maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Aspergillus sp* 1099

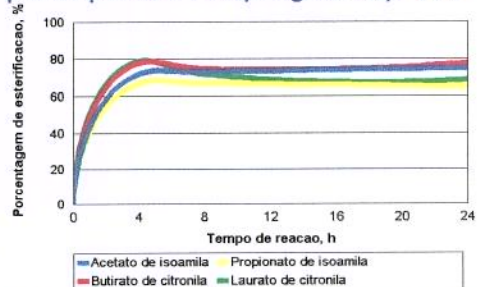


Fig. 7j - Sintese de esteres pela lipase de *Aspergillus sp* 1099

As lipases do gênero *Aspergillus*, mostraram ter preferência por substratos de cadeia carbônica maior, para a síntese neste tipo de sistema.

A figura 7j ilustra as maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Aspergillus sp* - 1099, para cada tipo de ácido testado: acetato de isoamila, propionato de isoamila, butirato de citronila e laurato de citronelila.

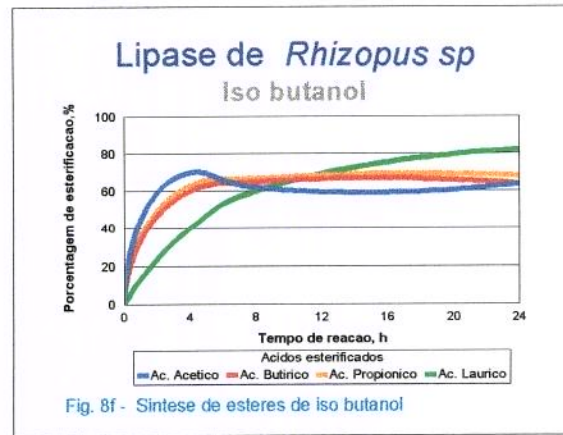
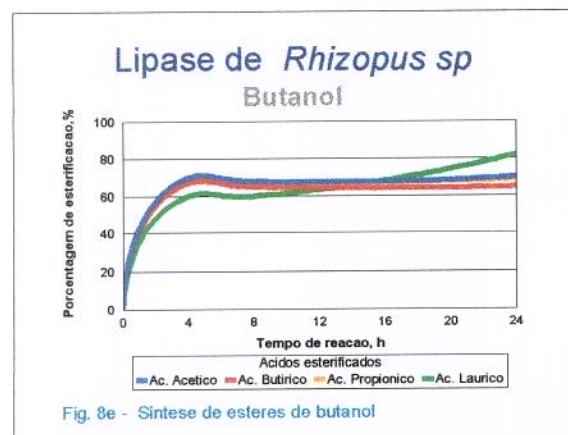
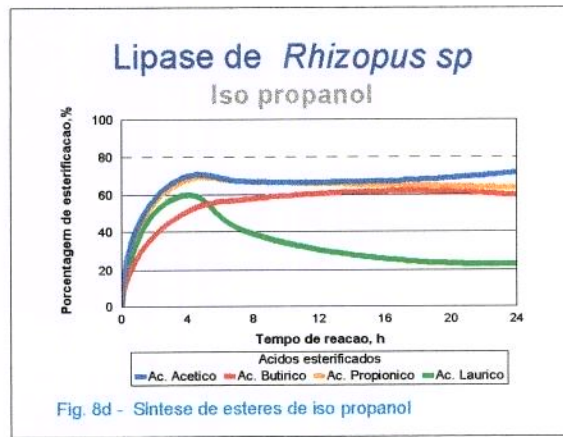
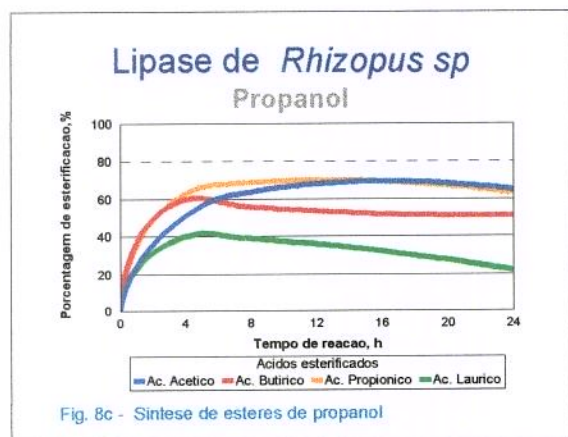
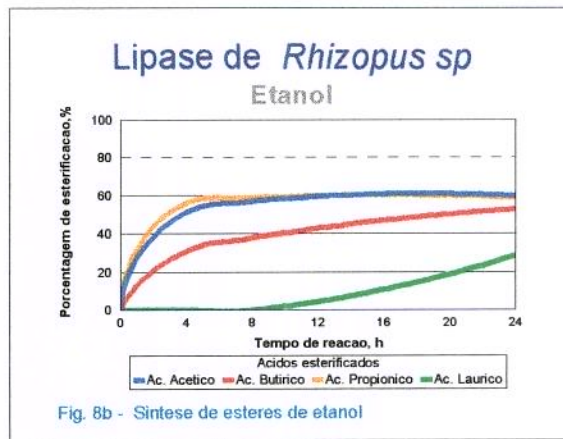
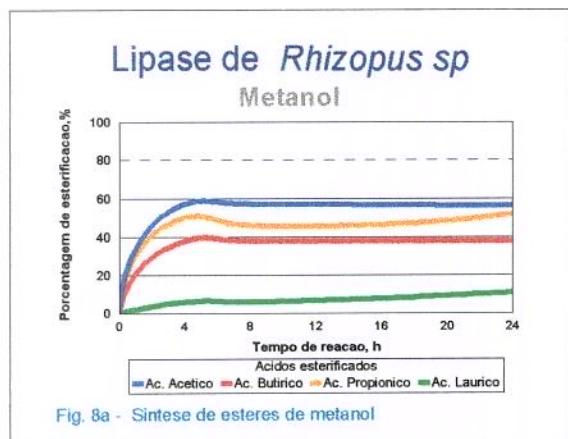
6.1.5. Resultados obtidos com a lipase de *Rhizopus sp*.

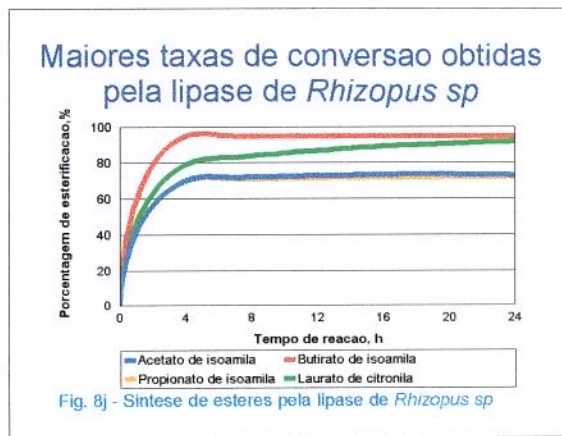
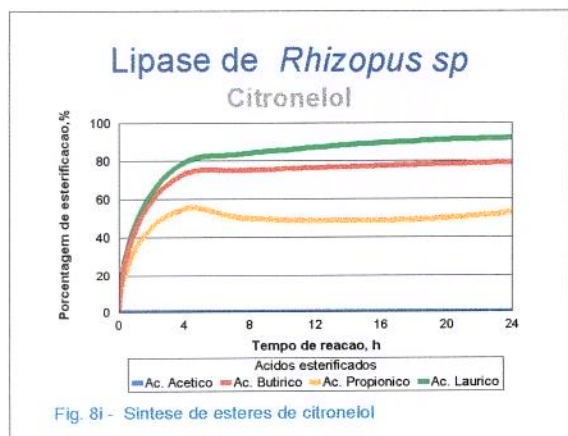
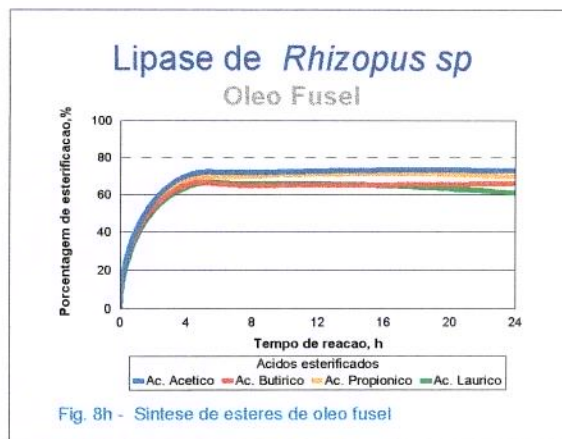
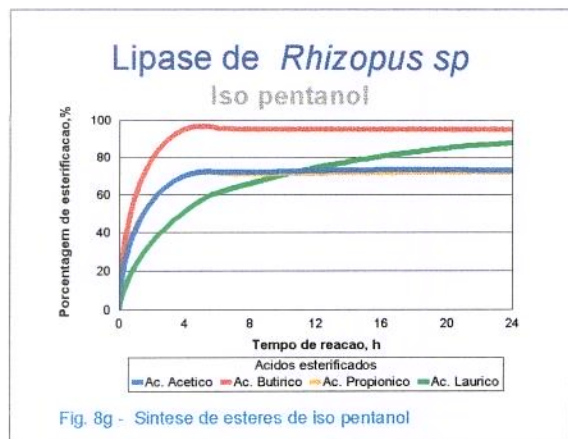
Os gráficos das porcentagens de esterificação obtidas pela lipase de *Rhizopus sp* estão expostos nas figuras 8a a 8j. Os dados numéricos podem ser consultados no anexo 2. A figura 8j resume as maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Rhizopus sp*.

A ordem crescente de atividade sintética da lipase de *Rhizopus sp* com relação aos álcoois foi: metanol semelhante ao etanol e menores que o propanol, butanol e óleo fúsel que pôr sua vez obtiveram taxas de conversão menores que o álcool isoamílico e citronelol. A lipase de *Rhizopus sp* mostrou ter afinidade maior por álcoois de cadeia carbônica maiores que C4. As porcentagens de esterificação observadas para os álcoois propanol, isopropanol, butanol, isoabutanol, e para o óleo fúsel são muito semelhantes e por volta de 65 % para a maioria dos ésteres sintetizados. A afinidade pelos álcoois isoamílico e citronelol foi clara, onde foram observadas as maiores taxas de conversão com a lipase de *Rhizopus sp*.

Com relação à influência do tipo de ácido, pode-se observar que não houve afinidade marcante da lipase por qualquer tipo de ácido especificamente. A diferenciação entre as taxas de conversão ocorre pela influência dos substratos em conjunto, como nos casos anteriores. Dados significativos foram observados para as taxas obtidas para os ésteres metil e etil laurato (10 - 20 %) que mostraram ser muito inferiores às demais obtidas com o ácido láurico. A maior taxa de esterificação observada com o ácido láurico, foi por volta de 90 % após 24 horas de reação com os álcoois isoamílico e citronelol. A lipase de *Rhizopus sp* destacou-se na síntese de ésteres de ácido láurico em relação às demais lipases. As taxas de esterificação observadas com o ácido acético ficaram por volta de 65% com exceção do acetato de citronelila que não foi esterificado pela lipase de *Rhizopus sp*. É importante ressaltar o ótimo desempenho obtido pela lipase de *Rhizopus sp* na síntese de butirato de isoamila com conversão rápida e estável perto de 95%.

As maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Rhizopus sp* para cada um dos ácidos testados estão dispostas na figura 8j: acetato de isoamila, butirato de isoamila, propionato de isoamila e laurato de citronelila. Sem dúvida, com o álcool isoamílico foram observadas as melhores taxas de esterificação com estabilidade das reações para a lipase de *Rhizopus sp*.





6.1.6. Resultados obtidos com a lipase de *Candida rugosa*.

Os gráficos das porcentagens de esterificação obtidas pela lipase de *Candida rugosa* estão expostos nas figuras 9a a 9j. Os dados numéricos podem ser consultados no anexo 2. A figura 9j resume as maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Candida rugosa*.

O principal a observar neste caso, é que os experimentos foram realizados com a lipase de *Candida rugosa* por se tratar de uma lipase comprovadamente capaz de esterificar substratos do tipo dos testados neste trabalho. Portanto, esperava-se que o desempenho da lipase de *Candida rugosa* fosse superior às demais lipases testadas, em todos os casos. O fato é que apesar disso, os resultados obtidos com esta lipase não foram muito diferentes dos observados com as demais lipases testadas. A preferência por álcoois de cadeia carbônica maior, a preferência pelo isoamilico e citronelol, bem como a pouca afinidade pelo ácido láurico se repetiram neste caso. As maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Candida rugosa* para cada um dos ácidos testados estão dispostas na figura 9j: acetato de isoamila, butirato de isoamila, propionato de isoamila e laurato de citronelila.

Lipase comercial de *Candida rugosa*

Metanol

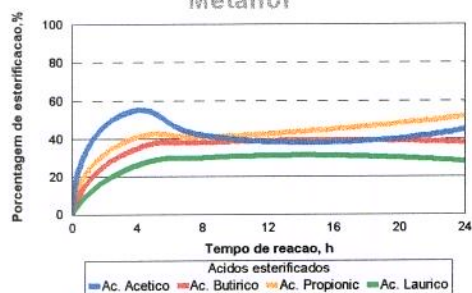


Fig. 9a - Síntese de esteres de metanol

Lipase comercial de *Candida rugosa*

Etanol

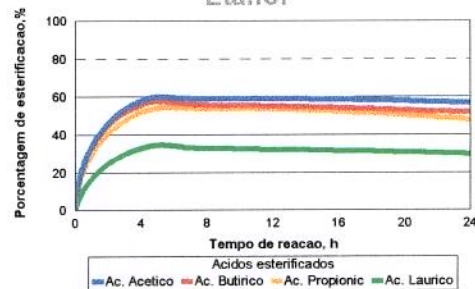


Fig. 9b - Síntese de esteres de etanol

Lipase comercial de *Candida rugosa*

Propanol

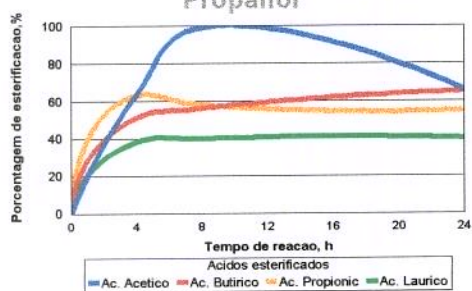


Fig. 9c - Síntese de esteres de propanol

Lipase comercial de *Candida rugosa*

Iso propanol

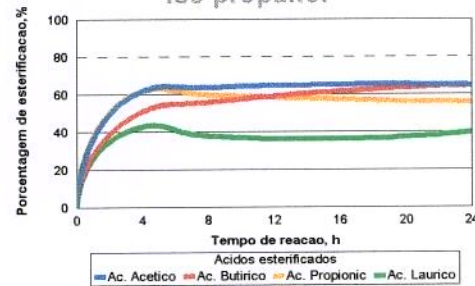


Fig. 9d - Síntese de esteres de iso propanol

Lipase comercial de *Candida rugosa*

Butanol

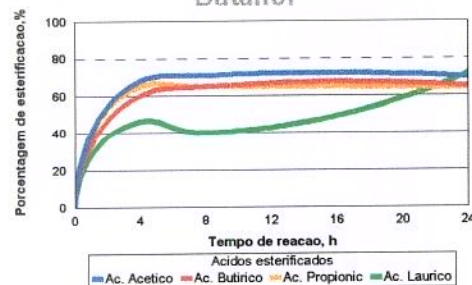


Fig. 9e - Síntese de esteres de butanol

Lipase comercial de *Candida rugosa*

Iso butanol

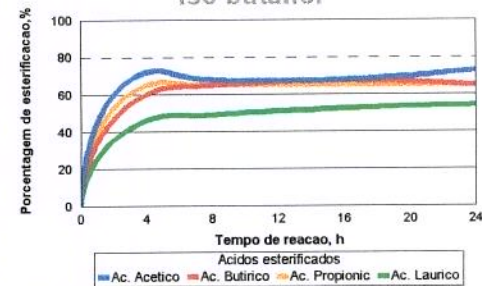


Fig. 9f - Síntese de esteres de iso butanol

Lipase comercial de *Candida rugosa*

Iso pentanol

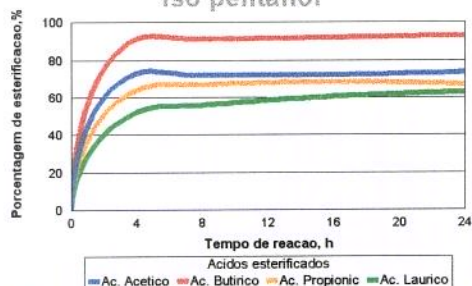


Fig. 9g - Síntese de ésteres de iso pentanol

Lipase comercial de *Candida rugosa*

Oleo Fusel

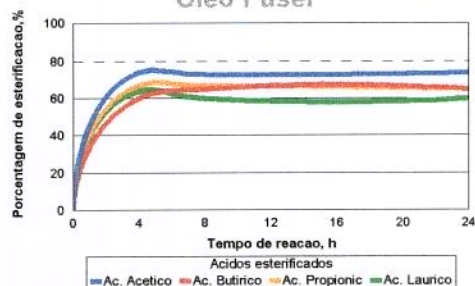


Fig. 9h - Síntese de ésteres de óleo fusel

Lipase comercial de *Candida rugosa*

Citronelol

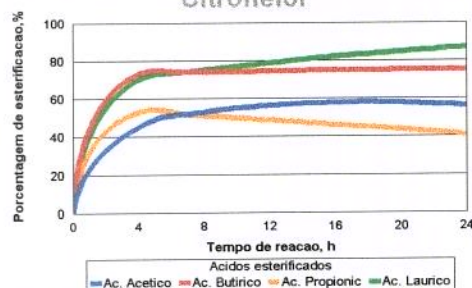


Fig. 9i - Síntese de ésteres de citronelol

Maiores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Candida rugosa*

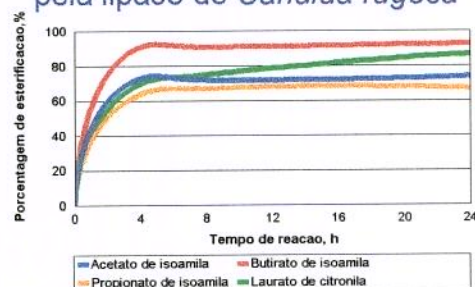


Fig. 9j - Síntese de ésteres pela lipase de *Candida rugosa*

As lipases testadas mostraram-se capazes de catalisar a síntese de ésteres de ácidos e álcoois nas condições testadas. De um modo geral pode-se observar que as lipases atuam melhor à medida que aumenta a cadeia carbônica dos álcoois; Não foram afetadas de uma forma isolada pelo álcool ou ácido mas pela presença do dois substratos em conjunto. Não houve diferença significativa nas sínteses obtidas para os isômeros iso ou n estudados. A afinidade pelos álcoois isoamílico e citrônolol foi constatada na maioria das lipases testadas. A diferenciação do comportamento da síntese na presença de citrônolol foi marcante em todas lipases testadas. As lipases testadas não apresentaram muita afinidade pelo ácido láurico, este fato pode ser em parte explicado pela dificuldade de dissolução do ácido láurico em alguns sistemas, na temperatura de estudo. No entanto, foi surpreendente a capacidade observada pela maioria das lipases em esterificar o ácido acético, substrato muito discutido na literatura por apresentar dificuldades nas reações de síntese. A lipase de *Rhizopus sp* não foi capaz de esterificar o ácido acético com o álcool citrônolol, apresentando no entanto as melhores taxas de conversão com o ácido láurico.

Grande parte da literatura disponível na área de síntese de ésteres de aroma do tipo dos testados neste trabalho, emprega solventes orgânicos no meio reacional. Contudo, alguns trabalhos testaram a síntese em meio com adição de água ou tampão ao sistema, denominando-o assim de aquoso. Como foi observado, o meio reacional proposto neste trabalho não utiliza solventes orgânicos ou água, propondo um modo mais simples e barato de obtenção dos ésteres. Portanto a necessidade de empregar-se lipases com grande estabilidade e atividade neste tipo de sistema fica evidente. A comparação dos dados obtidos nestes ensaios experimentais com os relatados da literatura se faz necessária apesar destas diferenças com relação ao meio reacional.

IWAI e col. 1980, não observou qualquer reação entre o ácido acético e geraniol com as lipases de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium*, em meio reacional sem adição de solvente orgânico e com adição de 1 mL de água. A lipase mais ativa nas sínteses foi a de *Aspergillus niger*, sintetizando bem ésteres mono, di e sesquiterpênicos, mas não catalisou a esterificação de álcoois secundários e terciários. A lipase de *G. candidum* não foi capaz de esterificar nenhum éster nas condições testadas. Já as lipases de *Rhizopus delemar* e *Penicillium cyclopium* só foram capazes de esterificar ésteres de ácido capríco.

GILLIES e col. 1987, examinaram a capacidade da lipase de *Candida cylindracea* de sintetizar os ésteres: laurato, butirato, octanoato, hexanoato, heptanoato e propionato de etila; acetato e butirato de isoamila além do acetato de isobutila. A lipase foi hidratada e agitada em n-heptano com os substratos para as reações. Obtiveram taxas de conversão de 24 e 25 % após 24 horas de reação para o

acetato de isobutila e isoamila respectivamente. Na conversão de laurato de etila, observou-se 52 % de síntese. As melhores taxas de conversão foram observadas na síntese de butirato de etila com 0.4 M de etanol e 0.5 M de ácido butírico, com 100% de conversão após 24 horas.

LANGRAND e col. 1988, testaram trinta preparações de lipases comerciais quanto à habilidade de catalisar a formação dos ésteres isoamil ou geranil acetato, propionato e butirato como compostos de aroma. As reações foram de esterificação direta ou éster solvólise em n-heptano. A formação de isoamil ou geranil butirato e propionato por esterificação direta foi catalisada pela maioria das lipases testadas. Ésteres de ácido acético mostraram-se mais difíceis de se obter. Encontraram 80 e 23 % de conversão na síntese de acetato de isoamila usando lipase de *Mucor miehei* e *Aspergillus* respectivamente. Na síntese de acetato de geranila o maior rendimento foi de 14 % alcançado pelas lipases de *Mucor miehei* e *P. cyclopium*.

TAKASHI e col. 1988, estudaram a síntese de ésteres com citronelol e ácido acético, propiônico, butírico e valérico em benzeno, catalisada pela lipase de *Pseudomonas fluorescens*. Os resultados obtidos após 8 horas de reação foram 18% para acetato de citronelila, 52% para butirato de citronelila, 74 % para valerato de citronelila.

WELSH e col. 1989, estudaram a conversão de óleo fúsel em seus ésteres acetato e butirato, empregando lipase de *Candida cylindracea*, em hexano. A produção máxima para os ésteres butíricos foi de 65,8 % e para os acéticos de 46,4 % após 48 horas de reação.

LANGRAND e col. 1990, reportaram a influência do tamanho da cadeia carbônica dos ácidos (C2 a C6) e dos álcoois (C2 a C6) bem como a influência da natureza do álcool em heptano. As maiores taxas de conversão observadas após 1 hora de reação foram obtidas com as lipases de *Mucor miehei* e *Rhizopus arrhizus* enquanto as lipases de *C. rugosa* e *Aspergillus* só obtiveram resultados significativos após 18 horas de reação.

Todas as lipases testadas sofreram a influência da presença do ácido acético com a maioria dos álcoois com exceção do metanol, quando não foi observada esterificação. As maiores taxas de conversão foram obtidas com as lipases de *Aspergillus* e *Candida rugosa*. Em contrapartida, as lipases de *R. arrhizus* e *Mucor miehei* mostraram-se mais ativas com ácidos de maior cadeia (C6 e C4-C6 respectivamente). Para a lipase de *Aspergillus*, as taxas de conversão decresceram com o aumento da cadeia carbônica do álcool. Para a lipase de *C. rugosa*, os ésteres de butil e isopentil mostraram os maiores índices de conversão. Com as lipases de *Mucor miehei* e *Rhizopus arrhizus* os álcoois terpênicos foram sintetizados em menores taxas do que os demais álcoois.

WELSH e col. 1990, realizaram estudos para testar a capacidade de 27 lipases comerciais diferentes para sintetizar ésteres de baixo peso molecular em sistemas aquosos. Dentre as lipases testadas, as de *Candida cylindracea*, *Pseudomonas fluorescens* e *Mucor miehei* se destacaram. A produção máxima obtida após 24 horas de reação foi com as concentração de 0,05 mol/L de substrato para isopentil acetato, 0,2 mol/L para etil butirato e 0,3 mol/L para isopentil butirato.

A taxa de conversão de butil butirato foi de quase 100% quando se trabalhou com concentrações maiores que 0,2 mol/L de ácido. Os autores observaram inibição da enzima de *Pseudomonas fluorescens* pelo substrato acima da concentração de 1 mol/L, mas o mesmo efeito não foi observado com as outras lipases.

Os solventes hexano, octano e decano foram utilizados no meio reacional, exceto para a síntese de etil butirato, onde somente o hexano foi empregado.

CARTA e col. 1992, testaram a lipase imobilizada de *Candida cylindracea* na esterificação direta de álcool isoamílico e etílico com os ácidos propiônico e butírico. A lipase imobilizada se mostrou efetiva na catálise dos ésteres etil propionato, isoamil propionato e isoamil butirato, em sistemas reacionais compostos por quantidades estequiométricas de substrato (0-2 M) em hexano.

Quando etanol em hexano foi o substrato, a conversão inicial de esterificação foi de 0,02 moles/h.g de proteína; mas a enzima foi estável somente quando a concentração dos substratos foi inferior a 0,2 M.

Quando o álcool isoamílico foi utilizado como substrato em hexano, as taxas de conversão foram da ordem de 0,085 moles/h.g e neste caso a enzima foi estável em concentrações muito maiores deste substrato.

Os autores observaram que, com a utilização do álcool isoamílico como substrato, o uso de solventes como o hexano não foi necessário para a esterificação e a enzima pode ser empregada em misturas com diferentes concentrações de ácido. Neste caso, com o ácido propiônico como substrato, a conversão aumentou gradualmente com a concentração de ácido até 1,5 M e diminuiu para concentrações maiores. As taxas de conversão máximas foram obtidas a 35°C diminuindo rapidamente com o aumento da temperatura para 40 e 60°C.

A comparação das taxas de esterificação obtidas para o propionato de isoamila foi realizada entre os sistemas reacionais com e sem hexano. Comparando os dados obtidos, os autores concluíram que as taxas de conversão foram essencialmente as mesmas nos dois sistemas. Contudo, variando a concentração de ácido propiônico no sistema sem hexano, as taxas de esterificação aumentaram com a concentração de ácido até 3 M, o que correspondia a 0,34 da fração molar do sistema. Assim, os autores concluem que as taxas de conversão obtidas em hexano são similares às obtidas sem hexano, com concentrações maiores de ácido. Por outro lado, a presença de excesso de álcool isoamílico pareceu ter efeito estabilizador na

lipase. Foi testado ainda o efeito da adição de água ao sistema sem hexano, concluindo que a presença de mais de 5% (v/v) de água dissolvida em álcool isoamílico não foi significativa nas condições de reação, isto é, não produziu efeitos nas taxas de conversão.

Quando se observam os dados obtidos pelas lipases testadas neste trabalho, verifica-se que houve confirmação da observação de Carta e col. 1992, sobre o efeito estabilizador que o álcool isoamílico parece exercer sobre as lipases nestes sistemas de síntese, dispensando outro solvente orgânico no meio reacional.

Ao verificar-se a habilidade das lipases em esterificar os substratos propostos, foi atingido um dos objetivos do trabalho. A escolha do (s) éster (es) de interesse bem como da (s) lipase (s) a ser (em) empregada (s), foi realizada levando em conta as observações feitas neste capítulo. Com a análise dos dados expostos na figura 10, observou-se que ésteres dos álcoois isoamílico e de citrônol foram esterificados na porcentagem média de 90 % pela maioria das lipases, nas condições testadas.

As vantagens do álcool isoamílico sobre o citrônol são, em primeiro lugar, a possibilidade de se conduzir a reação em meio livre da adição de mais um solvente orgânico, como o hexano e, em segundo lugar, o fato de ser um substrato natural de baixo custo por se tratar de um subproduto da indústria alcooleira nacional. Portanto, foi escolhido como substrato alcóolico o álcool isoamílico.

Os ácidos acético, propiônico e butírico foram escolhidos e descartado o ácido láurico por apresentar problemas de dissolução no sistema proposto e nas temperaturas empregadas.

As lipases selecionadas para comparação de suas performances foram a de *Rhizopus sp* e *Geotrichum sp*, em função dos bons resultados obtidos com as mesmas. Uma vez definidos nesta etapa preliminar os álcoois, os ácidos e as fontes de lipase mais promissoras na síntese dos ésteres acetato, butirato e propionato de isoamila, foi realizado um estudo de otimização baseado no planejamento experimental e análise da superfície de resposta para estabelecer as melhores condições de síntese.

Portanto, foi estudada a síntese dos ésteres dos ácidos acético, butírico e propiônico, com o álcool isopentanol (isoamílico) comparando o desempenho das lipases de *Geotrichum sp* e *Rhizopus sp* em sistema livre da adição de solvente orgânico.

Resumo das maiores taxas de conversão obtidas na seleção

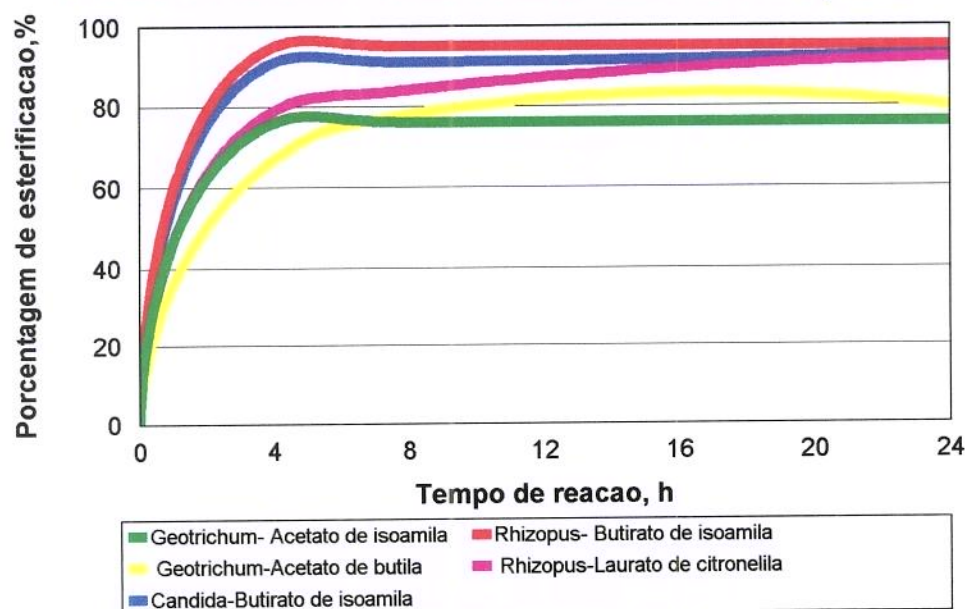


Fig. 10 - Maiores taxas de conversão obtidas na seleção

6.2. Obtenção de propionato de isoamila

Discutiremos neste capítulo os resultados obtidos na realização dos ensaios do planejamento experimental 1, descrito nas tabelas 7 e 8 para a síntese de propionato de isoamila.

Para melhor compreensão e análise dos resultados, o estudo foi dividido em ensaios realizados pela lipase de *Geotrichum sp* (1,2,3,4, 9,10,11 e 12) e ensaios realizados pela lipase de *Rhizopus sp* (5,6,7,8,13,14,15,e 16).

Como um dos objetivos do trabalho foi comparar a performance das duas lipases no planejamento experimental 1, e escolher a melhor para a continuação dos estudos, esta foi a metodologia de análise mais adequada.

Inicialmente compararemos as curvas da cinética enzimática obtidas pelas lipases de *Geotrichum sp* e *Rhizopus sp* ilustradas nas figuras 11 e 12.

O rendimento máximo obtido pela lipase de *Geotrichum sp* (fig.12) foi de 71,5 % no ensaio 11 seguido pelo ensaio 10 com 60,5% após 72 horas de reação. As condições experimentais em que foram realizados esses ensaios, foram as seguintes:

Ensaio	RM	Temperatura	Conc. Enz.
10	(4:1)	40 °C	10 %
11	(1:2)	60 °C	10 %

Pode-se verificar na tabela 11 que ao se variar a relação molar de (1:2) para (4:1) houve um decréscimo de até 19,2 % no rendimento da reação após 48 horas. Ao se variar a temperatura de 40 para 60 °C também ocorreu um decréscimo de até 4,9% após 6 horas de reação.

O aumento da concentração enzimática de 1 para 10% acarretou em um incremento de 23,85% após 72 horas de reação. Ainda analisando a tabela 11 verifica-se que só existem efeitos estatisticamente significativos após 72 horas de reação para as variáveis RM e Conc. Enz.. Todos os demais efeitos calculados para este processo não apresentaram efeitos estatisticamente significativos.

Pode-se concluir que a faixa de estudo das variáveis do processo não foi adequada para avaliar o real efeito das mesmas no processo quando é empregada a lipase de *Geotrichum sp* . Provavelmente, não foi possível pois, em alguns casos como a temperatura e concentração enzimática, já se havia atingido a região ótima de catálise pela lipase de *Geotrichum sp*. Além desta observação, cabe ressaltar que após 72 horas de reação a síntese ainda não atingiu equilíbrio pois os valores estão em curva ascendente na figura 11. Isso significa que não haveria como delinear outro planejamento experimental respeitando as condições pré estabelecidas para o processo. Pode-se dizer que, para este processo, com as condições assim definidas,

empregando a lipase de *Geotrichum sp*, que as condições ótimas observadas foram estabelecidas com a relação molar entre o álcool e o ácido de (1:2), com a temperatura de 60 °C, adição de 10 % de lipase em massa dos reagentes após 72 horas de reação.

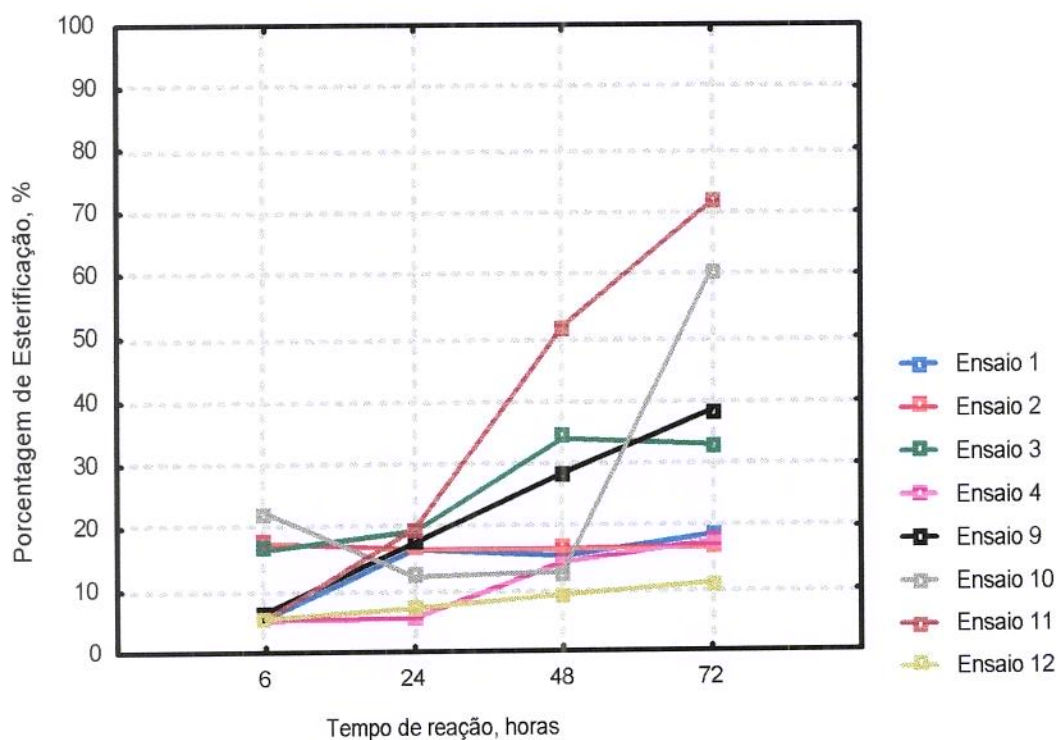


Figura 11 - Planejamento Exp. 1 para propionato de isoamila com *Geotrichum*

TABELA 11 : Resultados obtidos para o planejamento experimental 1 com a lipase de *Geotrichum sp* na síntese de propionato de isoamila.

Ensaio	Variáveis			% Esterificação			
	RM	Temper. °C	Conc. E %	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
1	- 1	- 1	- 1	5,5	16,5	15,4	18,7
2	+1	- 1	- 1	17,6	16,5	16,5	16,8
3	- 1	+1	- 1	16,5	19,4	34,1	33
4	+1	+1	- 1	5,2	5,5	14,3	17,6
9	- 1	- 1	+1	6,6	17,6	28,6	38,5
10	+1	- 1	+1	22,5	12,1	12,8	60,5
11	- 1	+1	+1	5,5	19,8	51,7	71,5
12	+1	+1	+1	5,5	7,1	9,1	11
central	0	0	0	3	0	0	8,7
central	0	0	0	0	0	0	3,9
central	0	0	0	0	0	0	0

TABELA 12: Efeitos calculados para o planejamento experimental 1 com a lipase de *Geotrichum sp* na síntese de propionato de isoamila.

Efeitos	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Media	10,6	14,31	22,81	33,45
1- RM	4,15	-8,02	-19,27	-13,95 *
2-Temperatura	-4,9	-2,72	8,97	-0,35
3- Concentrac. E	-1,15	-0,32	5,4	23,85 *

(* valores significativos estatisticamente)

Analisando a figura 12, que ilustra a cinética enzimática dos ensaios realizados com a lipase de *Rhizopus sp*, pode-se observar que o máximo rendimento obtido foi de 77 % e 78 % no ensaio 16 após 48 e 72 horas de reação respectivamente. No entanto, o perfil das curvas é muito diferente do obtido com a lipase de *Geotrichum sp*.

A lipase de *Rhizopus sp* atua mais rapidamente, de modo mais estável, atingindo após 48 horas valores muito semelhantes aos obtidos após 72 horas, indicando que a reação entra em equilíbrio após 48 horas. Portanto, a lipase de *Geotrichum sp* possui produtividade inferior, uma vez que só começa a apresentar taxas significativas de conversão após 72 horas de reação, como pode ser observado, após 48 horas a lipase de *Geotrichum sp* atingiu um máximo de 35 % de conversão contra 57,5 % da lipase de *Rhizopus sp*.

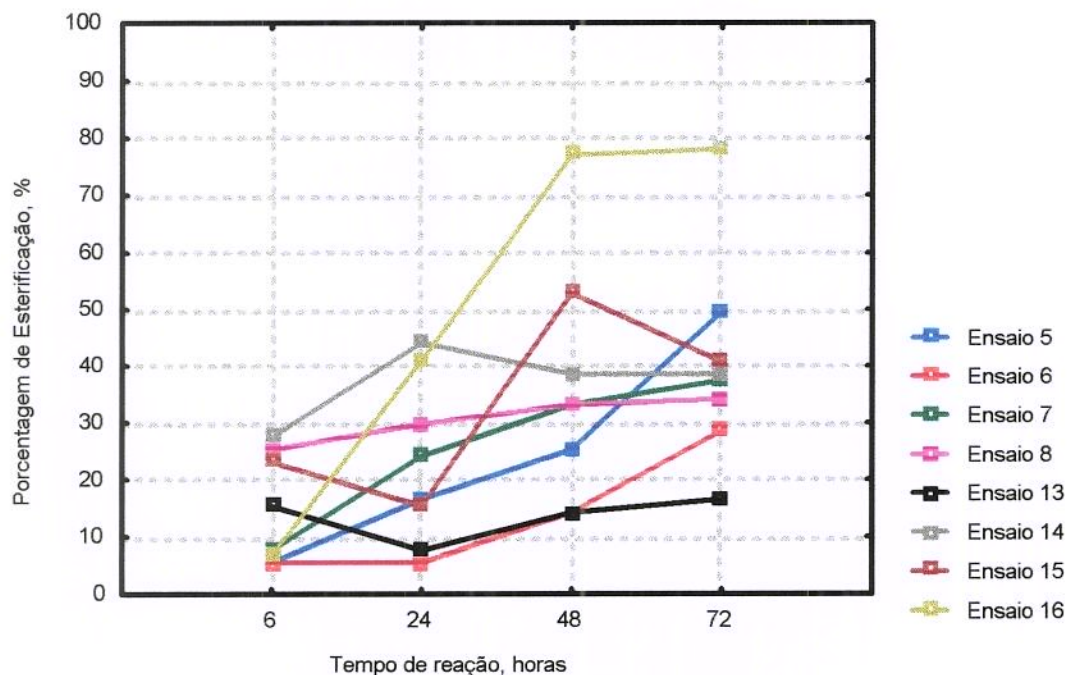


Figura 12- Planejamento Exp. 1 para propionato de isoamila com *Rhizopus*

Analisando as tabelas 13 e 14 a seguir, observa-se que todos os efeitos calculados para os resultados obtidos para a síntese de propionato de isoamila com a lipase de *Rhizopus sp* apresentaram significância estatística após 24 horas de reação.

Este comportamento difere do apresentado por essa lipase na síntese dos ésteres acetato e propionato de isoamila, onde a variável temperatura nunca foi um fator muito importante no rendimento das reações. Como veremos mais adiante.

A variação da relação molar entre os substratos de 1:2 para 4:1 causou um incremento de até 14,1 % no rendimento após 24 horas de reação. A temperatura, quando aumentou de 40 para 60 °C causou um aumento no rendimento de até 26 % após 48 horas. O aumento da concentração enzimática também aumentou 19,25 % o rendimento ao passar de 1% para 10%.

TABELA 13: Resultados obtidos para o planejamento experimental 1 com a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de propionato de isoamila.

Ensaio	Variáveis			% Esterificação			
	RM	Temper. °C	Conc. E %	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
5	- 1	- 1	- 1	5,5	16,5	25,3	49,5
6	+1	- 1	- 1	5,5	5,5	14,3	28,6
7	- 1	+1	- 1	7,7	24,2	33	37,4
8	+1	+1	- 1	25,3	29,7	33	34,1
13	- 1	- 1	+1	15,4	7,7	14,3	16,5
14	+1	- 1	+1	27,5	44	38,5	38,5
15	- 1	+1	+1	23,1	15,4	52,8	40,7
16	+1	+1	+1	6,8	41	77	78,1
central	0	0	0	0	3,1	36,56	60
central	0	0	0	0	0	33,22	57,7
central	0	0	0	0	0	29,88	55,6

TABELA 14: Efeitos calculados para o planejamento experimental 1 com a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de propionato de isoamila.

Efeitos	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Media	14,6	23	36,02	40,42
1- RM	3,35	14,1*	9,3*	8,8*
2-Temperatura	2,25	9,15*	25,8*	14,3*
3- Concentrac. E	7,2	8,05*	19,2*	6,05

(* valores significativos estatisticamente)

A lipase de *Rhizopus sp* catalisou mais rapidamente a síntese de propionato de isoamila do que a lipase de *Geotrichum sp*.

Os objetivos deste delineamento experimental inicial foram comparar a capacidade das lipases de *Rhizopus sp* e *Geotrichum sp* na síntese de propionato de isoamila e também avaliar a verdadeira importância das variáveis estudadas no processo.

Quanto ao primeiro objetivo, pode-se concluir inicialmente, que a lipase de *Geotrichum sp* é mais lenta na síntese do que a lipase de *Rhizopus sp*, no entanto as duas atingem rendimentos finais muito semelhantes. Portanto, a lipase de *Rhizopus sp* possui maior produtividade neste processo.

Com relação ao segundo objetivo, não foi possível observar com os resultados obtidos para a síntese de propionato de isoamila, empregando a lipase de *Geotrichum sp*, o verdadeiro peso das variáveis no processo.

Para o processo de síntese de propionato de isoamila empregando a lipase de *Rhizopus sp.*, foi possível constatar que todas as variáveis estudadas são significativas no processo.

Prosseguindo no objetivo inicial de otimizar a síntese de propionato de isoamila empregando o processo ora proposto, o próximo passo foi realizar um novo delineamento experimental com a lipase de *Rhizopus sp.*

Foi realizado um segundo delineamento experimental do tipo 2^3 + pontos axiais (estrela) para modelo de segunda ordem se necessário e pontos centrais para determinação do erro puro. O estudo foi delineado em cinco níveis distintos, deslocados no sentido de tentar encontrar uma região de máximo rendimento. Para a variável relação molar, a preferência da lipase de *Rhizopus sp.* na síntese de propionato de isoamila foi no sentido da (4:1), descartou-se portanto pontos muito próximos da (1:2), restringindo o intervalo de variação dentro da faixa de melhor atividade da enzima, estabelecida pelo primeiro planejamento experimental. A variável concentração enzimática foi estudada dentro dos limites de 1 % para o menor nível e 10 % para o maior, respeitando as limitações operacionais já mencionadas anteriormente. E a variável temperatura foi estudada dentro dos limites de 40 a 60 °C também respeitando as limitações neste caso, da enzima.

Os níveis de estudo das variáveis bem como o planejamento experimental completo estão dispostos a seguir.

O nível estrela, foi calculado segundo a fórmula $(2^{-3})^{1/4} = 1,68$, em valor codificado. (BOX e col., 1978)

TABELA 15 - Variáveis e níveis para o delineamento experimental 2^3 + estrela + ponto central para síntese do propionato de isoamila

Variável	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
RM	(1,59:1)	(2,16:1)	(3:1)	(3,8:1)	(4,41:1)
Temperatura	40	44	50	56	60
Conc. Enz.	1	2,82	5,5	8,1	10

RM = (álcool: ácido)

Temperatura : °C

Conc. Enzimática : % em massa dos reagentes

TABELA 16 - Delineamento experimental 2^3 + estrela + ponto central para síntese do propionato de isoamila em valores codificados.

Ensaio	Rel. Molar	Temperatura, °C	Conc. Enzima (%)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	+1,68	0	0
10	-1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

TABELA 17- Delineamento experimental 2^3 + estrela + ponto central para síntese do propionato de isoamila em valores reais.

Ensaio	Rel. Molar	Temperatura, °C	Conc. Enzima (%)
1	(2,16:1)	44	2,82
2	(3,8:1)	44	2,82
3	(2,16:1)	56	2,82
4	(3,8:1)	56	2,82
5	(2,16:1)	44	8,1
6	(3,8:1)	44	8,1
7	(2,16:1)	56	8,1
8	(3,8:1)	56	8,1
9	(4,41:1)	50	5,5
10	(1,59:1)	50	5,5
11	(3:1)	60	5,5
12	(3:1)	40	5,5
13	(3:1)	50	10
14	(3:1)	50	1
15	(3:1)	50	5,5
16	(3:1)	50	5,5
17	(3:1)	50	5,5

Foram retiradas alíquotas do meio de reação após 6, 24, 48 e 72 horas.

Os resultados obtidos na realização dos ensaios do planejamento experimental 2 estão ilustrados a seguir.

A figura 13 traz a cinética obtida na realização dos ensaios. É possível observar que os melhores rendimentos obtidos ocorreram nos ensaios 12,14,15,16 e 17 com 76, 85 e 75 % de conversão respectivamente. Os ensaios 15 a 17 são os pontos centrais. Já os ensaios 12 e 14 são os pontos estrela para a temperatura e concentração enzimática. Isso significa que trabalhando na faixa operacional entre -1 e 1, estaremos na faixa máxima de rendimento.

Também neste caso os rendimentos observados após 48 horas de reação indicam que a reação neste ponto já atingiu o equilíbrio, pois os valores são semelhantes aos obtidos após 72 horas. Devemos portanto, trabalhar na faixa de 48 horas de reação, onde se obtém maior produtividade, beneficiando economicamente o processo.

Ao analisarmos as condições experimentais dos melhores ensaios, a constatação de que o melhor ensaio observado tenha sido o 14 ocorre porque foi com ele atingido o maior rendimento.

Ensaio	RM	Temperatura	Conc. Enzimática
12	3:1	60	5,5 %
14	3:1	50	10 %
15	3:1	50	5,5 %
16	3:1	50	5,5 %
17	3:1	50	5,5 %

No entanto, foi o ensaio onde se empregou maior quantidade de enzima. Outra observação importante é que parece não haver dúvida quanto à melhor relação molar para a síntese de propionato de isoamila pela lipase de *Rhizopus sp* (3:1); nem tão pouco quanto à temperatura de 50°C.

Economicamente portanto, a condição do ensaio 14 é menos atraente e sem dúvida a condição central pode ser melhor pois emprega-se menos enzima.

Em termos de produtividade, a condição central também parece interessante, pois com 75 % de rendimento após 48 horas de reação, obtém-se cerca de 600 g de éster por litro de meio, ou ainda, 12,25 g / L por hora, contra 680 g de éster por litro de meio após 48 horas de reação na condição do ensaio 15 (ou 14,16 g / L por hora). Em contrapartida, em relação ao gasto de lipase, a condição 14 produz 0,11 moles de propionato de isoamila por hora de reação por grama de lipase contra 0,18 moles de éster por hora por grama de lipase utilizada.

LANGRAND e col. em 1988, testaram a síntese de propionato de isoamila com aproximadamente 30 lipases comerciais por esterificação direta. As reações foram realizadas com 0,25 M de isoamílico e 0,5 M de ácido, 0,1 % de água e 0,5

gramas de lipase em 10 mL de n-heptano. Os resultados obtidos com a lipase de *Geotrichum candidum* foram de 2 % de rendimento após 24 horas e de 95 % de rendimento com a lipase de *C. rugosa*.

CARTA e col. 1992, testaram a lipase imobilizada de *Candida cylindracea* na esterificação direta de álcool isoamílico com os ácidos propiônico e butírico. A lipase imobilizada se mostrou efetiva na catálise dos ésteres, isoamil propionato e isoamil butirato, em sistemas reacionais compostos por quantidades estequiométricas de substrato (de 0 a 2 M) em hexano.

Quando o álcool isoamílico foi utilizado como substrato em hexano, as taxas de conversão foram da ordem de 0,085 moles / h. g e neste caso a enzima foi estável em concentrações muito maiores deste substrato.

Os autores observaram que com a utilização do álcool isoamílico como substrato, o uso de solventes, como o hexano, não foi necessário para a esterificação e a enzima pode ser empregada em misturas com diferentes concentrações de ácido. Neste caso, com o ácido propiônico como substrato, a conversão aumentou gradualmente com a concentração de ácido até 1,5 M e diminuiu para concentrações maiores. As taxas de conversão máximas foram obtidas a 35°C diminuindo rapidamente com o aumento da temperatura para 40 e 60°C.

A comparação das taxas de esterificação obtidas para o propionato de isoamila foi realizada entre os sistemas reacionais com e sem hexano. Comparando os dados obtidos, os autores concluíram que as taxas de conversão foram essencialmente as mesmas nos dois sistemas. Contudo, variando a concentração de ácido propiônico no sistema sem hexano as taxas de esterificação aumentaram com a concentração de ácido até 3 M o que correspondia a 0,34 da fração molar do sistema. Assim, os autores concluem que as taxas de conversão obtidas em hexano são similares às obtidas sem hexano, com concentrações maiores de ácido. Por outro lado, a presença de excesso de álcool isoamílico pareceu ter efeito estabilizador na lipase. Foi testado ainda o efeito da adição de água ao sistema sem hexano, concluindo que a presença de mais de 5% (v/v) de água dissolvida em álcool isoamílico não foi significativa nas condições de reação.

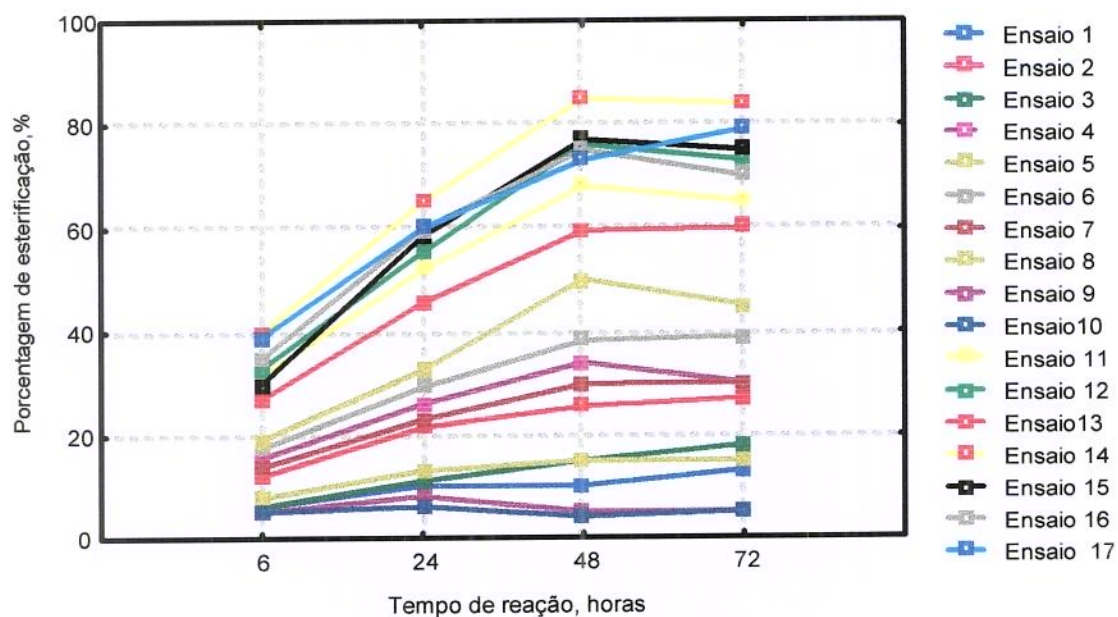


Figura 13- Planejamento Exp. 2 para o propionato de isoamila

As tabelas 18 e 19 ilustram os resultados e efeitos estatísticos calculados para os experimentos realizados.

TABELA 18: Resultados obtidos para o planejamento experimental 2 com a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de propionato de isoamila

Ensaio	Variáveis			% Esterificação				Produtividade g éster /g lipase 48 horas
	RM	Temp. °C	Conc. Enz. (%)	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas	
1	-1	-1	-1	6	10	10	13	3,9
2	1	-1	-1	12	21,5	25,5	27	9,68
3	-1	1	-1	6	11	15	18	5,9
4	1	1	-1	15,6	26	34	30	13,2
5	-1	-1	1	7,8	13	15	15	1,5
6	1	-1	1	17,6	29,3	38,2	39	3,8
7	-1	1	1	13,8	23	29,8	30	2,9
8	1	1	1	19,2	32,5	50	45	5
9	+1,68	0	0	5	5	5	15	0,8
10	-1,68	0	0	5	5	4	15	0,6
11	0	-1,68	0	31,6	52	68	65	11
12	0	+1,68	0	33	55,3	76	73	12,2
13	0	0	-1,68	27	45,5	59,5	60	55,5
14	0	0	1,68	40	65	85	84	7,5
15	0	0	0	30	58,5	77	75	12,4
16	0	0	0	35	59,7	75	70	11,9
17	0	0	0	39	60	73	79	11,7

TABELA 19 : Efeitos calculados para o planejamento experimental 2 com a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de propionato de isoamila

Efeitos	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Media	18,36	31,3	40,2	40,09
1- RM	7,7	13,07*	19,4*	16,25*
2- Temperatura	2,8	4,67*	10,02*	7,25
3- Concentrac. E	4,7	7,3*	15,12*	10,25

(* valores significativos estatisticamente)

Propionato de isoamila
48 horas de reação

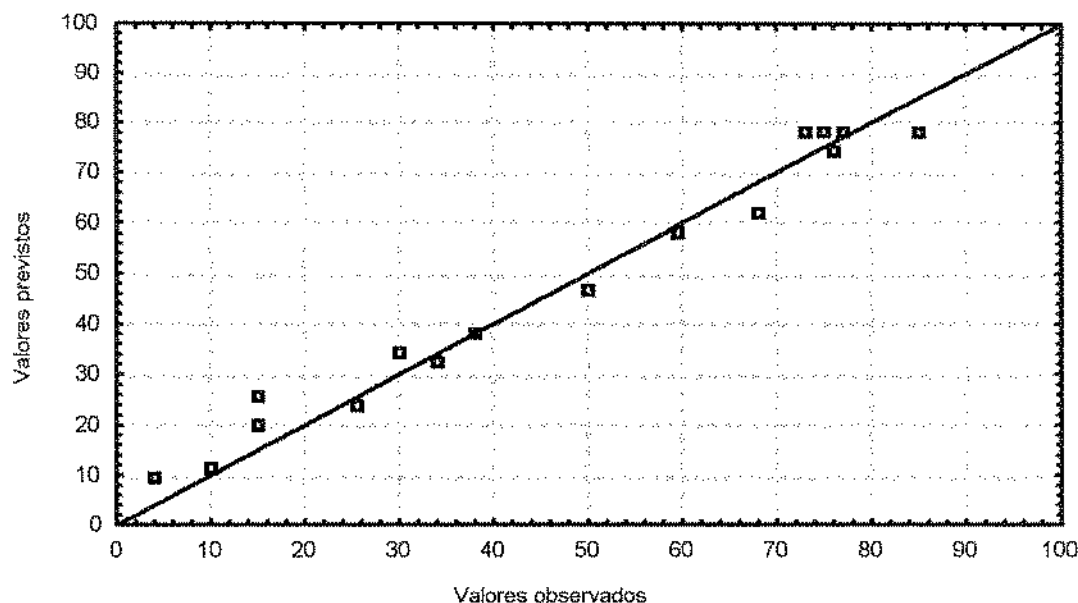


Figura 14 - Valores observados vs. Valores previstos

TABELA 20 - Análise de variância - Propionato de isoamila

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	Distribuição F (5%)
Regressão	12409,2	6	2068,2	30,78	3,68
Resíduos	671,8	10	67,18		
Falta de ajuste	663,8	8	82,97		
Erro puro	8	2	4		
Total	13081,02				
Porcentual de Variância Explicada = 94%					
Porcentual máximo de Variância Explicável = 99 %					

A modelagem para o ajuste de um polinômio de grau 2 que descreva o processo em estudo foi realizada através do programa estatística versão 5.0 (STASOFT, 1995), obtendo-se a Equação (1) que relaciona a porcentagem de esterificação com as variáveis adimensionais RM (x_1), Temperatura (x_2) e Concentração enzimática (x_3).

$$\% \text{ Esterificação} = 77,71 + 6,38 (\text{RM}) + 4,29 (\text{Temperatura}) + 7,05 (\text{Conc. Enz.}) - 38,85 (\text{RM})^2 - 4,9 (\text{Temperatura})^2 - 4,77 (\text{Conc. Enz.})^2.$$

O valor do Teste F calculado foi comparado ao valor tabelado para a Distribuição F (5 %), com os respectivos graus de liberdade (Bruns e col., 1995). Verificou-se que $F(\text{regressão/resíduos}) = 30,78$ é maior que o $F_{9,7} = 3,68$ cerca de

8,3 vezes, indicando que a regressão é significativa e preditiva ao nível de 95 % de confiança. Através da observação da figura 14 percebe-se que o desvio dos valores experimentais obtidos com relação aos previstos é muito pequeno, pouco significativo, e que os valores observados estão bem distribuídos pela reta indicando que o planejamento foi bem realizado, cobrindo a faixa de estudo satisfatoriamente.

Observando as figuras 15, 16 e 17 que ilustram a superfície de resposta, pode-se perceber com facilidade que o processo de síntese de propionato de isoamila foi otimizado.

A figura 15 apresenta os efeitos das variáveis RM e Concentração enzimática na porcentagem de esterificação sendo a temperatura mantida na condição de 50 °C. As condições onde ocorrem os maiores rendimentos estão muito próximas à RM (3:1) possuindo um intervalo muito pequeno de variação. Observando o gráfico, no eixo da concentração enzimática, na área vermelha da superfície de resposta, pode-se verificar que na faixa acima de 1% a região ótima está presente, não apresentando queda até mesmo na região de 10 % de enzima. Isso significa que se fosse possível operar (ou desejável economicamente) com concentrações superiores a 10 %, ainda estaríamos provavelmente aumentando os rendimentos obtidos.

A figura 16 apresenta o efeito das variáveis RM e Temperatura na porcentagem de esterificação tendo sido mantida constante a concentração enzimática em 5,5 %. As condições onde ocorrem os maiores rendimentos estão muito próximas do ponto central de (3:1) para a relação molar. Observando o eixo da temperatura, na área vermelha da superfície de resposta, pode-se verificar que em toda a faixa estudada de temperatura estão localizados os rendimentos máximos. Isso porque a faixa em que foi estudada a variável temperatura é justamente a faixa de atividade máxima da lipase de *Rhizopus sp*, como já foi comentado no início do trabalho.

A figura 17 apresenta o efeito das variáveis Concentração enzimática e Temperatura na porcentagem de esterificação. A RM foi mantida em (3:1). As condições onde ocorrem os maiores rendimentos são mais extensas, podendo se trabalhar entre as temperaturas de 45 a 57 °C aproximadamente, e com concentração enzimática entre 5 e 8,7%. Estas são as variáveis mais flexíveis do processo. Deve-se sempre atentar para a estreita faixa de variação ótima da RM.

As condições ótimas para a síntese de propionato de isoamila pela lipase de *Rhizopus sp* foram estabelecidas empregando a relação molar entre o álcool isoamílico e o ácido propiônico de (3 :1), com concentração enzimática em massa dos reagentes de 5,5 % o que equivale a 1913 Unidades de Atividade. A temperatura de reação foi de 50 °C, e o tempo de 48 horas. O rendimento obtido foi de 75 %. A produtividade de 12,25 gramas de éster por litro de meio por hora de

reação ou, 600 gramas de éster por litro de meio após 48 horas de reação ou ainda, 0,18 moles de acetato de isoamila por hora por grama de lipase.

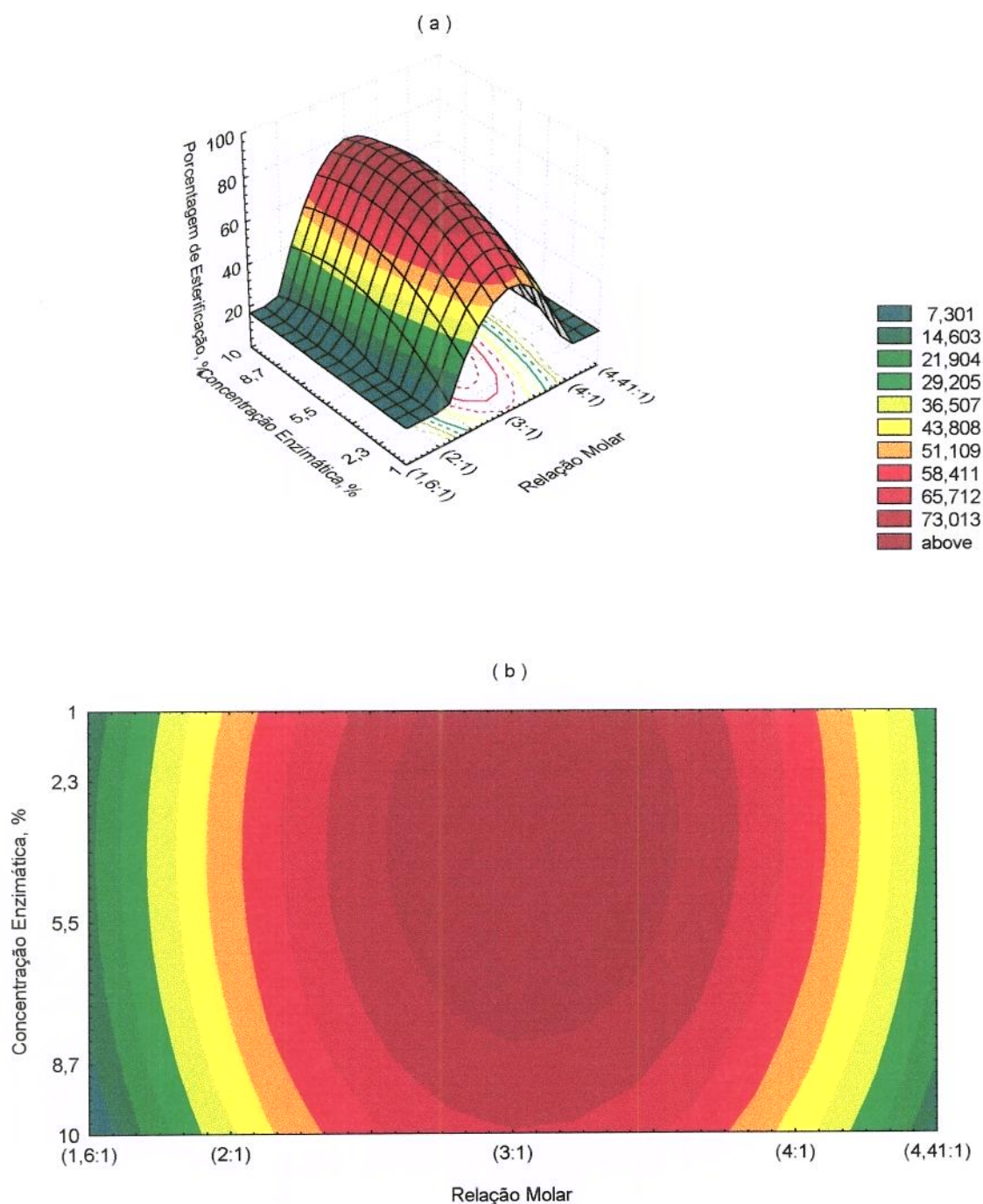


Figura 15 - Efeito da relação molar e concentração enzimática na porcentagem de esterificação de propionato de isoamila após 48 horas de reação a temperatura de 50°C.

(a) Superfície de Resposta; (b) Curvas de contorno

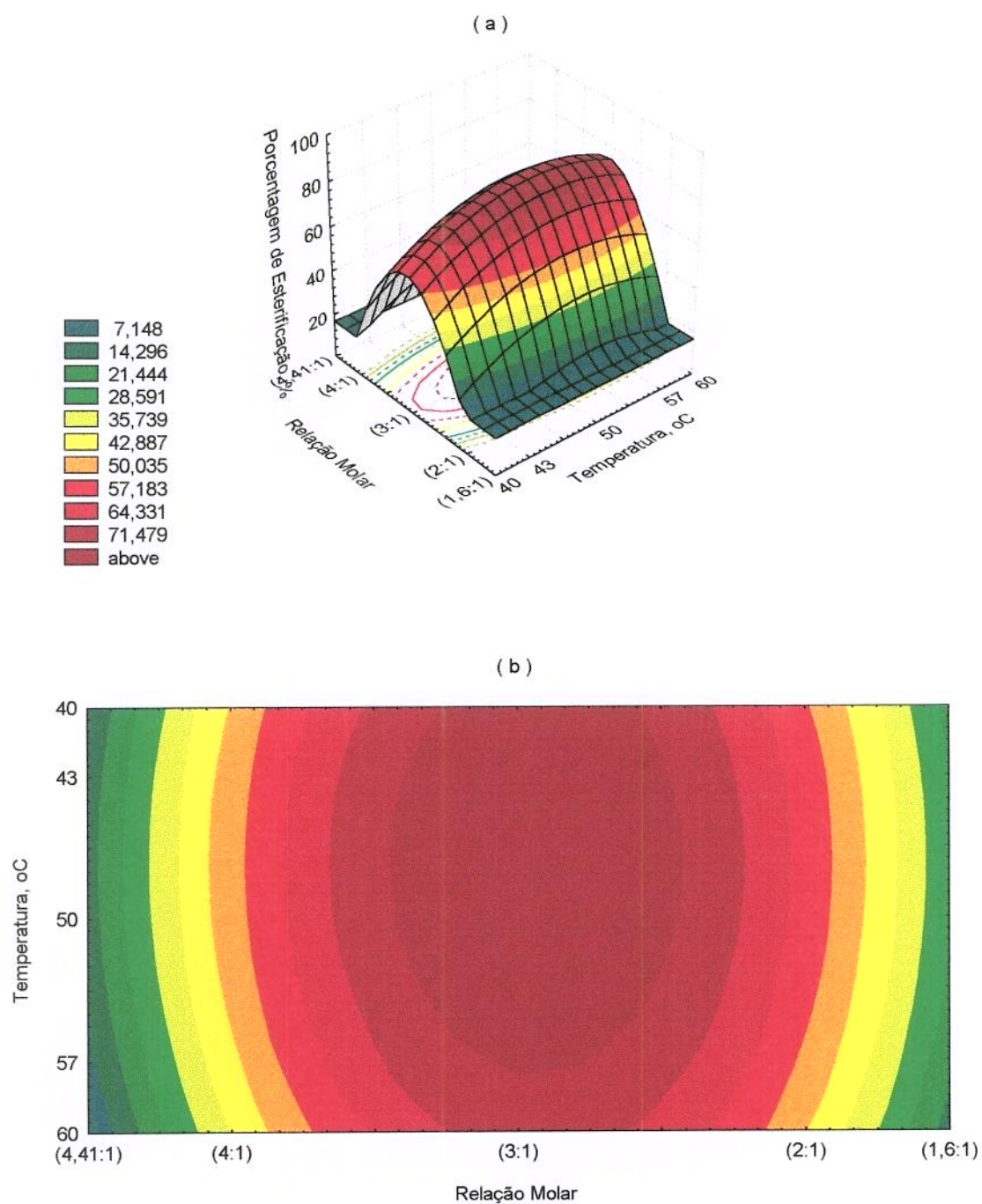


Figura 16 - Efeito da temperatura e relação molar na porcentagem de esterificação de propionato de isoamila após 48 horas de reação com 5,5 % de lipase.

(a) Superfície de Resposta; (b) Curvas de contorno

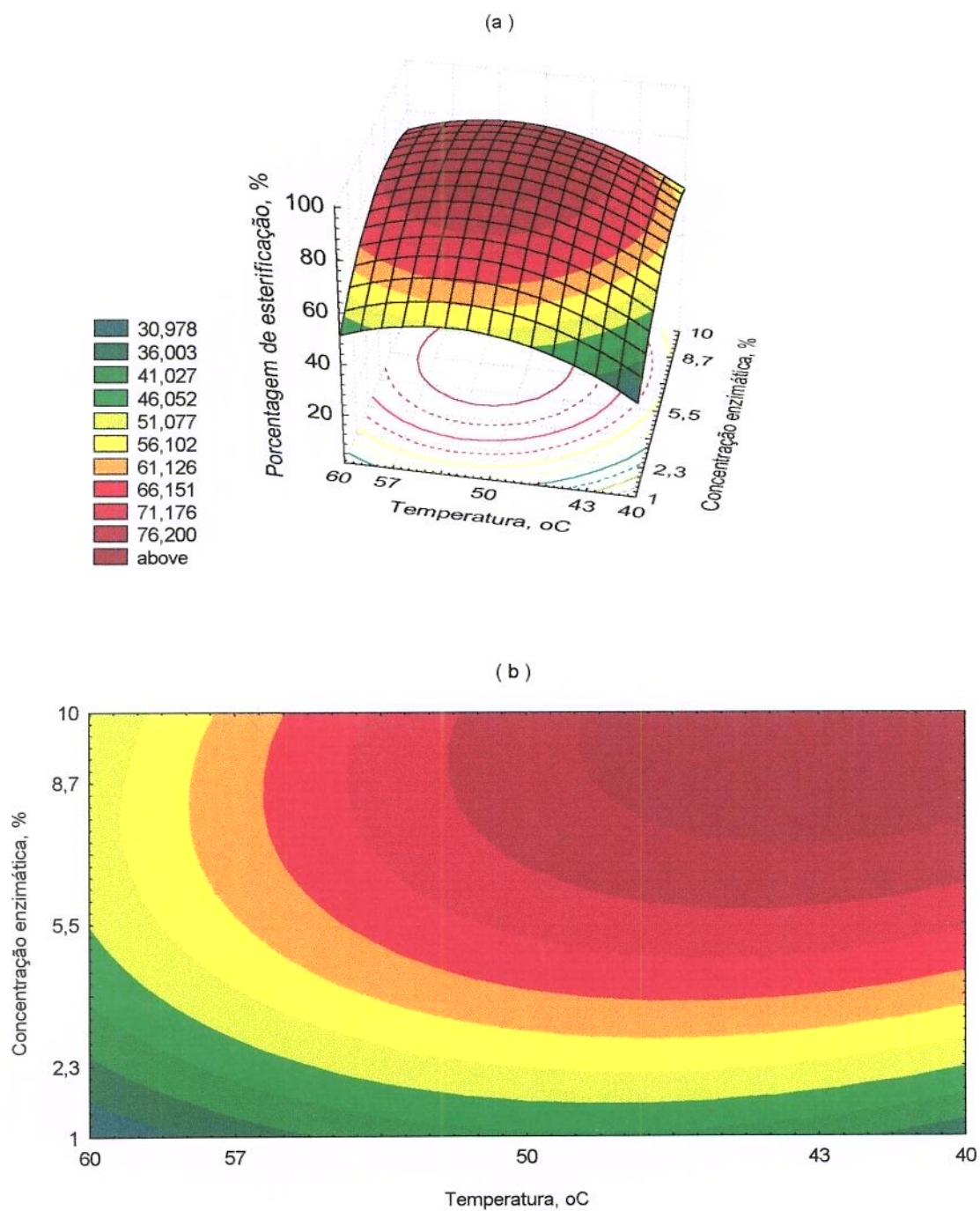


Figura 17 - Efeito da concentração enzimática e temperatura na porcentagem de esterificação de propionato de isoamila após 48 horas de reação, RM (3:1).

(a) Superfície de Resposta; (b) Curvas de contorno

6.3. Obtenção de butirato de isoamila

Os resultados obtidos na realização experimental dos ensaios do planejamento experimental 1, descrito nas tabelas 7 e 8 para a síntese de butirato de isoamila serão discutidos neste capítulo.

Para melhor compreensão e análise dos resultados, o estudo foi dividido em ensaios realizados pela lipase de *Geotrichum sp* (1,2,3,4, 9,10,11 e 12) e ensaios realizados pela lipase de *Rhizopus sp* (5,6,7,8,13,14,15,e 16).

Comparar a performance das duas lipases nos ensaios do planejamento experimental 1, e escolher a melhor para a continuação dos estudos, foi a metodologia de análise dos dados adotada.

Inicialmente compararemos as curvas da cinética enzimática obtidas pelas lipases de *Geotrichum sp* e *Rhizopus sp* ilustradas nas figuras 18 e 19.

O rendimento máximo obtido pela lipase de *Geotrichum sp* (fig.18) na síntese de butirato de isoamila foi de 68,5 % após 72 horas de reação no ensaio de número 11, seguido pelos ensaios 9 e 10 com 53 % de rendimento após 72 horas de reação. As condições experimentais em que foram realizados esses ensaios, foram as seguintes:

Ensaio	RM	Temperatura	Conc. Enz.
9	(1:2)	40 °C	10 %
10	(4:1)	40 °C	10 %
11	(1:2)	60 °C	10 %

Analisando as tabelas 21 e 22 pode-se verificar que mais uma vez, de acordo com o comportamento dessa lipase na síntese de acetato de isoamila, nenhuma variável do processo mostrou-se estatisticamente significativa dentro da faixa estudada.

Pode-se verificar ainda nestas tabelas que a variação da relação molar entre os substratos de 1:2 para 4:1 acarretou em um decréscimo de até 16,3 % no rendimento após 72 horas. A análise dos efeitos provocados pela temperatura, mostra que a mudança de 40 para 60 °C provocou um decréscimo de apenas 2,7 % ao rendimento provando ser realmente pouco significativa no processo. O aumento da concentração enzimática de 1 para 10 % provocou um incremento de 26,8 % no rendimento após 72 horas de reação.

Portanto, pode-se concluir que, nas condições estudadas nenhum efeito de primeira ordem foi significativo estatisticamente. Isso significa que dentro das faixas de estudo estabelecidas para esta lipase, não foi possível perceber o efeito das variáveis no processo. Provavelmente porque já se estabeleceu uma faixa de estudo muito próxima do ideal ou ainda porque não houve tempo suficiente de reação para

avaliar os efeitos das variáveis. No entanto, não há como delinear outro planejamento experimental respeitando as condições pré estabelecidas para o processo em questão. Comportamento semelhante foi observado com o processo de síntese de propionato de isoamila pela lipase de *Geotrichum sp.*

Pode-se dizer que, para a síntese de butirato de isoamila empregando a lipase de *Geotrichum sp.*, as condições ótimas de reação foram obtidas com a relação molar entre o álcool e o ácido de (1:2), com a temperatura de reação a 40 °C (por ser a mais econômica), adicionando 10 % de lipase em massa dos reagentes após 72 horas de reação.

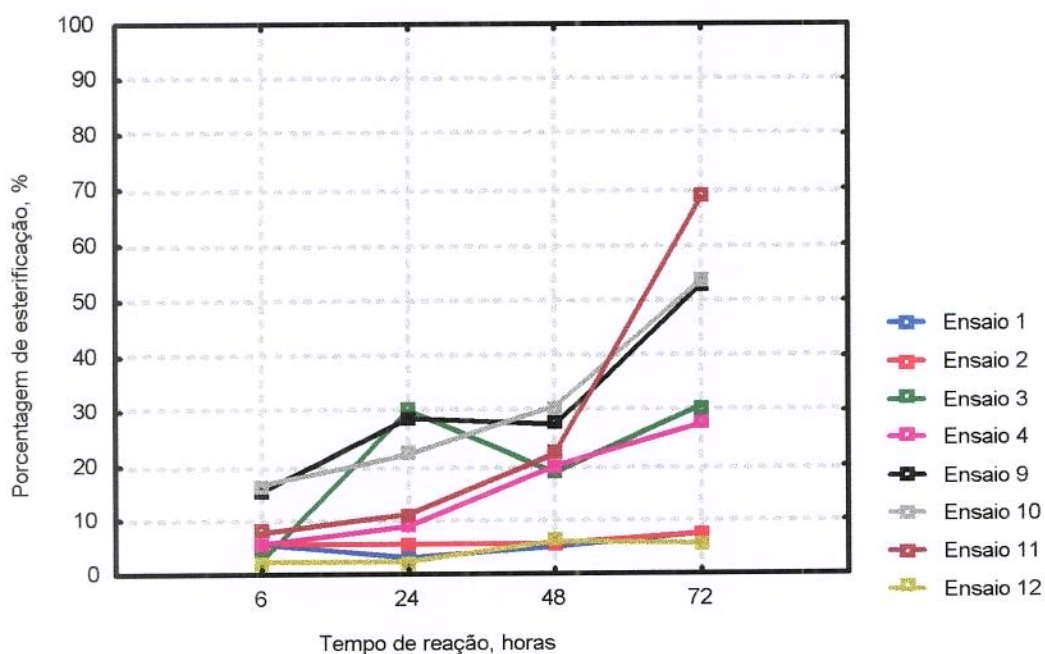


figura 18- Planejamento Exp. 1 para butirato de isoamila com *Geotrichum sp*

TABELA 21 : Resultados obtidos para o planejamento experimental 1 com a lipase de *Geotrichum sp* na síntese de butirato de isoamila

Ensaio	Variáveis			% Esterificação			
	RM	Temper. °C	Conc. E %	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
1	- 1	- 1	- 1	5,5	3	5	7,4
2	+1	- 1	- 1	5,5	5,5	5,5	7,4
3	- 1	+1	- 1	2,6	30,2	18,7	30,8
4	+1	+1	- 1	5,5	8,8	19,8	27,5
9	- 1	- 1	+1	15,4	28,6	27,5	52,8
10	+1	- 1	+1	16,5	22	30,8	53,6
11	- 1	+1	+1	7,7	11	22	68,5
12	+1	+1	+1	2,2	2,2	6	5,5
central	0	0	0	38	9	0	0
central	0	0	0	32	4,4	0	0
central	0	0	0	25	0	0	0

TABELA 22: Efeitos calculados para o planejamento experimental 1 para lipase de *Geotrichum sp* na síntese de butirato de isoamila.

Efeitos	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Media	7,6	13,91	16,91	31,68
1- RM	-0,37	-8,57	-2,77	-16,37
2- Temperatura	-6,22	-1,72	-0,57	2,77
3- Concentrac. E	5,67	4,07	9,32	26,82

Na figura 18 podem ser observadas as curvas da cinética dos ensaios realizados com a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de butirato de isoamila. Os maiores rendimentos obtidos pela lipase de *Rhizopus sp* foram de 66 % e 90 % no ensaio 15, após 48 e 72 horas respectivamente. No ensaio 13 o rendimento foi de 76 % após 48 horas de reação.

Como observado na síntese de propionato de isoamila, o perfil das curvas de cinética de reação com *Geotrichum sp* é muito diferente do perfil das curvas obtidas com a lipase de *Rhizopus sp*. A lipase de *Geotrichum sp* é mais lenta na catálise do butirato de isoamila, atingindo valores acima de 30 % de rendimento somente após 72 horas de reação. A reação de síntese neste ponto não parece próxima da estabilidade, indicando que o tempo de reação para maiores rendimentos talvez sejam ainda maiores. A lipase de *Rhizopus sp* possibilita melhor rendimento em menor tempo, aumentando a produtividade do processo.

Observando as tabelas 23 e 24 verifica-se rapidamente que ao contrário do observado na síntese de propionato de isoamila, a variação da temperatura não foi

significativa estatisticamente no processo, dentro da faixa de estudo. Pode portanto se tornar uma variável fixa em estudos posteriores. A relação molar entre os substratos provou ser novamente importante no processo pois sua variação de 1:2 para 4:1 diminuiu em até 18,45 % o rendimento após 48 horas de reação. A concentração enzimática mostrou ser uma variável também importante no processo provocando um aumento significativo de 32,2 % no rendimento após 72 horas quando variou de 1 para 10 %.

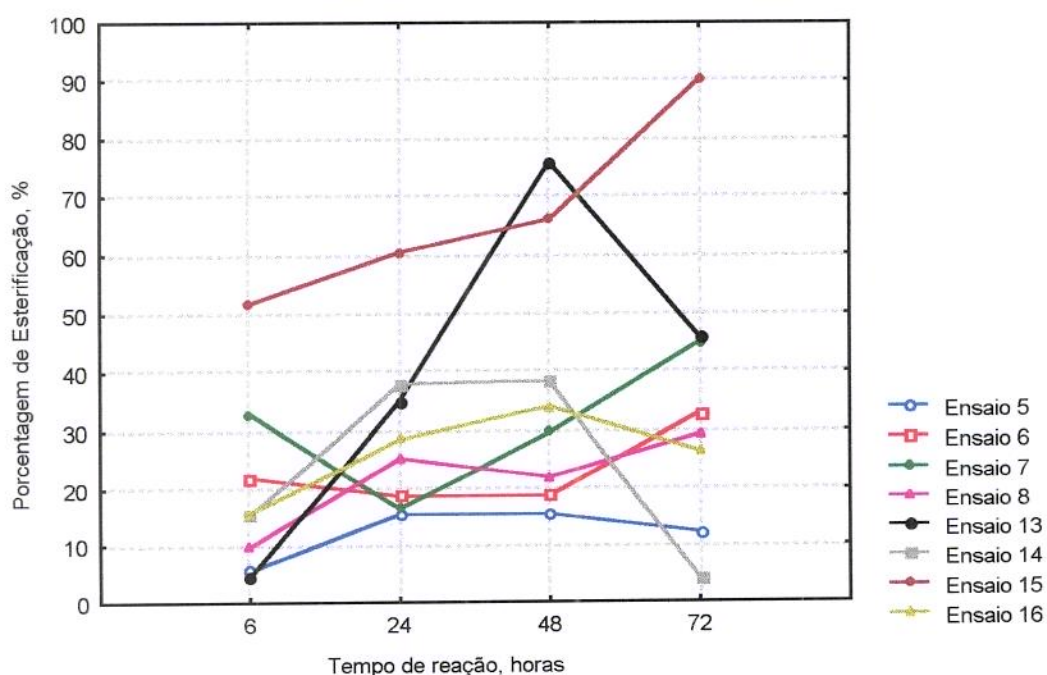


Figura 19 - Planejamento Exp. 1 para butirato de isoamila *Geotrichum* sp

TABELA 23: Resultados obtidos para o planejamento experimental 1 com a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de butirato de isoamila.

Ensaio	Variáveis			% Esterificação			
	RM	Temper. °C	Conc. E %	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
5	- 1	- 1	- 1	5,5	15,4	15,4	12,1
6	+1	- 1	- 1	22	18,7	18,7	33
7	- 1	+1	- 1	33	16,5	29,7	45,1
8	+1	+1	- 1	9,68	25,3	22	29,3
13	- 1	- 1	+1	4,4	35,2	76	46
14	+1	- 1	+1	15,4	38	38,5	34,1
15	- 1	+1	+1	51,7	60,5	66	90,2
16	+1	+1	+1	15,7	28,6	34,1	26,4
central	0	0	0	0,3	20	34,47	35,07
central	0	0	0	0	15,8	31	31,65
central	0	0	0	0	11,6	31,22	28,23

TABELA 24: Efeitos calculados para o planejamento experimental 1 com a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de butirato de isoamila.

Efeitos	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Media	19,67	29,77	37,55	35,77
1- RM	-7,95	-4,25	-18,45 *	-25,15 *
2- Temperatura	15,69	5,9	0,8	23,95
3- Concentrac. E	4,2	21,6 *	32,2 *	11,8 *

(* valores significativos estatisticamente)

Os objetivos deste delineamento experimental inicial foram comparar a capacidade das lipases de *Rhizopus sp* e *Geotrichum sp* na síntese de butirato de isoamila e também avaliar a verdadeira importância das variáveis estudadas no processo.

Quanto ao primeiro objetivo, pode-se concluir inicialmente, que a lipase de *Geotrichum sp* é mais lenta na síntese do que a lipase de *Rhizopus sp*, no entanto mais uma vez as duas atingem rendimentos finais muito semelhantes. Portanto, a lipase de *Rhizopus sp* possui maior produtividade neste processo.

Com relação ao segundo objetivo, não foi possível observar com os resultados obtidos para a síntese de butirato de isoamila, empregando a lipase de *Geotrichum sp*, o verdadeiro peso das variáveis no processo.

Em função de potencial apresentado por esta lipase, a sugestão seria o estudo de outro processo, com faixas mais amplas de variação das variáveis a fim de se

utilizar o grande potencial desta lipase, que ficou prejudicado pelo processo, ou por sua falta de estabilidade nas condições do processo. O controle de água no processo por exemplo, pode ser um fator importante na aceleração da síntese empregando a lipase de *Geotrichum sp.* Seria muito interessante investigar outro processo de síntese empregando esta lipase.

Para o processo de síntese de butirato de isoamila empregando a lipase de *Rhizopus sp* foi possível comprovar que as variáveis relevantes no processo são a relação molar entre os substratos e a concentração enzimática.

A faixa de temperatura estudada foi estabelecida em função da faixa ótima de atividade hidrolítica da lipase e mostrou ser a mesma na síntese de butirato de isoamila.

Convém comentar que a lipase de *Geotrichum sp* apresentou comportamento semelhante ao catalisar a síntese de propionato de isoamila.

Prosseguindo no objetivo inicial de otimizar a síntese de butirato de isoamila empregando o processo ora proposto, o próximo passo foi realizar um novo delineamento experimental para a lipase de *Rhizopus sp*.

Foi realizado um segundo delineamento experimental do tipo 2^2 + pontos axiais (estrela) para modelo de segunda ordem quando necessário, e com pontos centrais para determinação do erro puro. Utilizando somente as variáveis significativas estatisticamente, relação molar e concentração enzimática, fixando a temperatura em 40°C, condição operacional de menor custo, em termos de energia térmica.

O estudo foi realizado em cinco níveis distintos, deslocados no sentido de encontrar uma região de máximo rendimento. Para a variável relação molar, a preferência da lipase de *Rhizopus sp* foi no sentido da (1: 2), descartou-se portanto pontos muito próximos da (4:1), restringindo o intervalo de variação dentro da faixa de melhor atividade da enzima, estabelecida pelo primeiro planejamento experimental. A variável concentração enzimática foi estudada dentro dos limites de 1 % para o menor nível e 10 % para o maior, respeitando as limitações operacionais já mencionadas anteriormente.

Os níveis de estudo das variáveis bem como o planejamento experimental completo estão dispostos a seguir.

O nível estrela, foi calculado segundo a fórmula $(2^{-2})^{1/4} = 1,41$, em valor codificado (BOX e col., 1978).

TABELA 25 - Variáveis e níveis para o delineamento experimental 2 para síntese de butirato de isoamila

Variável	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
RM	(0,09:1)	(1:2)	(1,5:1)	(2,5:1)	(2,91:1)
Conc E	1%	2,3%	5,5%	8,7%	10%

Relação Molar : (álcool : ácido)

Concentração Enzimática : % em massa dos reagentes

TABELA 26 - Delineamento experimental 2² + estrela + ponto central para síntese de butirato de isoamila em valores codificados.

Ensaio	Relação Molar	Conc. Enzima
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	-1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Relação Molar : (álcool : ácido)

Concentração Enzimática : % em massa dos reagentes

TABELA 27 - Delineamento experimental 2^2 + estrela + ponto central para síntese de butirato de isoamila em valores reais.

Ensaio	Relação Molar	Conc. Enzima
1	(1:2)	2,3
2	(2,5:1)	2,3
3	(1:2)	8,7
4	(2,5:1)	8,7
5	(0,09:1)	5,5
6	(2,91:1)	5,5
7	(1,5:1)	1
8	(1,5:1)	10
9	(1,5:1)	5,5
10	(1,5:1)	5,5
11	(1,5:1)	5,5

Relação Molar : (álcool : ácido)

Concentração Enzimática : % em massa dos reagentes

Foram retiradas alíquotas do meio de reação após 6, 24, 48 e 72 horas.

Os resultados obtidos na realização dos ensaios do planejamento experimental 2 estão ilustrados a seguir.

A figura 20 traz a cinética obtida na realização dos ensaios. É possível observar que os melhores rendimentos obtidos ocorreram nos ensaios 8,9,10 e 11, com 85 % de rendimento após 48 horas no ensaio 8 e 76 % nos demais que são os ensaios dos pontos centrais.

Os rendimentos observados após 48 horas de reação indicam que a reação neste ponto já atingiu o equilíbrio, pois os valores são semelhantes aos obtidos após 72 horas. Devemos portanto, trabalhar na faixa de 48 horas de reação.

O máximo rendimento obtido foi no ensaio 8 com RM (1,5:1) e 10 % de enzima, com 85 % de conversão. No entanto, trabalhando nas condições centrais (ensaios 9,10 e 11) onde RM é de (1,5 :1) e 5,5 % de enzima, obteve-se 75 % de rendimento (tabela 28).

Economicamente, a condição central pode ser também interessante pois emprega-se menor quantidade de enzima. Em termos de produtividade, com a condição central com 76 % de rendimento médio após 48 horas de reação, obtém-se cerca de 600 g de éster por litro de meio,ou ainda, 12,5 g / L por hora, contra 671 g de éster por litro de meio após 48 horas de reação na condição do ensaio 8 (ou 13,9 g / L por hora).

LANGRAND e col., 1988, testaram a síntese de butirato de isoamila com aproximadamente 30 lipases comerciais por esterificação direta. As reações foram

realizadas com 0,25 M de isoamílico e 0,5 M de ácido, 0,1 % de água e 0,5 gramas de lipase em 10 mL de n-heptano. Os resultados obtidos com a lipase de *Geotrichum candidum* foram de 18 % de rendimento após 24 horas e de 98 % de rendimento com a lipase de *Mucor miehei*. Segundo os autores, estão investigando a otimização destas condições reacionais.

WELSH e col. 1990, realizaram estudos para testar a capacidade de 27 lipases comerciais diferentes de sintetizar ésteres de baixo peso molecular em sistemas aquosos. Dentre as lipases testadas, as de *Candida cylindracea*, *Pseudomonas fluorescens* e *Mucor miehei* se destacaram. A produção máxima obtida após 24 horas de reação foi com as concentração de 0.05 mol/L de substrato para isopentil acetato, 0,2 mol/L para etil butirato e 0.3 mol/L para isopentil butirato.

A taxa de conversão de butil butirato foi de quase 100% quando se trabalhou com concentrações maiores que 0,2 mol/L de ácido. Os autores observaram inibição da enzima de *Pseudomonas fluorescens* pelo substrato acima da concentração de 1 mol/L, mas o mesmo efeito não foi observado com as outras lipases. Os solventes hexano, octano e decano foram utilizados no meio reacional, exceto para a síntese de etil butirato, onde o hexano foi a escolha.

CARTA e col. 1992, testaram a lipase imobilizada de *Candida cylindracea* na esterificação direta de álcool isoamílico com ácido butírico. A lipase imobilizada se mostrou efetiva na catálise do éster isoamil butirato, em sistemas reacionais compostos por quantidades estequiométricas de substrato (0-2 M) em hexano.

Quando o álcool isoamílico foi utilizado como substrato em hexano, as taxas de conversão foram da ordem de 0,085 moles / h. g e neste caso a enzima foi estável em concentrações muito maiores deste substrato.

Os autores observaram que com a utilização do álcool isoamílico como substrato, o uso de solventes como hexano, não foi necessário para a esterificação e a enzima pode ser empregada em misturas com diferentes concentrações de ácido. Assim, os autores concluem que as taxas de conversão obtidas em hexano são similares às obtidas sem hexano, com concentrações maiores de ácido. Por outro lado, a presença de excesso de álcool isoamílico pareceu ter efeito estabilizador na lipase. Foi testado ainda o efeito da adição de água ao sistema sem hexano, concluindo que a presença de mais de 5% (v/v) de água dissolvida em álcool isoamílico não foi significativa nas condições de reação.

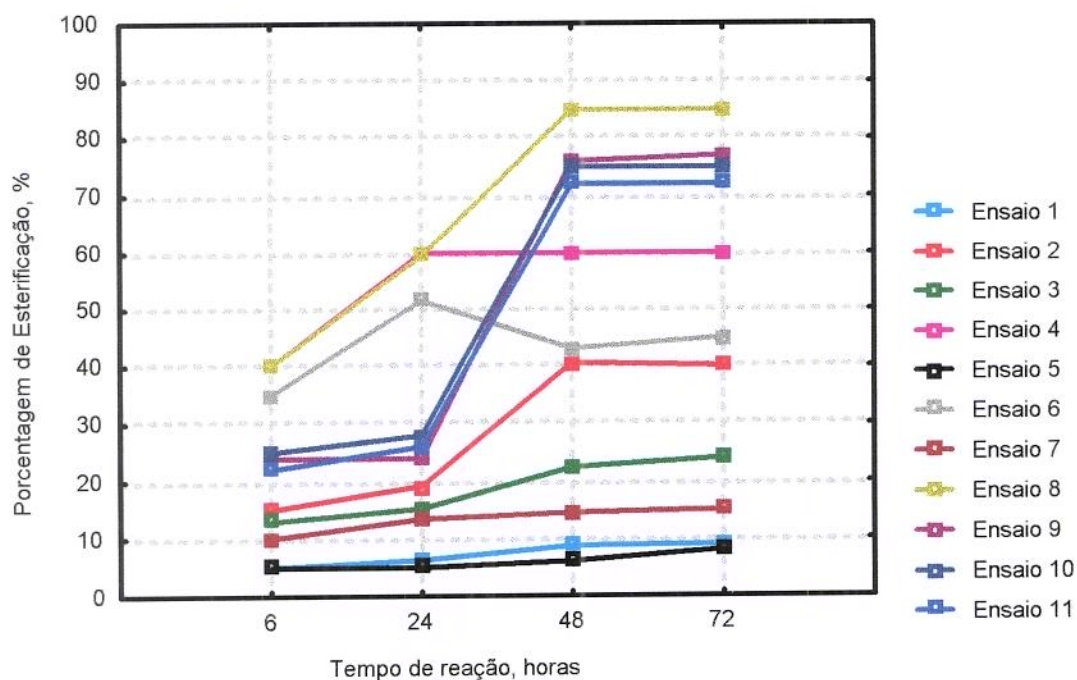


Figura 20 - Planejamento Exp. 2 para butirato de isoamila

TABELA 28 - Resultados obtidos para o planejamento experimental 2 com a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de butirato de isoamila.

Ensaio	Variáveis		% Esterificação				Produtividade
	RM	Conc. Enz.	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas	g éster/g lipase 48 horas
1	- 1	- 1	5	6,3	8,7	9	3,4
2	+1	- 1	15	19,2	40,63	40	16,11
3	- 1	+1	13	15,2	22,35	24	2,26
4	+1	+1	40	60	60	60,1	6,13
5	- 1,41	0	5	5	6	8,31	0,96
6	+1,41	0	35	51,6	43,1	45	6,92
7	0	-1,41	10	13,4	14,5	15	13,7
8	0	+1,41	40	59,5	85	85	7,55
9	0	0	24	24	76,5	77	12,4
10	0	0	25	28	72	73	11,7
11	0	0	22	26	75	75	12,22

TABELA 29: Efeitos calculados para o planejamento experimental 2 para a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de butirato de isoamila.

Efeitos	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Media	18,25	25,17	32,92	33,25
1- RM	18,5	28,8	34,8 *	33,5 *
2- Concentrac. E	16,5	24,8 *	16,5 *	17,5 *

(* valores significativos estatisticamente)

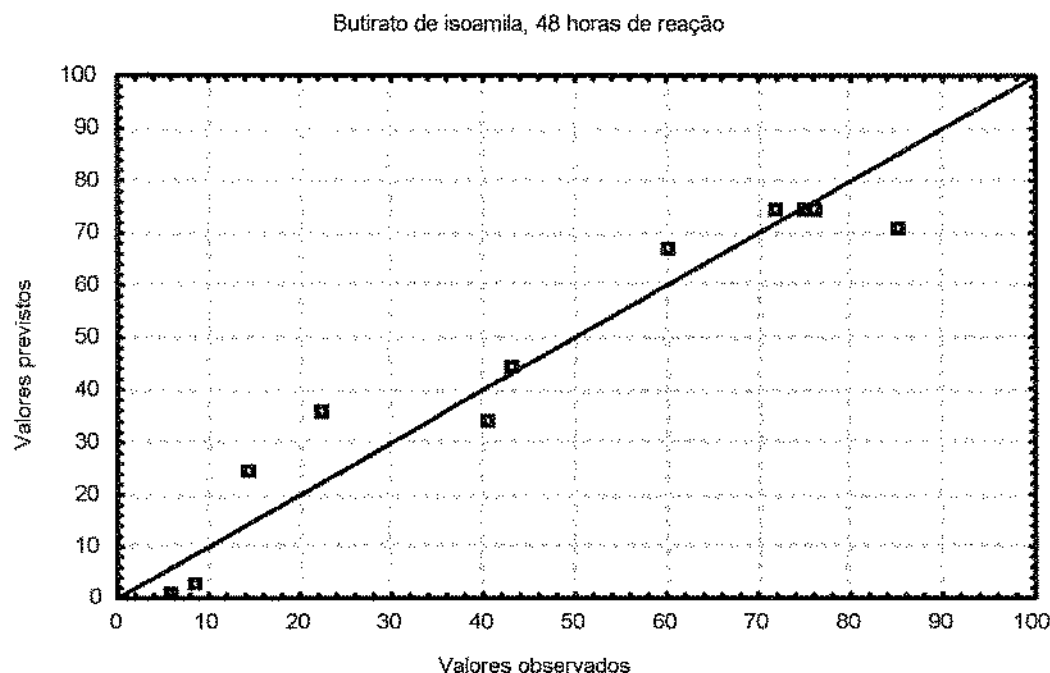


Figura 21 -Valores observados vs. valores previstos

TABELA 30 - Análise de Variância- Butirato de isoamila

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	Distribuição F (5 %)
Regressão	8069,7	4	2017,4	18,8	5,05
Resíduos	643,7	6	107,2		
Falta de ajuste	635	4	158,1		
Erro puro	8,6	2	4,3		
Total	8713,4				
Porcentual de Variância Explicada = 92 %					
Porcentual máximo de Variância Explicável = 99 %					

A modelagem para o ajuste de um polinômio de grau 2 que descreva o processo em estudo foi realizada através do programa estatística versão 5.0 (STASOFT, 1995), obtendo-se a Equação (2) que relaciona a porcentagem de

esterificação com as variáveis adimensionais RM (x_1) e Concentração enzimática (x_2) para a síntese de butirato de isoamila pela lipase de *Rhizopus sp.*

$$\% \text{ Esterificação} = 74,34 + 15,28 (\text{RM}) + 16,60 (\text{Conc. Enz.}) - 26,05 (\text{RM})^2 - 13,38 (\text{Conc. Enz.})^2.$$

O valor do Teste F calculado foi comparado ao valor tabelado para a Distribuição F (5 %), com os respectivos graus de liberdade (Bruns e col., 1995). Verificou-se que $F(\text{regressão/resíduos}) = 18,80$ é maior que o $F_{5,5} = 5,05$ cerca de 3,7 vezes, indicando que a regressão é significativa ao nível de 95 % de confiança. A figura 21 ilustra que houve boa dispersão entre os dados experimentais, ou seja, foi atingido o objetivo do delineamento, onde se estudou toda a região descrita por ele, com um bom ajuste final ao modelo matemático proposto.

Pode se afirmar que o ajuste deste modelo foi adequado, descrevendo o fenômeno com 95 % de confiança.

Observando a figura 22 que ilustra a superfície de resposta, pode-se perceber com facilidade que o processo de síntese de butirato de isoamila foi otimizado. As condições onde ocorrem os maiores rendimentos estão entre (2,5:1) e um pouco mais que (1:2). Observando o eixo da concentração enzimática, na área vermelha da superfície de resposta, pode-se verificar que na faixa acima de 2,3 % até 10 % de enzima também estão localizados os máximos rendimentos.

As condições ótimas para a síntese de butirato de isoamila, empregando a lipase de *Rhizopus sp.*, foram obtidas empregando a relação molar entre o álcool isoamílico e o ácido butírico de (1,5 :1), a concentração enzimática em massa dos reagentes de 5,5 % o que equivale a 1248 Unidades de Atividade. A temperatura de 40 °C, e 48 horas de reação. O rendimento alcançado foi de 76 %. A produtividade com este rendimento foi de 12,5 gramas de éster por litro de meio por hora de reação ou, 600 gramas de éster por litro de meio após 48 horas de reação ou ainda, de 0,26 moles de acetato de isoamila por hora por grama de lipase.

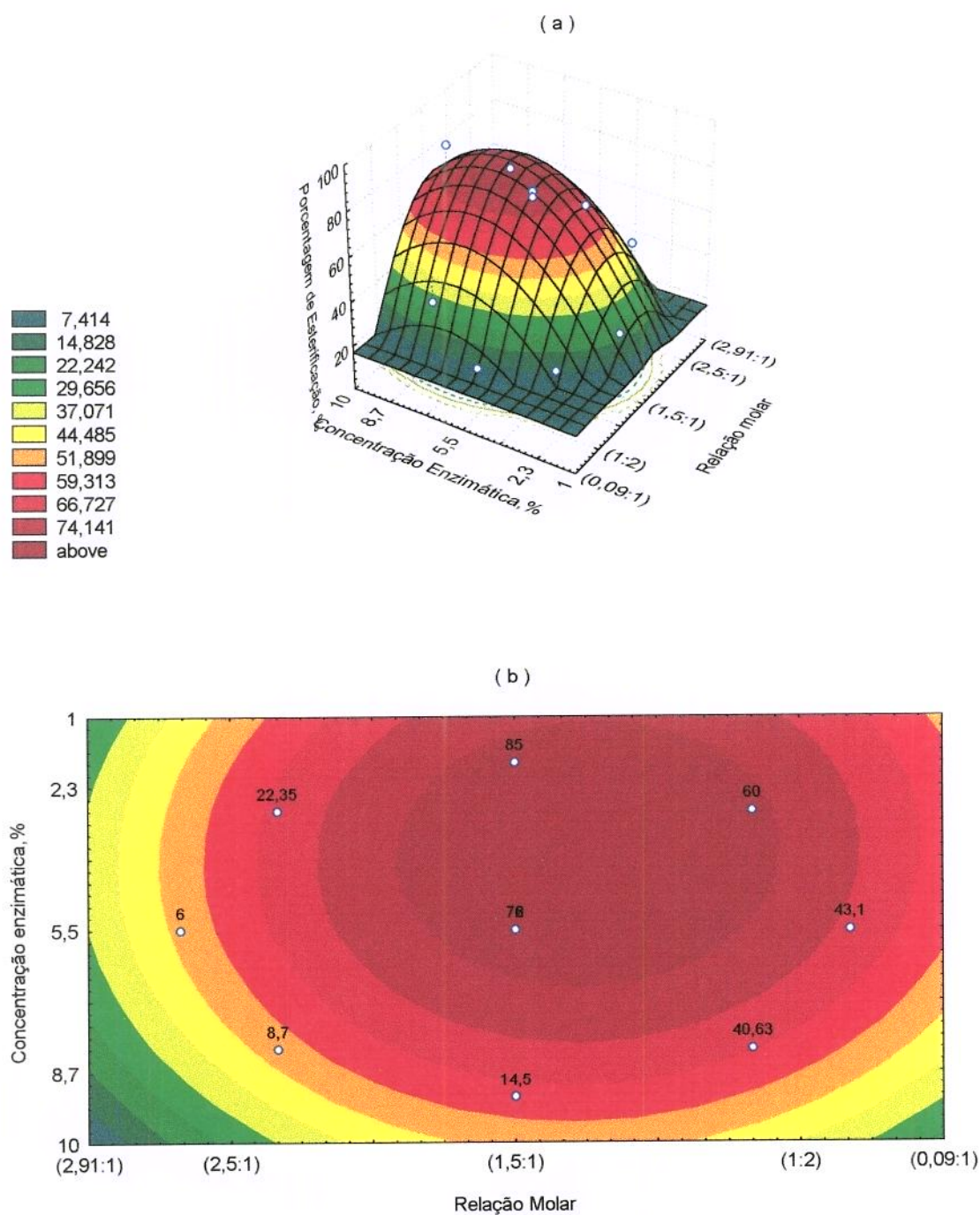


Figura 22 - Efeito da relação molar e concentração enzimática na porcentagem de esterificação de butirato de isoamila após 48 horas de reação a temperatura de 40°C.

(a) Superfície de Resposta; (b) Curvas de contorno

6.4. Obtenção de acetato de isoamila

Discutiremos neste capítulo os resultados obtidos na realização experimental dos ensaios do planejamento experimental 1, descrito nas tabelas 7 e 8 para a síntese de acetato de isoamila.

Para melhor compreensão e análise dos resultados, o estudo foi dividido em ensaios realizados pela lipase de *Geotrichum sp* (1,2,3,4, 9,10,11 e 12) e ensaios realizados pela lipase de *Rhizopus sp* (5,6,7,8,13,14,15,e 16).

Como um dos objetivos do trabalho foi comparar a performance das duas lipases no planejamento experimental 1, e escolher a melhor para a continuação dos estudos, esta foi a metodologia de análise mais adequada.

Inicialmente compararemos as curvas da cinética enzimática obtidas pelas lipases de *Geotrichum sp* e *Rhizopus sp* ilustradas nas figuras 23 e 24.

O rendimento máximo obtido pela lipase de *Geotrichum sp* (fig.23) foi de 77 % após 72 horas de reação no ensaio de número 3 onde as condições de reação foram : RM (1:2), temperatura de 60 °C e 1 % de lipase. Os melhores resultados foram obtidos sempre após 72 horas de reação com os ensaios 3,11,10 e 9 com 77, 66, 67 e 54 % de esterificação respectivamente. As condições experimentais em que foram realizados esses ensaios, foram as seguintes:

Ensaio	RM	Temperatura	Conc. Enz.
3	(1:2)	60 °C	1 %
9	(1:2)	40 °C	10 %
10	(4:1)	40 °C	10 %
11	(1:2)	60 °C	10 %

Observando estes resultados, a tendência é assumir que a relação molar de (4:1), e a concentração enzimática de 1% não são as melhores por estarem presentes menos vezes nos ensaios acima. No entanto, as análises são realizadas segundo sua significância estatística, como está ilustrado na tabela 32 que traz os efeitos calculados estatisticamente de cada variável no processo. Observa-se que nenhuma variável mostrou-se estatisticamente significativa dentro da faixa estudada (valores significativos são apresentados acompanhados de um asterisco). Com relação à variável RM, pode-se observar que a mudança do nível -1 para +1, ou de (1:2) para (4:1), provoca um decréscimo no rendimento final de 38,78 %. Confirmando o observado anteriormente.

A análise dos efeitos provocados pela variável temperatura, mostra que a mudança de 40°C para 60°C provoca um incremento de 2,9% ao rendimento. Muito pouco significativo realmente. O aumento da concentração enzimática de 1% para 10 % provocou um incremento de 19,7 % no rendimento final do processo.

Portanto, pode-se concluir que, nas condições estudadas nenhum efeito de primeira ordem mais uma vez foi significativo estatisticamente. Isso significa que não há como delinear outro planejamento experimental respeitando as condições pré estabelecidas para o processo. Pode-se dizer que para a síntese de acetato de isoamila empregando a lipase de *Geotrichum sp* as condições ótimas de reação foram observadas com a relação molar entre o álcool e o ácido de (1:2), com a temperatura de reação de 40 °C (por ser a mais econômica), empregando 10 % de lipase em massa dos reagentes após 72 horas de reação.

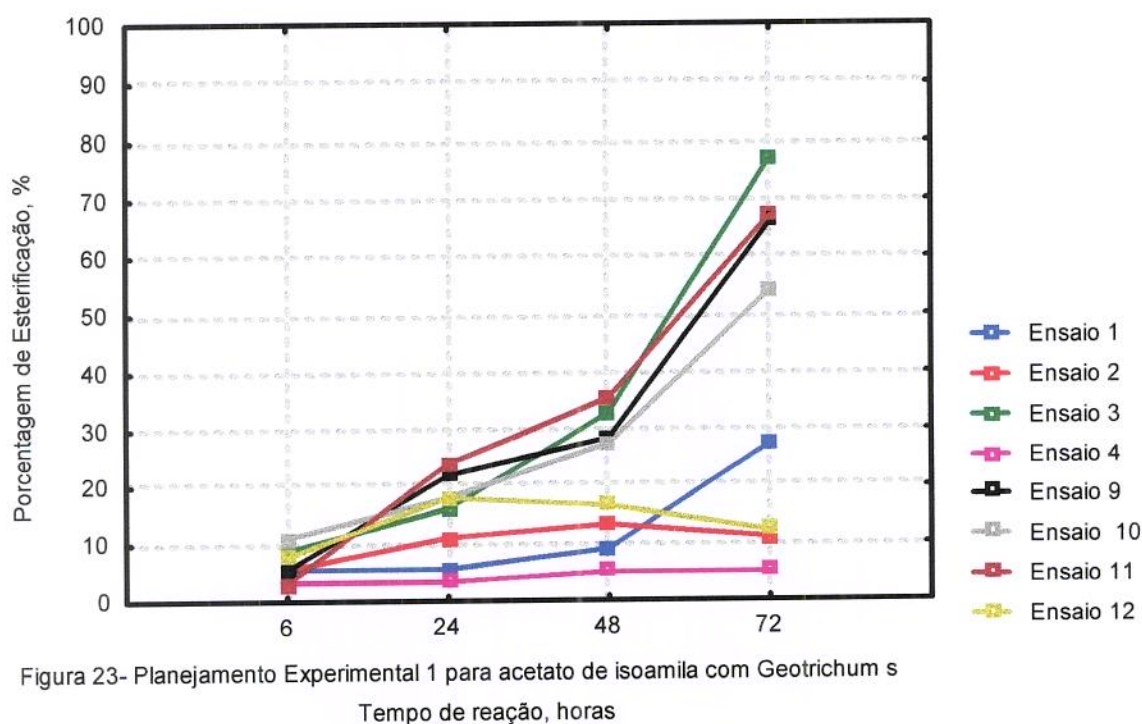


TABELA 31 : Resultados obtidos para o planejamento experimental 1 com a lipase de *Geotrichum sp* na síntese de acetato de isoamila.

Ensaio	Variáveis			% Esterificação			
	RM	Temper.	Conc. E	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
1	- 1	- 1	- 1	5,5	5,5	9	27,5
2	+1	- 1	- 1	5,5	11	13,2	11
3	- 1	+1	- 1	8,8	16	33	77
4	+1	+1	- 1	3,3	3,3	5	5
9	- 1	- 1	+1	5,5	22	28,6	66
10	+1	- 1	+1	11	18	27,6	54
11	- 1	+1	+1	3	24	35,5	67,1
12	+1	+1	+1	7,7	18	16,5	12,1
central	0	0	0	14,2	6	0	0
central	0	0	0	9,7	0	0	0
central	0	0	0	5,2	0	0	0

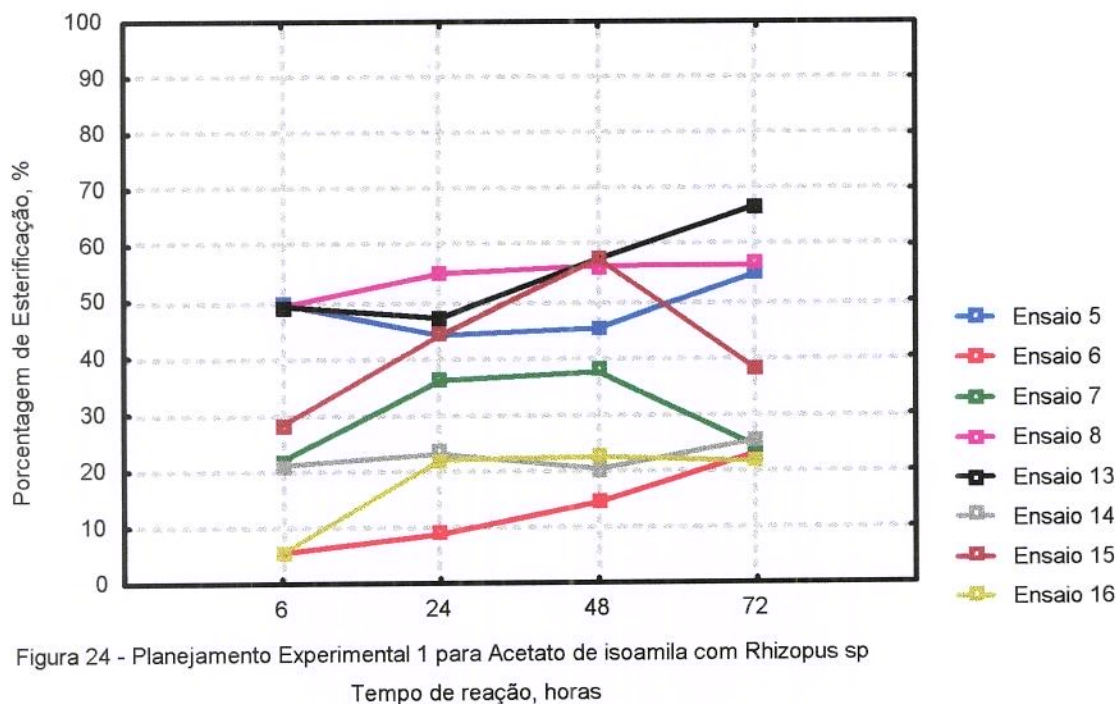
TABELA 32: Efeitos calculados para o planejamento experimental 1 com a lipase de *Geotrichum sp* na síntese de acetato de isoamila.

Efeitos	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Media	6,28	14,72	21,05	39,96
1- RM	1,17	-4,3	-10,95	-38,87
2- Temperatura	-1,17	1,2	2,9	0,67
3- Concentrac. E	1,02	11,55	12	19,67

Analizando a figura 24 que ilustra a cinética enzimática dos ensaios realizados com a lipase de *Rhizopus sp*, pode-se observar que o máximo rendimento obtido foi de 67,1 % após 72 horas de reação. No entanto, o perfil das curvas é muito diferente do obtido com a lipase de *Geotrichum sp*.

A lipase de *Rhizopus sp* atua mais rapidamente, de modo mais estável, atingindo após 48 horas valores muito semelhantes aos obtidos após 72 horas, indicando que a reação entra em equilíbrio após 48 horas. A lipase de *Geotrichum sp* possui rendimento final pouco superior ao da lipase de *Rhizopus sp*, mas com produtividade inferior, uma vez que só começa a apresentar taxas significativas de conversão após 72 horas de reação, como pode-se observar, após 48 horas, a lipase de *Geotrichum sp* atingiu um máximo de 35 % de conversão contra 57,5 % da lipase de *Rhizopus sp*.

As melhores taxas de conversão obtidas pela lipase de *Rhizopus sp*, foram nos ensaios 13, 8 e 5, como pode ser observado na figura abaixo.



Analisando as tabelas 33 e 34 a seguir, observa-se que, como foi observado na síntese de butirato de isoamila, a variável temperatura foi a única a não apresentar significância estatística, ou seja, sua variação dentro da faixa estudada, não afetou significativamente o rendimento obtido pela lipase de *Rhizopus* sp. A relação molar entre os substratos provou ser estatisticamente importante no processo e a variação de (1:2) para (4:1) provocou um decréscimo de até 21,1 % no rendimento obtido após 24 horas de reação. Também importante estatisticamente porém em menor grau foi a variável concentração enzimática.

TABELA 33 : Resultados obtidos para o planejamento experimental 1 com a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de acetato de isoamila.

Ensaio	Variáveis			% Esterificação			
	RM	Temper. °C	Conc. E %	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
5	- 1	- 1	- 1	49,5	44	45,1	55
6	+1	- 1	- 1	5,5	8,8	14,3	23,1
7	- 1	+1	- 1	22	36	37,4	24,2
8	+1	+1	- 1	49	55	56,2	56,5
13	- 1	- 1	+1	49	47	57,5	67,1
14	+1	- 1	+1	21	23	20,2	25,3
15	- 1	+1	+1	28,2	44	57,5	37,7
16	+1	+1	+1	5,5	22	22,4	21,5
central	0	0	0	0	10,5	0	23,9
central	0	0	0	0	5,7	1,5	19,8
central	0	0	0	0	1,05	0	15,8

TABELA 34: Efeitos calculados para o planejamento experimental 1 com a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de acetato de isoamila.

Efeitos	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Media	28,71	34,97	38,82	38,8
1- RM	-16,92	-15,55 *	-21,1 *	-14,4 *
2-Temperatura	-5,07	8,55	9,1	-7,65
3- Concentrac. E	-5,57 *	-1,95 *	1,15	-1,8 *

(* valores significativos estatisticamente)

Os objetivos deste delineamento experimental inicial foram comparar a capacidade das lipases de *Rhizopus sp* e *Geotrichum sp* na síntese de acetato de isoamila e também avaliar a verdadeira importância das variáveis estudadas no processo.

Quanto ao primeiro objetivo, pode-se concluir inicialmente, que a lipase de *Geotrichum sp* é mais lenta na síntese do que a lipase de *Rhizopus sp*, no entanto as duas atingem rendimentos finais muito semelhantes. Portanto, a lipase de *Rhizopus sp* possui maior produtividade neste processo.

Com relação ao segundo objetivo, não foi possível observar com os resultados obtidos para a síntese de acetato de isoamila, empregando a lipase de *Geotrichum sp*, o verdadeiro peso das variáveis no processo.

Em função do potencial apresentado por esta lipase, a sugestão seria o estudo de outro processo, com faixas mais amplas de variação das variáveis a fim de se utilizar o grande potencial desta lipase, que ficou prejudicado pelo processo. O controle de água no processo por exemplo, pode ser um fator importante na aceleração da síntese empregando a lipase de *Geotrichum sp.* Seria muito interessante investigar outro processo de síntese empregando esta lipase.

Para o processo de síntese de acetato de isoamila empregando a lipase de *Rhizopus sp* foi possível comprovar que as variáveis relevantes no processo são a relação molar entre os substratos e a concentração enzimática.

A faixa de temperatura estudada foi estabelecida em função da faixa ótima de atividade hidrolítica da lipase que mostrou ser a mesma na síntese de acetato de isoamila.

Nunca é demais lembrar que estes resultados são válidos para a síntese do acetato e butirato e não para a síntese de propionato de isoamila como foi observado anteriormente.

Prosseguindo no objetivo inicial de otimizar a síntese de acetato de isoamila empregando o processo ora proposto, o próximo passo foi realizar um novo delineamento experimental para a lipase de *Rhizopus sp.*

O segundo delineamento experimental foi realizado como 2^2 + estrela com pontos centrais. Utilizando somente as variáveis significativas estatisticamente, relação molar e concentração enzimática, fixando a temperatura em 40°C, faixa operacional de menor custo.

O estudo foi realizado em cinco níveis distintos, deslocados no sentido de encontrar uma região de máximo rendimento. Para a variável relação molar, a preferência da lipase de *Rhizopus sp* foi no sentido da (1: 2), descartou-se portanto pontos muito próximos da (4:1), restringindo o intervalo de variação dentro da faixa de melhor atividade da enzima, estabelecida pelo primeiro planejamento experimental. A variável concentração enzimática foi estudada dentro dos limites de 1 % para o menor nível e 10 % para o maior, respeitando as limitações operacionais já mencionadas anteriormente.

Os níveis de estudo das variáveis bem como o planejamento experimental completo estão dispostos a seguir.

O nível estrela, foi calculado segundo a fórmula $(2^{-2})^{1/4} = 1,41$, em valor codificado.

TABELA 35 - Variáveis e níveis para o delineamento experimental 2 para síntese do acetato de isoamila

Váriavel	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
RM	(0,09:1)	(1:2)	(1,5:1)	(2,5:1)	(2,91:1)
Conc E	1%	2,3%	5,5%	8,7%	10%

Relação Molar : (álcool : ácido)

Concentração Enzimática : % em massa dos reagentes

TABELA 36 - Delineamento experimental 2² + estrela + ponto central para síntese de acetato de isoamila em valores codificados.

Ensaio	Relação Molar	Conc. Enzima
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Relação Molar : (álcool : ácido)

Concentração Enzimática : % em massa dos reagentes

TABELA 37 - Delineamento experimental 2^2 + estrela + ponto central para síntese de acetato de isoamila em valores reais.

Ensaio	Relação Molar	Conc. Enzima
1	(1:2)	2,3
2	(2,5:1)	2,3
3	(1:2)	8,7
4	(2,5:1)	8,7
5	(0,09:1)	5,5
6	(2,91:1)	5,5
7	(1,5:1)	1
8	(1,5:1)	10
9	(1,5:1)	5,5
10	(1,5:1)	5,5
11	(1,5:1)	5,5

Relação Molar : (álcool : ácido)

Concentração Enzimática : % em massa dos reagentes

Foram retiradas alíquotas do meio de reação após 6, 24, 48 e 72 horas.

Os resultados obtidos na realização dos ensaios do planejamento experimental 2 estão ilustrados a seguir.

A figura 25 traz a cinética obtida na realização dos ensaios. É possível observar que os melhores rendimentos obtidos ocorreram nos ensaios 1,3,9,10 e 11, que compreendem os níveis -1, 0 e 1, e os piores rendimentos, nos pontos axiais ou estrela. Isso significa que trabalhando na faixa operacional entre -1 e 1, estaremos na faixa máxima de rendimento.

Os rendimentos observados após 48 horas de reação indicam que a reação neste ponto já atingiu o equilíbrio, pois os valores são semelhantes aos obtidos após 72 horas. Devemos portanto, trabalhar na faixa de 48 horas de reação.

O máximo rendimento obtido foi no ensaio 3 com RM (1:2) e 8,7 % de enzima, com 80 % de conversão. No entanto, trabalhando nas condições centrais (ensaios 9,10 e 11) onde RM é de (1,5 :1) e 5,5 % de enzima, obteve-se 75 % de rendimento (tabela 38).

Economicamente, a condição central pode ser melhor pois usa-se menos enzima, e excesso de álcool isoamílico, reagente mais barato do processo. Em termos de produtividade, a condição central também parece interessante, pois com 75 % de rendimento após 48 horas de reação, obtém-se cerca de 415 g de éster por litro de meio, ou ainda, 8,6 g / L por hora, contra 460 g de éster por litro de meio após 48 horas de reação na condição do ensaio 3 (ou 9,5 g / L por hora).

RAZAFINDRALAMBO e col. 1994, escolheram a reação de síntese de acetato de isoamila como modelo para estudo da otimização da síntese por catálise

enzimática. A reação utilizada foi a de transesterificação direta do ácido acético e álcool isoamílico, realizada em 10 mL de n-heptano em agitador com 150 rpm. A relação molar entre os substratos álcool : ácido variou de 1 a 8, a concentração de enzima de 0,1 a 1 g, tendo sido usadas as temperaturas de 32 a 55 °C e a quantidade de água de 0,1 - 1% (p/v).

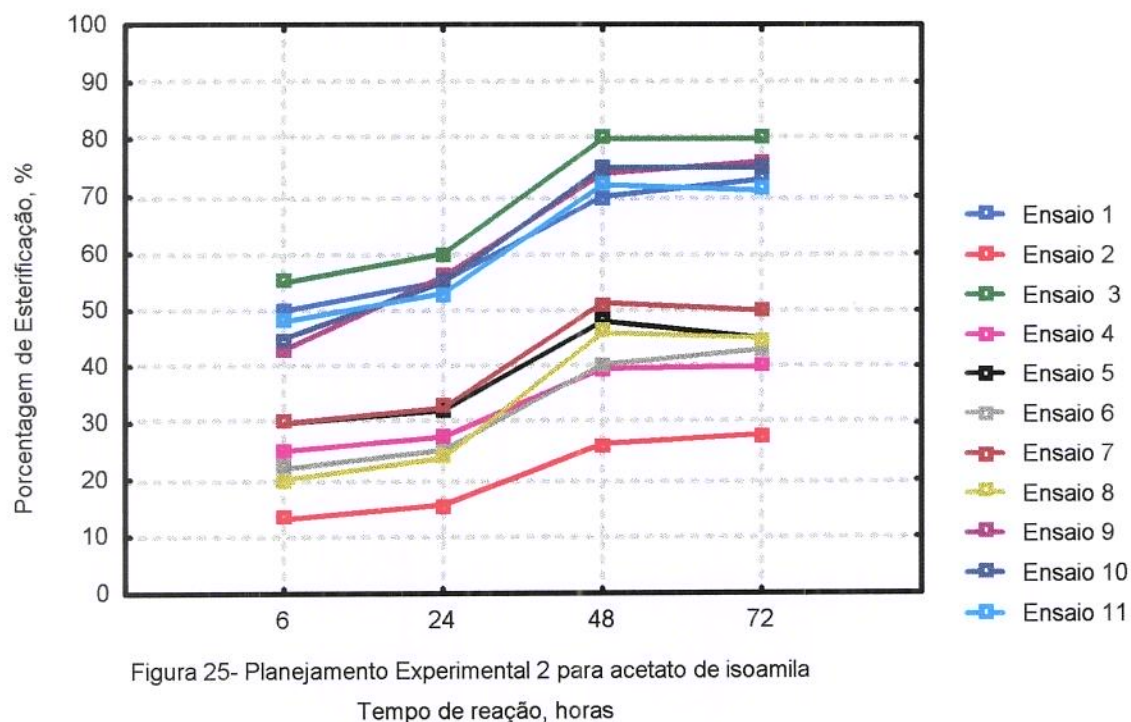
As condições ótimas determinadas foram 4:1 para a relação molar entre os substratos (álcool : ácido) , 45°C de temperatura, 0,1% de água e 0,5 g de enzima. As taxas de conversão obtidas durante a cinética realizada nas condições ótimas foi :

Tempo (h)	% Esterificação
4	56
8	76
24	82
48	81,5

Os autores observaram ainda que na relação molar de 1:1, a porcentagem de esterificação não foi superior à 5 %. Calculando a produtividade da lipase de *Mucor miehei* imobilizada, os autores obtiveram cerca de 255 g de éster por litro de meio após 24 horas ou 10,62 g / L por hora de reação.

Comparando aos dados obtidos neste trabalho, RAZAFINDRALAMBO e col. obtiveram produtividade 20 % maior que o obtido nos pontos centrais por *Rhizopus sp* e 11 % a mais que o obtido no ensaio 3.

Deve-se ressaltar que o meio reacional não é o mesmo nos dois trabalhos, o autor adiciona solvente orgânico e água ao meio reacional, procedimentos que não foram adotados aqui. Além deste aspecto, a lipase de *Mucor miehei* é comercial. Purificada e imobilizada, e a lipase de *Rhizopus sp* é uma preparação bruta em pó e não comercial. Considerando estes aspectos, pode-se observar que é de suma importância a condução de estudos empregando lipases ainda não comerciais, pois estas podem vir a substituir com excelência as já existentes no mercado.



As tabelas 38 e 39 ilustram os resultados e efeitos estatísticos calculados para os experimentos realizados.

TABELA 38 : Resultados obtidos para o planejamento experimental 2 com a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de acetato de isoamila.

Ensaio	Variáveis		% Esterificação				Produtividade
	RM	Conc. Enz.	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas	g éster/ g lipase 48 horas
1	- 1	- 1	50	55	70	73	26,25
2	+1	- 1	13	15	26	28	10,4
3	- 1	+1	55	60	80	80	8,0
4	+1	+1	25	27	39	40	3,9
5	- 1,41	0	30	32	48	4	7,6
6	+1,41	0	22	25	40	43	6,47
7	0	-1,41	30	32	51	50	13,56
8	0	+1,41	20	23	46	45	3,9
9	0	0	43	56	74	76	11,66
10	0	0	45	55	75	75	11,82
11	0	0	48	53	72	71	11,35

TABELA 39: Efeitos calculados para o planejamento experimental 2 com a lipase de *Rhizopus sp* na síntese de acetato de isoamila.

Efeitos	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Media	35,7	39,6	53,9	55,2
1- RM	-33,5 *	-36 *	-42 *	-42,5 *
2- Concentrac. E	8,5	8,4 *	11,6 *	9,5

(* valores significativos estatisticamente)

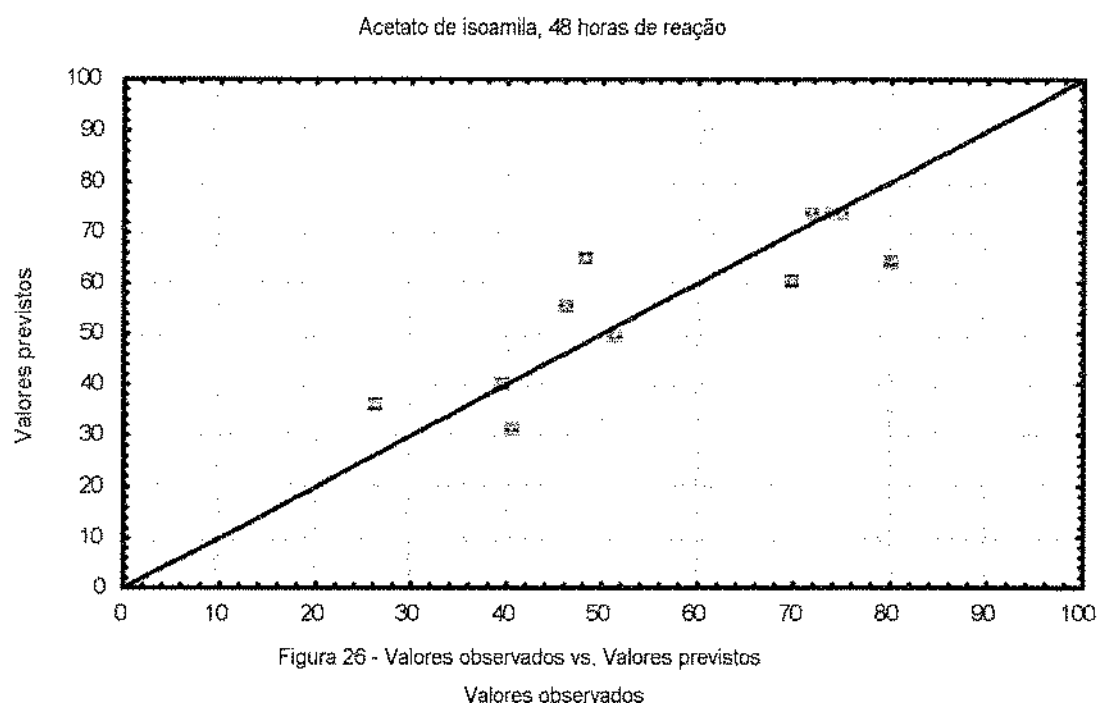


TABELA 40: Análise de Variância - Acetato de isoamila

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	Distribuição F (25%)
Regressão	2380,5	4	595,1		
Resíduos	912,1	6	152	3,9	1,89
Falta de ajuste	907,5	4	226,8		
Erro puro	4,6	2	2,3	97,3	3,15
Total	3292,7				
Porcentual de Variância Explicada = 72 %					
Porcentual máximo de Variância Explicável = 99 %					

A modelagem para o ajuste de um polinômio de grau 2 que descreva o processo em estudo foi realizada através do programa estatística versão 5.0 (STASOFT, 1995), obtendo-se a Equação (3) que relaciona a porcentagem de esterificação com as variáveis adimensionais RM (x1) e Concentração enzimática (x2).

$$\% \text{ Esterificação} = 73,63 - 11,90 (\text{RM}) + 1,98 (\text{Conc. Enz.}) - 12,88 (\text{RM})^2 - 10,62 (\text{Conc. Enz})^2.$$

Os valores do Teste F calculados foram comparados com os valores tabelados para a Distribuição F (25 %), com os respectivos graus de liberdade (Bruns e col., 1995). Verificou-se que $F(\text{regressão/resíduos}) = 3,91$ é maior que o $F_{5,5} = 1,89$, indicando que a regressão é significativa ao nível de 75 % de confiança.

O outro valor de $F(\text{falta de ajuste/erro puro}) = 97,3$ foi calculado para demonstrar mais uma vez, a falta de ajuste do modelo, e como pode ser observado, é maior que $F_{3,2} = 3,15$, indicando que realmente, a falta de ajuste deste modelo é significativa.

Esse fato pode ser observado também através da observação da figura 26 onde o desvio dos valores experimentais obtidos com relação aos previstos é significativo. A figura 26 ilustra também que houve boa dispersão entre os dados experimentais, ou seja, foi atingido o objetivo do delineamento, onde se estudou toda a região descrita por ele.

Pode se afirmar que o ajuste deste modelo não foi adequado, descrevendo o fenômeno somente com 75 % de confiança, ou ainda que infelizmente este processo sofre variações que não podem ser descritas satisfatoriamente por um polinômio de 2º grau. No entanto, o estudo realizado foi muito elucidativo sobre o comportamento das lipases testadas na catálise do ácido acético com o isoamílico obtendo bons rendimentos em relação aos relatados na literatura.

RIZZI e col.1992, sintetizaram acetato de isoamila utilizando lipase imobilizada de *Mucor miehei* Lipozyme através da reação de transesterificação de acetato de etila com álcool isoamílico em n-hexano. Os autores tinham como objetivo traçar um modelo matemático que descrevesse a cinética da reação. Observaram que a seletividade e a taxa de conversão diminuíam quando a quantidade de água no suporte que imobiliza a enzima excedeu 3% (p/p). Os dados experimentais indicaram que tanto os substratos quanto os produtos (etanol e acetato de isoamila) atuaram como inibidores da ação enzimática. Os autores sugeriram que esta inibição fosse do tipo competitiva, propondo um modelo do tipo ping pong bi-bi que descreve satisfatoriamente os dados experimentais, segundo os autores.

Observando a figura 27 que ilustra a superfície de resposta pode-se perceber com facilidade que o processo de síntese de acetato de isoamila foi otimizado. As condições onde ocorrem os maiores rendimentos estão na condição dos ensaios do ponto central até -1 e 1 para a relação molar. Passando os olhos pelo eixo da concentração enzimática, na área vermelha da superfície de resposta, pode-se verificar que na faixa de 2,3 a 8,7 % de enzima também estão localizados os máximos rendimentos.

As condições ótimas de síntese de acetato de isoamila pela lipase de *Rhizopus sp* foram estabelecidas com a relação molar entre o álcool isoamílico e o ácido acético de (1,5 :1), com a concentração enzimática em massa dos reagentes de 5,5 % o que equivale a 1081 Unidades de Atividade. A temperatura de reação foi de 40 °C, e o tempo de 48 horas. O rendimento alcançado foi de 75 %. A produtividade calculada com o máximo rendimento foi de 8,6 gramas de éster por litro de meio por hora de reação ou, 415 gramas de éster por litro de meio após 48 horas de reação ou ainda, de 0,25 moles de acetato de isoamila por hora por grama de lipase.

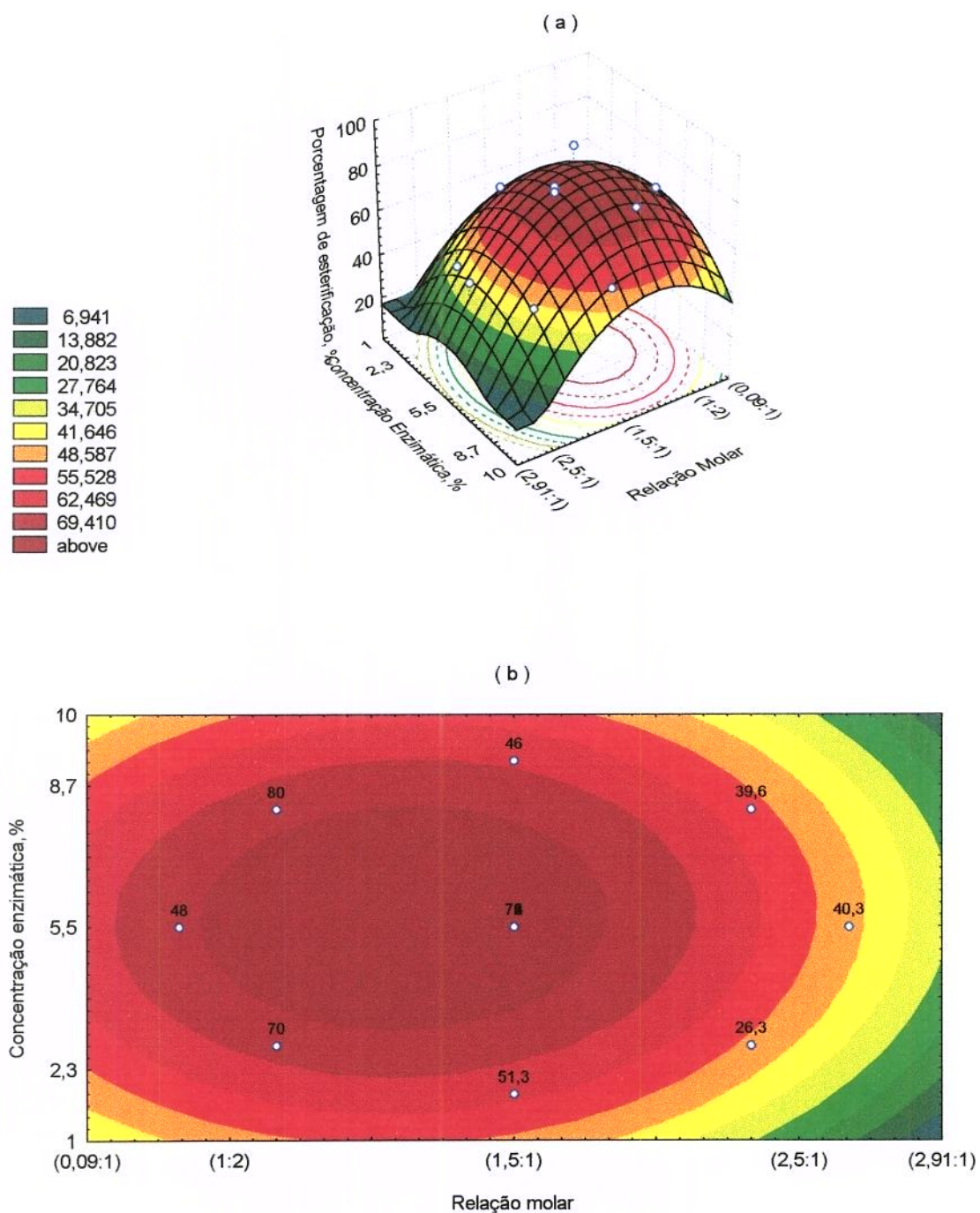


Figura 27 - Efeito da relação molar e concentração enzimática na porcentagem de esterificação de acetato de isoamila após 48 horas de reação a temperatura de 40°C.

(a) Superfície de Resposta; (b) Curvas de contorno

8. CONCLUSÕES

As preparações brutas de lipases de *Alcaligenes sp*, *Rhizopus sp*, *Geotrichum sp* e *Aspergillus sp* (linhagens 1068 e 1099) produzidas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA- UNICAMP mostraram grande potencial de aplicação na síntese de ésteres de baixo peso molecular, empregados como formadores de aromas em alimentos, tais como acetato, butirato e propionato, de citronelila, de isoamila, etc.

As lipases testadas apresentaram grande habilidade em esterificar os álcoois isoamílico e citronelol.

A lipase de *Rhizopus sp* apresentou taxas de conversão de 80 % na síntese de laurato de citronila após 8 horas de reação, destacando-se das demais pela habilidade em esterificar o ácido láurico em teores significativos.

A lipase de *Geotrichum sp* apresentou taxas de 76 % de conversão na síntese de acetato de isoamila, destacando-se das demais pela habilidade em esterificar o ácido acético em taxas significativas.

As lipases de *Rhizopus sp* e *Geotrichum sp* mostraram grande potencial de síntese dos ésteres acetato, propionato e butirato de isoamila em sistema livre da adição de solvente orgânico e de água. No entanto, a lipase de *Geotrichum sp* catalisou mais lentamente as reações, quando comparada à lipase de *Rhizopus sp*. As duas lipases sintetizaram ésteres com rendimento final semelhante, por volta de 75- 85 % porém, com produtividade diferentes, por serem necessárias 72 horas de reação para a lipase de *Geotrichum sp* e 48 horas para a lipase de *Rhizopus sp*.

A síntese de propionato de isoamila foi otimizada em processo livre da adição de solvente orgânico e água. As condições ótimas de síntese de propionato de isoamila pela lipase de *Rhizopus sp* foram obtidas com a relação molar entre o álcool isoamílico e o ácido propiônico de (3 :1), com a concentração enzimática em massa dos reagentes de 5,5 %, o que equivale a 1913 Unidades de Atividade. A temperatura de reação foi de 50 °C e o tempo de reação de 48 horas. O rendimento foi de 75 %. A produtividade de 12,25 gramas de éster por litro de meio por hora de reação ou, 600 gramas de éster por litro de meio após 48 horas de reação ou ainda 0,18 moles de propionato de isoamila por grama de lipase.

O processo de síntese de propionato de isoamila proposto pode ser descrito pela Equação (1) :

% Esterificação = 77,71 + 6,38 (RM) + 4,29 (Temperatura) + 76,05 (Conc. Enz.) - 38,85 (RM)² - 4,9 (Temperatura)² - 4,77 (Conc. Enz.)², com 95 % de confiança estatística.

A síntese de butirato de isoamila foi otimizada em processo livre da adição de solvente orgânico e água. As condições ótimas de síntese de butirato de isoamila pela lipase de *Rhizopus sp* foram obtidas com a relação molar entre o álcool isoamílico e o ácido butírico de (1,5 :1) com a concentração enzimática em massa dos reagentes de 5,5 % o que equivale a 1248 Unidades de Atividade. A temperatura de reação foi de 40 °C e o tempo de 48 horas de reação. O rendimento foi de 76 %. A produtividade de 12,5 gramas de éster por litro de meio por hora de reação ou, 600 gramas de éster por litro de meio após 48 horas de reação ou ainda, 0,26 moles de butirato de isoamila por grama de lipase.

O processo de síntese de butirato de isoamila proposto pode ser descrito pela Equação (2) :

% Esterificação = 74,34 + 15,28 (RM) + 16,60 (Conc. Enz.) - 26,05 (RM)² - 13,38 (Conc. Enz.)² com 95 % de confiança estatística.

A condição ótima de síntese de acetato de isoamila pela lipase de *Rhizopus sp* foi estabelecida com a relação molar entre o álcool isoamílico e o ácido acético de (1,5 :1), com a concentração enzimática em massa dos reagentes de 5,5 % o que equivale a 1081 Unidades de Atividade. A temperatura de reação foi de 40 °C, e o tempo de reação de 48 horas. O rendimento alcançado foi de 75 %. A produtividade calculada com o máximo rendimento foi de 8,6 gramas de éster por litro de meio por hora de reação ou, 415 gramas de éster por litro de meio após 48 horas de reação ou ainda, de 0,25 moles de acetato de isoamila por hora por grama de lipase.

O processo de síntese de acetato de isoamila proposto não pôde ser satisfatoriamente descrito por um modelo preditivo confiante.

O processo testado para a síntese dos ésteres: acetato, butirato e propionato de isoamila foi simples, alternativo e inovador. Simples porque, sem o controle da concentração de água, no sistema e sem a adição de solventes orgânicos, alcançou-se até 85 % de conversão. Alternativo porque propõe-se a utilização de um substrato abundante e de baixo custo, para a produção de ésteres de alto valor

comercial. Inovador porque se utilizam lipases não comerciais, substrato de baixo valor e obtém-se ésteres de aroma que podem ser considerados naturais, com até 85 % de conversão.

As lipases de *Rhizopus sp* e *Geotrichum sp* apresentaram valores de conversão comparáveis à literatura que utiliza sempre lipases comerciais, confirmando que estas lipases devem ser objeto de mais estudos por possuírem grande potencial de aplicação na síntese de ésteres formadores de aroma em alimentos.

Tendo em vista o volume de dados obtidos neste trabalho, bem como a importância da biocatálise de ésteres de alto valor comercial como os descritos aqui, se a realização de outros estudos explorando o potencial de todas as preparações brutas de lipases mencionadas.

O estudo de novos substratos também seria muito interessante, considerando a variedade de substratos que podem ser encontrados em abundância na natureza e a versatilidade das lipases como catalisadores de síntese de compostos de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARROS, N. B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. 1ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. 299p.
2. BHIRUD, V.S.; SUBRAHMANYAM, V.V.R.; VAIDYA, S.D. Alkylation of primary amines with fatty alcohols using immobilized *Mucor miehei* lipase as catalyst. **Journal of Oil Technology Association of India**, v. 23, p. 47-48, 1991.
3. BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.546-552, 1992.
4. BORGSTON, B.; BROCKMAN, H. L. Lipases. Amsterdam, Holland: Elsevier, 1984.
5. BORNSCHEUER, U.T. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 578-586, 1995.
6. BORZEIX, F.; MONOT, F.; VANDECASTEELE, J-P. Strategies for enzymatic esterification in organic solvents: Comparison of microaqueous, biphasic, and micellar system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.791-795, 1992.
7. BOTTA, M.; CERNIA, E.; CORELLI, F.; MANETTI, F.; SORO, S.; Probing the substratespecificity for lipases. II Kinetic and modeling studies on the molecular recognition of 2-arylproionic esters by *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei* lipases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1337, n.2, p. 302-310, 1997.
8. BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Statistics for Experiments - An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. New York : Wiley Series in Probability and Mathematica Statistics, 1978.
9. BOX, G.E.P; WETZ, J. Criteria for Judging Adequacy of Estimation by an Approximate Response Function. University of Wisconsin Technical Report; 1973. v.9.
10. CARTA, G.; GAINER, J.L. Synthesis of esters in non-aqueous solvents and solvent-free systems using immobilized enzymes. **Abstr. Pap. American Chemists Society**, 202, Meet, Pt 1, BIOT 65, 1991.
11. CARTA, G.; GAINER, J.L.; GIBSON, M.E. Synthesis of esters using a nylon-immobilized lipase in batch and continuous reactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.904-910, 1992.
12. CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A.; YOUNG-MOO, M.; LEGGE, R.L.

- Partitioning of water during the production of terpene esters using immobilized lipase. **Biocatalysis in Non-Conventional Media**. Elsevier Science Publishers B.V, p. 475-482, 1992.
13. CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A.; YOUNG-MOO, M. Process development for production of terpene esters using immobilized lipase in organic media. **Indian Journal of Chemistry**, v.31(B), p. 891-895, 1992.14.
 14. CASTRO, H.F.; ANDERSON, W. A. Fine Chemicals by Biotransformation Using Lipases. **Química Nova**, v.18, n.6, p.544-554, 1995.
 15. CASTRO, H.F.; CORTEZ, E.V.; COSTA, S.A. Comparação do desempenho da síntese de butirato de citronila por via química e via enzimática. **Anais do 1º COBEQ-IC**. São Carlos: 1995.
 16. CASTRO, H.F.; JACQUES, S.S. Influência de agentes dessecantes no desempenho da síntese do butirato de citronila utilizando lipase imobilizada. **Arq. Biol. Tech.**, v.38, n.2, p.339-344, 1995.
 17. CASTRO, H.F.; NAPOLEÃO, D.A.S.; SILVA, F.J. Efeito do tamanho da cadeia alifática dos ácidos empregados na esterificação do citrônol usando lipase como catalisador. **Anais do 1º COBEQ-IC**. São Carlos: 1995.
 18. CHANG, M.K.; ABRAHAN, G.; JOHN, V.T. Production of Cocoa Butter-Like Fat from Interesterification of Vegetable Oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.67, n.11, p.832-834, 1990.
 19. CHRISTEN, P.; MUNGUIA, L- A. Enzymes and Food Flavor a - Review. **Food Biotechnology**, v. 8, n.2 e 3, p.167-190, 1994.
 20. CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J.S.; COMBES, D. Kinetics of Geranyl Acetate synthesis by lipase-catalysed transesterification in n-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.293-298, 1992.
 21. CLAON, P.A.; AKOH, C.C. Enzymatic Synthesis of Geraniol and Citronellol esters by direct esterification in n-hexane. **Biotechnology Letters**, v.15, n.12, p. 1211-1216, 1993.
 22. CLAON, P.A.; AKOH, C.C. Enzymatic Synthesis of Geraniol Acetate in n-hexan with *Candida antartica* lipases. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.71, n.6, p. 575-578, 1994.
 23. CLAON, P.A.; AKOH, C.C. Lipase- catalyzed synthesis of terpene esters by Otransesterification in n-hexane. **Biotechnology Letters**, v.16, n.3, p. 235-240, 1994.
 24. CLAON, P.A.; AKOH, C.C. Effect of reaction parameters on SP 435 lipase catalyzed synthesis of citronellyl acetate in organic solvent. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.835-838, 1994.
 25. CLAON, P.A.; AKOH, C.C. Lipase- catalyzed synthesis of primary terpenyl

- acetates by transesterification: Study of reaction parameters. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.42, p.2349-2352, 1994.
26. COHRAN, W.G.; COX, G.M. Experimental Designs; 2^a ed. NY: John Wiley, p.335-370, 1964.
 27. COSTA, C.M. **Produção, purificação e caracterização de lipase de *Aspergillus sp.*** Campinas, 1996. 108p. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
 28. COSTA, R.S.N. **Produção, purificação e caracterização bioquímica de lipase de uma nova linhagem de *Rhizopus sp.*** Campinas, 1997. 90p. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
 29. DEMEYER, D. Na introduction to the OECD program meat quality and quality of animal production. **Food Chemistry**, v.59, n.4, p.491-497, 1997.
 30. DORDICK, J.S. Enzymatic catalysis in monophasis organic solvents. **Enzyme Microbial Technology**, v.11, p.194-211, 1989.
 31. DUMOND, T.; BARTH, D.; CORBIER, C.; BRANLAN, T.; PERRUT, M. Enzymatic reaction kinetic: Comparison in a organic solvent and in supercritical carbon dioxide. **Biotechnology and Bioengineering**, v.39, p. 329-333, 1992.
 32. FABER, K.; FRANSSEN, M.C.R. Prospects for the Increasead Aplication of Biocatalysts in Organic Transformations. **Trends in Biotechnology**, v.11, p.461-470, 1993.
 33. FAYOLLE, F. MARCHAL, R.; MONOT, F.; BLANCHET, D.; BALLERINI, D. Synthesis of butyl butyrate from wheat flour. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.215-220, 1991.
 34. FISCHER, K.; MESSNER, K. Adsorption of Lipase on Pulp Fibers During Biological Pitch Control in Paper Industry. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.470-473, 1992.
 35. FONTEYN, F.; BLECKER, C.; LOGNAY, G.; MARLIER, M.; SEVERIN, M. Optimization of Lipase-catalyzed synthesis of Citronellyl Acetate in Solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 16, n.7, p.693-696, 1994.
 36. FURUTAMI, T.; OOSHIMA, H.; KATO, J. Preparation of N-, O-diacyl ethanolamine from N-acyl ethanolamine using lpase preparations. **Enzyme and Microbial Technology**, v.20, n.3, p.214-220, 1997.
 37. GANDHI, N.N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.74, n.6, p. 621-634, 1997.
 38. GANDHI, N.N.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B. Studies on the Lipozyme-

- Catalyzed Synthesis of Butyl Laurate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, p.1-12, 1995.
39. GANDHI, N.N.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B.; MUKESH, D. Lipozyme deactivation by butanol and temperature. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 373-380, 1995.
 40. GATFIELD, I.L. Biotechnological production of flavor-active lactones. **Biochem. Eng.**, v.55, p.221-238, 1997.
 41. GATFIELD, I.L.; HOLZMINDEN, G.R. Enzymatic and microbial generation of flavors. **Perfumer & Flavorist**, v.20, p.5-14, 1995.
 42. GILLIES, B.; YAMAZAKI, H.; ARMSTRONG, D.W. Production of flavor esters by immobilized Lipase. **Biotechnology Letters**, v.9,n.10,p.709-714, 1987.
 43. GOLDBERG, M.; THOMAS, D.; LEGOY, M-D. The control of lipase-catalysed transesterification and esterification reaction rates. **European Journal of Biochemistry**, v.190, p.603-609, 1990.
 44. HAYES, D.G.; GULARI, E. 1-Monoglyceride production from lipase-catalyze sterification of glycerol and fatty acid in reverse micelles. **Biotechnology and Bioengineering**, v.38, p. 507-517, 1991.
 45. HARTREE, E.F. Determination of Protein: A Modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48,p.422-427, 1972.
 46. HERNÁIZ,M.J.; MONTERO, S.J.M.;SINISTERRA, J.V. Influence of the nature of modifier in the ehzymztic activity of chemical modified semipurified lipase from *Candida rugosa*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.55, n.2, p. 252-260, 1997.
 47. HIRANO,J. The Present Situation of Biotechnology in the Oleochemical Industry. **Chemical Economy and Engineering Review**, v.18,n.7-8, p.9-13, 1986.
 48. HOQ, M.M.; TAGAMI, H.; YAMANE, T.;SHIMIZU, S. Some characteristics of continuous glyceride synthesis by lipase in a microporous hydrophobic membrane bioreactor. **Agricultural Biological Chemistry**, v.49, p.335-342, 1985.
 49. HWAG, S.O.; PARK, Y. H. Ethyl acetate production in the gas phase. **Biotechnology Letters**, v.16, n. 4, p.379-384, 1994.
 50. ISHII, T.; MORI, T.; CHEN, J.; ITOH, Y.; SHIMURA, S.; KIRIMURA, K.; USAMI, S. Ester synthesis by a crude lipase of *Rhizopus oligosporus* in a aqueous system. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 70,n.3, p. 188-189, 1990.

51. IWAI, M.; OKUMURA, S.; TSUJISAKA, Y. Synthesis of Alcohol Esters by Lipase. **Agricultural Biological Chemistry**, v.44,n.11; p.2731-2732, 1980.
52. JÄÄSKELÄINEN, S.; WU, X-Y.; LINKO, S.; WANG, Y.; LINKO, Y-Y; TELEMANN, O.; LINKO, P. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 799, p. 129-138, 1996.
53. KNEZ, Z.; LEITGEB, M.; ZAVRSNIK, D.; LAVRIC, B. Synthesis of oleic acid esters with immobilized lipase. **Fat Science Technology**, v.92, p. 169-172, 1990.
54. KIM, S.M.; RHEE, J.S. Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.68,n.7,p.499-503, 1991.
55. KYOWA, H. Fermented fruit-like flavor production by treating oil and lipid and fusel oil with lipase. **Patente Japonesa** - 91- 08186, 1991.
56. KRINGS, U.; ABRAHAM, G.B.; BERGER, R.G. Plant impact volatiles from higher fungi: A biotechnological perspective. **Perfumer & Flavorist**, v.20, p.79-86, 1995.
57. LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v.30, p.81-87, 1987.
58. LANGRAND, G.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J. Lipase catalyzed formation of flavour esters. **Biotechnology Letters**, v.10,n.8, p.549-554, 1988.
59. LANGRAND, G.; RONDOTT, N.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J. Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases. **Biotechnology Letters**, v. 12,n.8, 581-586, 1990.
60. LINKO, Y-Y; LAMSA, M; HUHTALA, A; RANTANEN, O. Lipase Biocatalysis in the production of esters. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.72,n.11, p.1293-1299, 1995.
61. LINKO, Y-Y; WU, X-Y. Biocatalytic production of useful esters by two forms of lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.65, p. 163-170, 1996.
62. MACEDO, G.A. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações de lipase de *Geotrichum sp.*** Campinas, 1995, 121p. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
63. MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Partial Purification and Characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum sp.* **Revista de Microbiologia**, v.28, p.90-95, 1997.
64. MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M. Lipases microbianas na produção de ésteres

- formadores de aroma. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 1997. (No prelo).
65. MACRAE, A. R. Lipase- Catalyzed Interesterification of Oils and Fats. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.60, n.2, p.291-294, 1983
 66. MACRAE, A. R ; HAMMOND, R.C. Present and Future Applications of Lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.3. p.193-217, 1985.
 67. MANJÓN, A.; IBONA, J.L.; AROCAS, A. Short chain flavour ester synthesis by immobilized lipase in organic media. **Biotechnology Letters**, v.13, n.5, p. 339-344, 1991.
 68. MARGOLIN, A. L. Enzymes in the Synthesis of Chiral Drugs. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p.226-280, 1993.
 69. MEFFERT, A. Technical Uses of Fatty Acid Esters. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.61, n.2, p.255-258, 1984.
 70. MESTRI, S.D. & PAI, J.S. Effect of moisture on lipase catalysed esterification of geraniol Palmarosa oil in non-aqueous system. **Biotechnology Letters**, v.17, n.4, p.459-461, 1995.
 71. MILAGRES, A. M. F.; ERISMANN, N.M.; DURAN, N. **Proc. 2nd Braz. Chem.Lignins Wood Comp.** v.3, p.372, 1992.
 72. MONOT, F.; BORZEI, X.F.; BARDIN, M.; VANDESCASTEELE, J.P. Enzymatic esterification in organic media: Role of water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 759-765, 1991.
 73. MUKESH, D.; JADHAV, S.; BEVINAKATTI, H.S. Lipase-Catalysed Esterification Reactions. Experimental and Modeling Studies. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.69, n.2, p. 179-183, 1997.
 74. MUKHERJEE, K.D. **Progress Lipid Research**, v.33, p.165, 1994.
 75. NETO, SOUZA, R. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações da lipase de *Alcaligenes sp.*** Campinas, 1996. 130p. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
 76. OGUNTIMAIN, G.B.; ANDERSON, W.A.; YOUNG-MOO, M. Synthesis of geraniol esters in a solvent-free system catalyzed by *Candida antarctica* lipase. **Biotechnology Letters**, v. 17, n.1, p.77-82, 1995.
 77. OKUMURA, S.; IWAL, M.; TSUJISAKA, Y. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.575, p.156-165, 1979.
 78. PASTORE, G.M.; SATO, H.H.; YANG, T-S.; PARK, Y.K.; MIN, D.

- B. Production of fruit aroma by newly isolated yeast. **Biotechnology Letters**, v.16, n. 4, p. 388-392, 1994.
79. POSORSKE, L. H.; Le FEBVRE, G. K.; MILLER, C. A. HANSEN, T. T.; GLENNVIG, B. L. Process Consideration of Continuous Fat Modification with an Immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.65, n. 6, 1988.
 80. PUERTAS, S.; BRIEVA, R.; REBOLLEDO, F.; GOTOR, V. Lipase Catalyzed Aminolysis of Ethyl Propiolate and Acrylic Esters. Synthesis of Chiral Acrylamides. **Tetrahedron**, v. 49, p.4007-4014, 1993.
 81. QUINLAN, P.; MOORE, S. Modification of Triglycerides by Lipases: Process Technology and its Application to the Production of Nutritionally Improved Fats. **Inform**, v. 4 e 5, p.580-585, 1993.
 82. RATLEDGE, C. Biodegradation and Biotransformations of Oils and Fat-Introduction. In : Mini-Review Compilation Biodegradation and Biotransformations of oils and fats. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology**, v.55, p.397-414, 1992.
 83. RAZAFINDRALAMBO, H.; BLECKER, C; LOGNAY, G.; MARLIER, M.; WATHELET, J.P.; SEVERIN, M. Improvement of enzymatic synthesis yields of flavour acetates: The example of the isoamil acetate . **Biotechnology Letters**, v. 16, n.3, p.247-250, 1994
 84. RIZZI, M. STYLOS, P.; RIECK, A. ; REUSS, M. A kinetic study of immobilized lipase catalysing the synthesis of isoamil acetate by transesterification in n-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 709-714, 1992.
 85. ROSSITER, K. Quantitative Relationships Between Structure and the Fruity Odor of Esters. **Perfumer e Flavorist**, v.21, p. 33-46, 1996.
 86. SCHREIER, P. Enzymes and flavor biotechnology. **Adv. Biochem. Eng.**, v. 55, p. 51-72, 1997.
 87. SHIEH, C.J.; AKOH, C.C.; YEE, L.N. Optimized Enzymatic Synthesis of geranyl butirate with lipase AY from *Candida rugosa*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.51, p.371-374, 1996.
 88. SONNET, P.E. Lipase Selectivities. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.65, n.6, p. 900-904, 1988.
 89. STASOFT. Statistica for windows, versão 5.0; Manual do usuário, v. 4, USA, 1995.
 90. TALON, R.; MONTEL, M-C; BERDAGUE, J-L. Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19; n.8; p. 620-622, 1996.

91. TAKAHASHI, K.; SAITO, Y.; INADA, Y. Lipase Made Active in Hydrophobic Media. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.65,n.6, p. 911-916, 1988.
92. TOLDRA, F.; FLORES, M.; SANZ, Y.; Dry-cured ham flavor: enzymic generation and process influence. **Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 523-530, 1997.
93. TORRES, C.; OTERO, C. Influence of the organic solvents on the activity in water and the conformation of *Candida rugosa* lipase: Description of a lipase-activating pretreatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.594-600, 1996.
94. VORDERMULBECKE, T.; KIESLICH, K.; ERDMANN, H. Comparison of lipases by different assays. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.631-654, 1992.
95. VULFSON, N.E. Enzymatic synthesis of food ingredients in low water media. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, p. 209-215, 1993.
96. WANG, Y.; LINKO, Y-Y. Lipase-Catalyzed Enantiomeric Synthesis of Citronellyl Butyrate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80,n.5, p.4773-4777, 1995.
97. WELSH, W.F.; WILLIAMS, R.E. Lipase mediated production of flavor and fragrance esters from fusel oil. **Journal of Food Science**, v. 54,n. 6, p. 1565-1568, 1989.
98. WELSH, W.F.; WILLIAMS, R.E.; DAWSON, K.H. Lipase mediated synthesis of low molecular weight flavor esters. **Journal of Food Science**, v. 55,n.6, p.1679-1682, 1990.
99. WELSH, W.F. & WILLIAMS, R.E. Lipase-mediated production of ethyl butyrate and butyl butyrate in nonaqueous systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.12, p.743-748, 1990.
100. WU, W-H.; AKOH, C.C. PHILIPS, R.S. Lipase-catalyzed stereoselective esterification of DL-menthol in organic solvents using acid anhydrides as acylating agents. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.18, p.536-539, 1996.
101. WU, X.Y.; JÄÄSKELÄINEN, S.; LINKO, Y-Y. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p. 226-231, 1996.
102. YEE, L.N.; AKOH, C.C.; PHILIPS, R.S. *Pseudomonas* sp. Lipase- Catalyzed Synthesis of Geranyl Esters by Transesterification. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 72,n.11, p. 1407-1408, 1995.
103. YEE, L.N.; AKOH, C.C.; PHILIPS, R.S. Terpene ester synthesis by lipase-

- catalyzed transesterification. **Biotechnology Letters**, v.7, n.1, p. 67-70, 1995.
104. YEE, L.N.; AKOH, C.C.; PHILIPS, R.S. Lipase PS-Catalyzed transesterification of citronellyl butyrate and geranyl caproate: Effect of reaction parameters. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, v.3, p.255-260, 1997.
105. ZAIDI, A; GAINER, J.L.; CARTA, G. Fatty Acid esterification Using nylon-Immobilized Lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.48, p.601-605, 1995.

ANEXOS

ANEXO 1- Listagem dos compostos comercializados pela Fleurchem Inc.

Fleurchem, Inc.

Essential Oils, Flavors, Fragrances, Natural and Synthetic Chemicals

Natural Chemicals

Acetal
 Acetaldehyde (100%, 50%, 10% in ethanol)
 Acetaldehyde ex orange oil
 Acetic acid
 Acetone
 Acetoin (Kosher)
 Acetyl propionyl
 Alcohol C-6 (see Green Fort. 1800)
 Aldehyde C-5 (see Valeraldehyde)
 Aldehyde C-6
 Aldehyde C-7
 Aldehyde C-8
 Aldehyde C-10
 Aldehyde C-14
 Allyl caproate (see Pineapple 2500)
 Allyl isothiocyanate (Mustard oil)
 Almond, bitter
 Amyl acetate
 Amyl alcohol
 Amyl butyrate
 Amyl hexanoate
 Anethole
 Anisic aldehyde
 Anisyl acetate
 Anisyl alcohol
 Apple cider vinegar (200 grains)
 α -Arabinose
 β -Arabinose
 α -Arabitol
 β -Arabitol
 Benzaldehyde
 Benzyl acetate
 Benzyl butyrate
 Benzyl propionate
 Bitter almond oil (ex Apricot kernel oil)
 n -Butyl acetate
 n -Butyl alcohol
 n -Butyl isovalerate
 n -Butyl lactate
 n -Butyraldehyde
 Butyric acid
 Capric acid (Kosher)
 Caproic acid (Kosher)
 Caprylic acid (Kosher)
 4-Carvomenthenol
 α -Carvone
 Caryophyllene
 Cinnamic acid
 Cinnamic alcohol
 Cinnamic aldehyde
 Cinnamyl acetate
 Cinnamyl cinnamate
 Citral (Std, Extra, ex Lemongrass)
 Citronellal
 β -Citronellol
 Citronellyl acetate
 Citronellyl butyrate
 Citronellyl propionate
 Cocci-lactone
 Cocotone 7500 (CO₂ extraction)
 Cocotone 9700 (CO₂ extraction)
 Cocotone 9800 (CO₂ extraction)
 γ -Decalactone
 γ -Undecalactone (Aldehyde C-14)
 Decanal (50% and 90%)
 Decanoic acid
 Diacetyl
 Dihydro cuminyl aldehyde
 Dimethyl anthranilate
 2,5-Dimethyl-3-(2H)-furanone
 (10% and 20%)
 Dimethyl pyrazine
 Dimethyl sulfide
 Estragole
 Ethyl acetate
 Ethyl benzoate
 Ethyl butyrate
 Ethyl butyrate ex orange oil

Ethyl caprate
 Ethyl caproate
 Ethyl caprylate
 Ethyl cinnamate
 Ethyl decanoate
 Ethyl heptanoate
 Ethyl hexanoate
 Ethyl isobutyrate
 Ethyl isovalerate
 Ethyl lactate
 Ethyl laurate
 Ethyl levulinate
 Ethyl-2-methyl butyrate
 Ethyl myristate
 Ethyl octanoate
 Ethyl oleate
 Ethyl oxyhydrate (see Rum ether)
 Ethyl palmitate
 Ethyl propionate
 Ethyl pyruvate
 Eucalyptol
 Eugenol (ex Bay, Ex Clove)
 α -Fenchone
 Fermentaberry
 Furanol (see Strawberry furanone)
 Furfural
 α -Galactose
 Geraniol
 Geraniol (ex Citronellal)
 Geranyl acetate "C"
 Geranyl acetate "D"
 Geranyl butyrate
 Geranyl caprate
 Geranyl caproate
 Geranyl caprylate
 Geranyl isovalerate
 Geranyl propionate
 Grapefruit 001 "5X"
 Grapefruit 002 "5X"
 Heptanal
 2-Heptanone (Methyl amyl ketone)
 Heptyl acetate
 t-2-Hexenal
 t-2-Hexenyl acetate (see Green 5050)
 Hexanol
 Hexyl acetate
 Hexyl butyrate
 Hexyl-2-methyl butyrate
 cis-3-Hexenol
 cis-3-Hexenyl acetate
 cis-3-Hexenyl butyrate
 cis-3-Hexenyl caproate
 cis-3-Hexenyl isovalerate
 cis-3-Hexenyl lactate
 cis-3-Hexenyl-2-methyl butyrate
 Ionone α, β (60:40)
 Ionone α 50% in alcohol
 Ionone β 50% in alcohol
 Isoamyl acetate
 Isoamyl alcohol
 Isoamyl butyrate
 Isoamyl caprate
 Isoamyl caproate
 Isoamyl caprylate
 Isoamyl cinnamate
 Isoamyl isobutyrate
 Isoamyl isovalerate
 Isoamyl laurate
 Isoamyl propionate
 Isobutyraldehyde
 Isobutyl acetate
 Isobutyl alcohol
 Isobutyl butyrate
 Isobutyl caprate
 Isobutyl caproate
 Isobutyl caprylate
 Isobutyl isovalerate
 Isobutyl laurate
 Isobutyl propionate
 Isobutyric acid

Isopulegone
Isovaleraldehyde
Isovaleric acid
Ketone/arome
Lactic acid
Lactic acid
Leaf alcohol
Lemon aldehyde
Lime aldehyde
 α -Limonene
Linalool
Linalool (ex BDR, Ho)
Linalool ex Orange (regular and extra)
Linalyl acetate (ex BDR, petitgrain)
Maltol
Maltone
 α -Mannose
Maple lactone
Massoia lactone
p-Mentha-1,8-dien-7-al
Menthof
Menthone
Menthyl acetate
Methanol
Methyl amyl ketone
Methyl anthranilate
Methyl benzoate
Methyl butanal
2-Methyl butyraldehyde
Methyl butyrate
2-Methyl butyric acid
Methyl cinnamate
Methyl cyclopentenolone
Methyl heptanoate
Methyl heptenone
Methyl heptyl ketone
Methyl isobutyrate
Methyl-*n*-methyl anthranilate
Methyl nonyl ketone
Methyl salicylate
Methyl sulfide
Morin dihydrate
Mustard oil (Allyl isothiocyanate)
Myristic acid
Naringen
Neral
Nerolidol
2-Nonanone (Methyl heptyl ketone)
Nootkatone
Ocimene
Octanal (50% and 90%)
3-Octanol
Octyl acetate
Octyl butyrate
Octyl isovalerate
Oleic acid
Orange aldehydes
Orange carbonyls
Palmitic acid
Perilla aldehyde
 α -Phellandrene
 α -Pinene
 β -Pinene
 α -Piperitone
Propionic acid
Propyl acetate
Propyl alcohol
Propyl butyrate
Propyl caprate
Propyl caproate
Propyl caprylate
Propyl laurate
Propyl propionate
Pulegone
Pyrazines
Pyruvic acid
L-Rhamnose
Rhodinol
 α -Ribose

Rum ether
Sclareol
Sinensal
 α -Sorbitol
Tannic acid
Tartaric acid
 α -Terpineol
Terpinyl acetate
Tetramethylpyrazine
Thymol, natural
Valencene
Vanilla absolute (CO_2 extraction)
Vanillin
 α -Xylose

New Items Currently Being Worked On:

δ-Decalactone
 2,6-Dimethoxyphenol (Syringol)
 Ethyl formate
 Ethyl pelargonate
 Formic acid
 Guaiacol
 γ-Heptalactone
 Methyl acetate
 Raspberry ketone

Kosher for Passover:
 (will be available by the end of 1992)

Ethyl acetate
 Ethyl butyrate
 Ethyl formate
 Ethyl propionate

Natural Fortifiers

Apple	#4900
Apple	7000
Apple	7400
Apricot	2600
Blueberry	1060
Blueberry	1700
Cherry	1000
Cherry	1400
Cherry	9600
Cocoa flavor	1000
Cranberry	8500
Fermented flavor	2000
Grape	4000
Green note	1295
Green note	1800
Green note	3100
Green note	5050
Green note	9000
Malt fortifier type	3000
Peach	2000
Peach	2100
Pineapple	2500
Pineapple	7100
Praline	4000
Raspberry	1100
Raspberry	1120
Raspberry	1600
Raspberry	1605
Raspberry	2600
Raspberry	2610
Raspberry	3600
Raspberry	3615
Strawberry	3000
Strawberry	3030
Strawberry	7000
Strawberry	7025
Strawberry	7600
Strawberry	7635
Tomato	1026
Tomato	1030

P.O. Box 283, Garnerville, NY 10923-0283

Tel. #: (914) 786-3121

Fax #: (914) 786-3139

ANEXO 2 - Dados numéricos da seleção de lipases e substratos

ANEXO 2 - Dados numéricos da seleção de lipases e substratos.

Tabela 2.1. Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido acético por lipases de diferentes fontes após 4 horas de incubação

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação								
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Iso propanol	Iso butanol	Isoamílico	Óleo fúsel	Citronelol
<i>Geotrichum sp</i>	40	50	60	67	58	63	76	70	53
<i>Alcaligenes sp</i>	36	53	55	68	55	68	75	70	53
<i>Aspergillus sp lb-1068</i>	58	68	65	63	65	62	72	74	44
<i>Aspergillus sp lb-1099</i>	54	62	70	72	70	70	72	73	53
<i>Rhizopus sp</i>	57	51	51	70	70	70	70	70	0
<i>Candida rugosa</i> (comercial)	55	58	63	68	62	72	73	74	45

Tabela 2.2. Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido acético por lipases de diferentes fontes após 8 horas de incubação

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação								
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Iso propanol	Iso butanol	Isoamílico	Óleo fúsel	Citronelol
<i>Geotrichum sp</i>	59	65	72	78	73	76	74	70	53
<i>Alcaligenes sp</i>	61	70	73	78	73	72	72	70	53
<i>Aspergillus sp lb-1068</i>	54	78	67	65	67	64	74	73	45
<i>Aspergillus sp lb-1099</i>	73	61	68	72	69	70	73	69	50
<i>Rhizopus sp</i>	57	57	64	68	67	62	71	72	0
<i>Candida rugosa</i> (comercial)	42	59	99	71	64	68	72	73	53

Tabela 2.3. Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido acético por lipases de diferentes fontes após 24 horas de incubação

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação								
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Iso propanol	Iso butanol	Isoamílico	Óleo fúsel	Citronelol
<i>Geotrichum sp</i>	60	70	74	80	76	81	75	72	44
<i>Alcaligenes sp</i>	57	72	75	79	82	75	73	74	60
<i>Aspergillus sp lb-1068</i>	54	75	70	65	70	65	75	73	51
<i>Aspergillus sp lb-1099</i>	61	62	69	72	68	73	75	73	58
<i>Rhizopus sp</i>	56	60	65	70	72	0	76	73	0
<i>Candida rugosa</i> (comercial)	45	57	66	70	65	73	74	74	56

Tabela 2.4. Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido butírico por lipases de diferentes fontes após 4 horas de incubação

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação								
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Iso propanol	Iso butanol	Isoamílico	Óleo fúsel	Citronelol
<i>Geotrichum sp</i>	44	49	57	48	57	48	49	60	78
<i>Alcaligenes sp</i>	38	40	54	60	54	60	57	62	78
<i>Aspergillus sp lb-1068</i>	47	51	57	65	57	65	71	71	78
<i>Aspergillus sp lb-1099</i>	43	56	56	56	56	56	5	65	78
<i>Rhizopus sp</i>	38	31	60	67	60	60	95	65	73
<i>Candida rugosa</i> (comercial)	35	56	51	60	51	60	91	60	73

Tabela 2.5. Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido butírico por lipases de diferentes fontes após 8 horas de incubação

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação								
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Iso propanol	Iso butanol	Isoamílico	Óleo fúsel	Citronelol
<i>Geotrichum sp</i>	43	21	62	66	62	66	62	62	75
<i>Alcaligenes sp</i>	33	47	52	64	52	64	58	65	71
<i>Aspergillus sp lb-1068</i>	44	50	56	39	56	39	69	69	75
<i>Aspergillus sp lb-1099</i>	38	53	54	56	54	56	65	65	75
<i>Rhizopus sp</i>	38	38	56	65	56	65	95	65	74
<i>Candida rugosa</i> (comercial)	38	56	56	65	56	65	91	65	74

Tabela 2.6. Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido butírico por lipases de diferentes fontes após 24 horas de incubação

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação								
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Iso propanol	Iso butanol	Isoamílico	Óleo fúsel	Citronelol
<i>Geotrichum sp</i>	49	46	60	71	60	71	67	60	72
<i>Alcaligenes sp</i>	34	23	56	64	56	64	67	67	29
<i>Aspergillus sp lb-1068</i>	38	47	56	56	56	56	65	65	73
<i>Aspergillus sp lb-1099</i>	43	51	58	58	58	58	62	65	78
<i>Rhizopus sp</i>	38	53	51	64	51	64	95	66	79
<i>Candida rugosa</i> (comercial)	38	52	65	65	65	65	93	65	75

Tabela 2.7. Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido propiônico por lipases de diferentes fontes após 4 horas de incubação

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação								
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Iso propanol	Iso butanol	Isoamílico	Óleo fúsel	Citronelol
<i>Geotrichum sp</i>	40	53	57	56	58	56	65	67	50
<i>Alcaligenes sp</i>	41	49	58	61	58	65	69	67	50
<i>Aspergillus sp lb-1068</i>	44	54	58	63	58	63	70	65	50
<i>Aspergillus sp lb-1099</i>	41	45	63	65	65	63	67	68	53
<i>Rhizopus sp</i>	50	56	63	68	68	63	70	67	55
<i>Candida rugosa</i> (comercial)	41	52	63	65	62	65	64	67	53

Tabela 2.8. Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido propiônico por lipases de diferentes fontes após 8 horas de incubação

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação								
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Iso propanol	Iso butanol	Isoamílico	Óleo fúsel	Citronelol
<i>Geotrichum sp</i>	44	54	60	63	57	61	64	67	58
<i>Alcaligenes sp</i>	37	52	60	61	62	60	66	70	53
<i>Aspergillus sp lb-1068</i>	41	54	58	67	58	67	70	66	53
<i>Aspergillus sp lb-1099</i>	47	50	60	65	69	66	67	69	64
<i>Rhizopus sp</i>	46	59	69	67	67	67	71	70	50
<i>Candida rugosa</i> (comercial)	41	54	58	65	60	65	67	67	51

Tabela 2.9. Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido propiônico por lipases de diferentes fontes após 24 horas de incubação

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação								
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Iso propanol	Iso butanol	Isoamílico	Óleo fúsel	Citronelol
<i>Geotrichum sp</i>	46	52	61	65	60	65	70	68	58
<i>Alcaligenes sp</i>	48	55	58	66	59	66	66	68	51
<i>Aspergillus sp lb-1068</i>	43	52	65	59	65	59	69	54	51
<i>Aspergillus sp lb-1099</i>	47	53	63	63	61	64	65	66	58
<i>Rhizopus sp</i>	52	59	63	69	64	68	72	70	53
<i>Candida rugosa</i> (comercial)	52	48	55	64	56	64	67	65	41

Tabela 2.10. Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido láurico por lipases de diferentes fontes após 4 horas de incubação

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação								
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Iso propanol	Iso butanol	Isoamílico	Óleo fúsel	Citronelol
<i>Geotrichum sp</i>	5	17	10	30	26	31	40	51	79
<i>Alcaligenes sp</i>	30	26	40	40	40	40	49	57	69
<i>Aspergillus sp lb-1068</i>	26	40	34	40	40	41	46	57	74
<i>Aspergillus sp lb-1099</i>	24	30	51	48	37	35	27	60	79
<i>Rhizopus sp</i>	6	0	40	60	60	40	51	64	79
<i>Candida rugosa</i> (comercial)	26	33	38	46	43	46	52	64	70

Tabela 2.11. Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido láurico por lipases de diferentes fontes após 8 horas de incubação

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação								
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Iso propanol	Iso butanol	Isoamílico	Óleo fúsel	Citronelol
<i>Geotrichum sp</i>	5	23	10	30	20	38	49	55	72
<i>Alcaligenes sp</i>	28	26	40	40	40	43	44	62	72
<i>Aspergillus sp lb-1068</i>	30	30	40	45	40	35	43	55	69
<i>Aspergillus sp lb-1099</i>	28	37	40	53	40	47	47	57	72
<i>Rhizopus sp</i>	6	0	39	60	39	60	66	66	84
<i>Candida rugosa</i> (comercial)	30	33	40	40	38	49	56	60	75

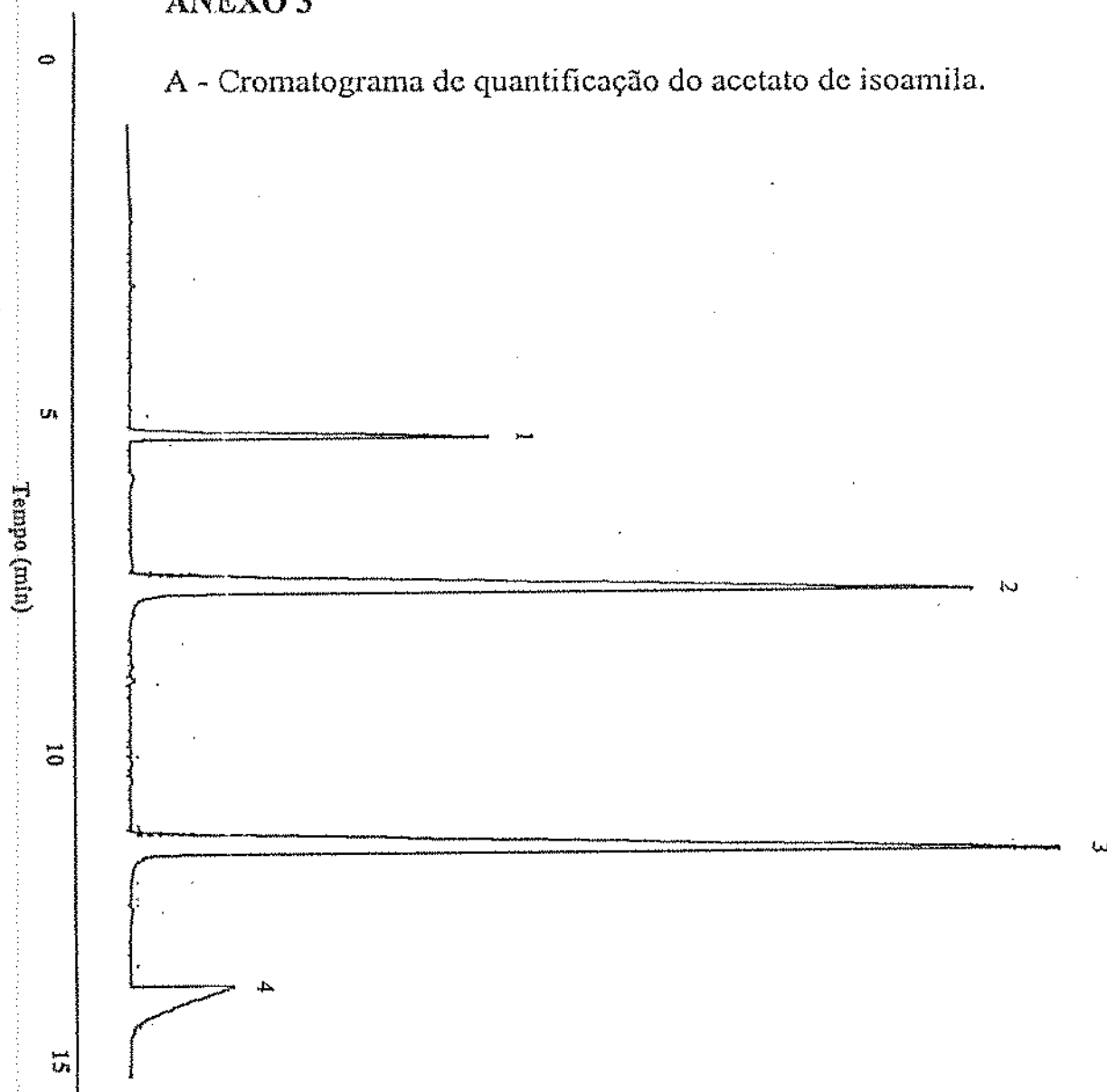
Tabela 2.12. Porcentagem de esterificação de diversos álcoois com ácido láurico por lipases de diferentes fontes após 24 horas de incubação

Fonte de lipase	Porcentagem de esterificação								
	Metanol	Etanol	Propanol	Butanol	Iso propanol	Iso butanol	Isoamílico	Óleo fúsel	Citronelol
<i>Geotrichum sp</i>	20	29	34	44	36	46	40	55	60
<i>Alcaligenes sp</i>	22	26	45	35	40	36	46	61	69
<i>Aspergillus sp lb-1068</i>	30	30	37	42	40	50	43	61	69
<i>Aspergillus sp lb-1099</i>	18	30	40	43	49	47	48	59	69
<i>Rhizopus sp</i>	11	29	22	82	23	82	88	61	92
<i>Candida rugosa</i> (comercial)	28	31	40	72	40	54	63	60	87

ANEXO 3 - Ilustração dos cromatogramas de quantificação e identificação dos ésteres acetato, propionato e butirato

ANEXO 3

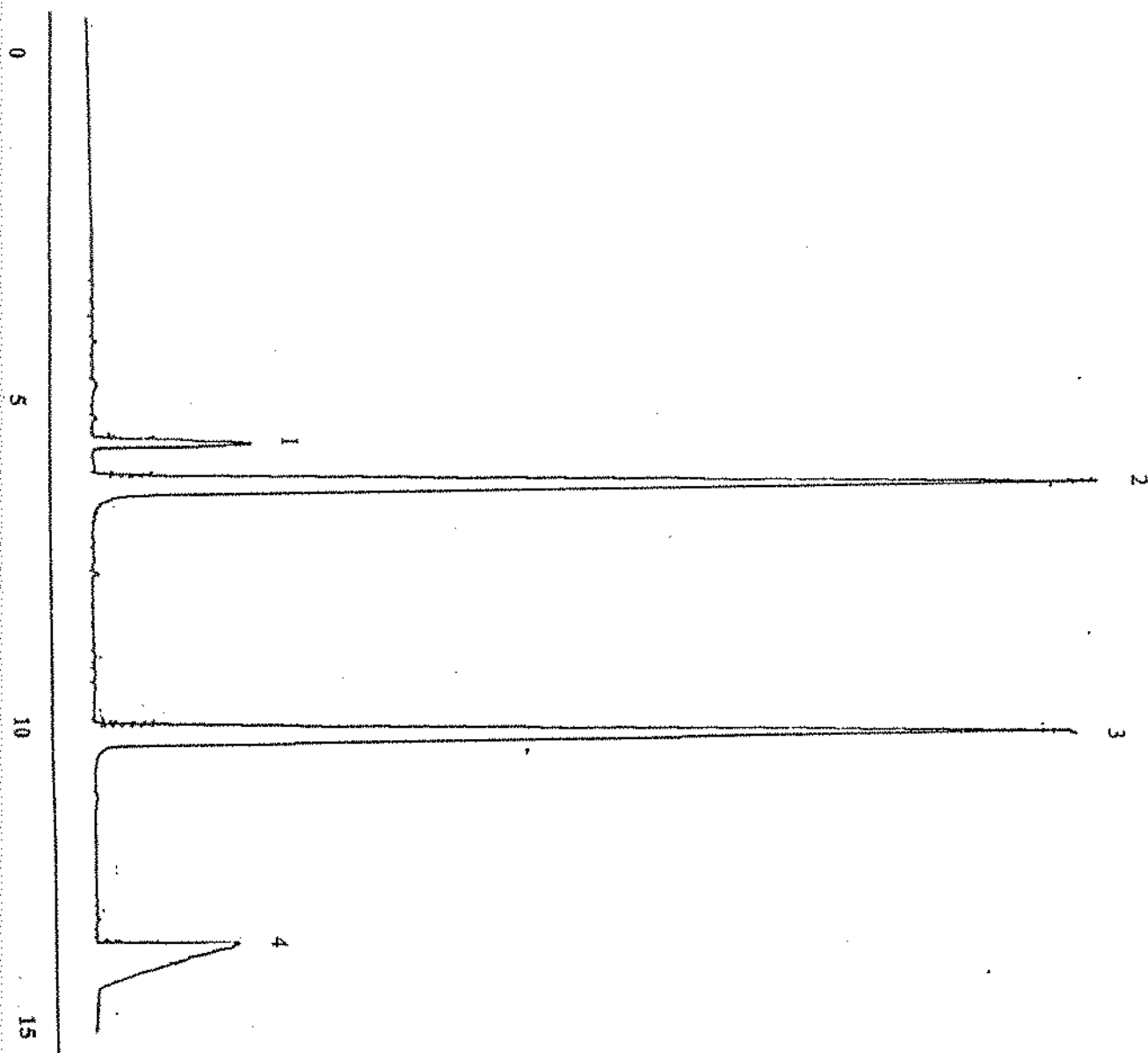
A - Cromatograma de quantificação do acetato de isoamila.



Pico	Tempo de retenção (min)	Composto
1	5.292	Acetato de isoamila
2	7.438	Álcool isoamílico
3	11.375	Hexanol (PI)
4	13.555	Ácido acético

ANEXO 3

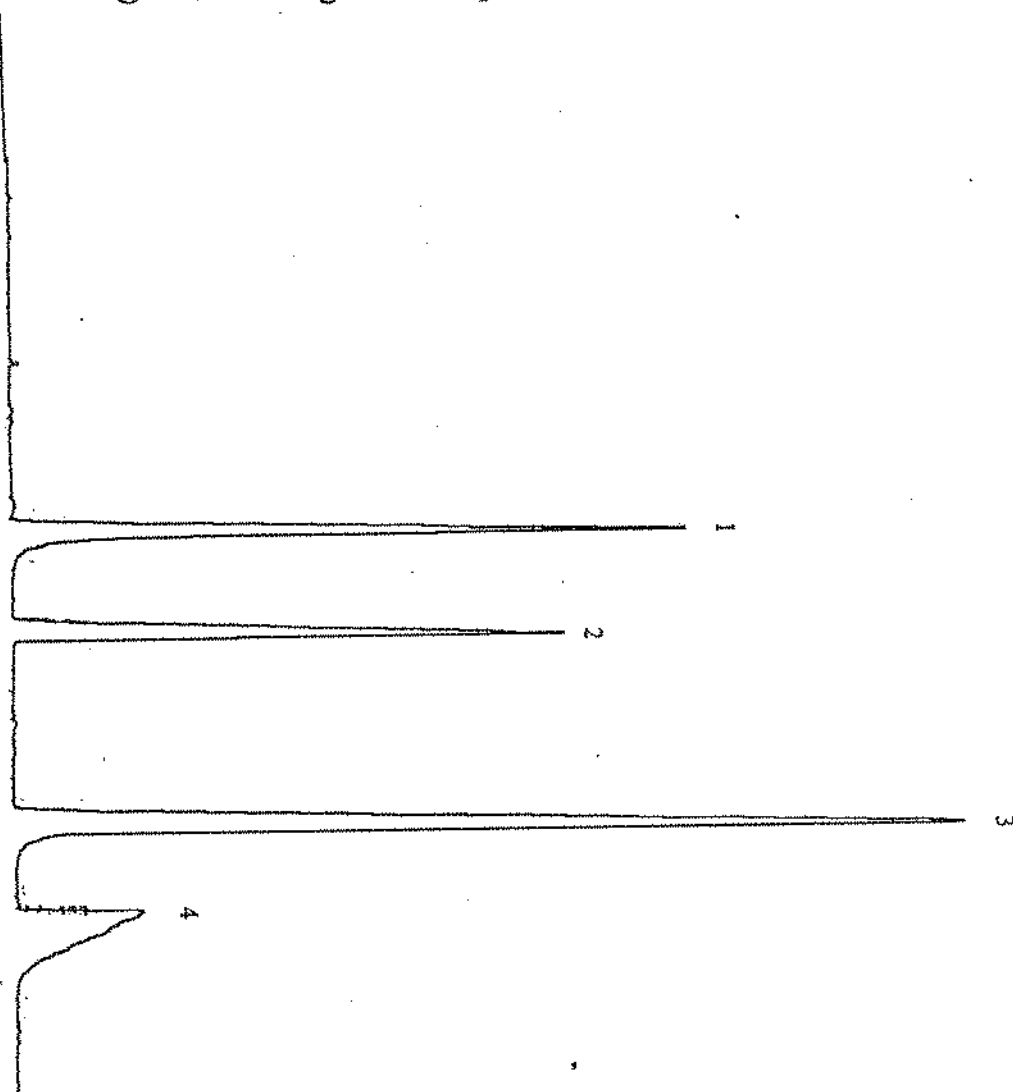
B Cromatograma de quantificação do propionato de isoamila.



Pico	Tempo de retenção (min)	Composto
1	6.776	Propionato de isoamila
2	7.438	Álcool isoamílico
3	11.375	Hexanol (PI)
4	14.585	Ácido propiônico

ANEXO 3

C - Cromatograma de quantificação do butirato de isoamila.



Pico	Tempo de retenção (min)	Composto
1	7.438	Álcool isoamílico
2	8.820	Butirato de isoamila
3	11.375	Hexanol (PI)
4	12.462	Ácido butírico