# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Área de concentração: desenvolvimento de processos biotecnológicos

# ESTUDO DA SÍNTESE E HIDRÓLISE DE ACETATO DE ETILA EM FASE GASOSA CATALISADA POR ENZIMAS SUPORTADAS

Victor Haber Pérez, M.Sc. Autor

Prof. Dr. Everson Alves Miranda Orientador

Prof. Dr. Gustavo Paim Valença Co-orientador

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

> Campinas - SP Agosto/2002

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
Nº CHAMADA TTUNICATTP
H1132
V San
10MB0 80/ 9703
CT DIXI
PRECO RS 11,00
DATA
Nº CPD

CM00179790-3

## BIB 19 279783

## FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

<b>HME</b> H113e	<ul> <li>Haber Pérez, Victor</li> <li>Estudo da síntese e hidrólise de acetato de etila em</li> <li>fase gasosa catalisada por enzimas suportadas / Victor</li> <li>Haber PérezCampinas, SP: [s.n.], 2002.</li> </ul>
	Orientadores: Everson Alves Miranda e Gustavo Paim Valença. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.
	1. Hidrolise. 2. Enzimas imobilizadas. 3. Lípase. 4. Cinética de enzimas. I. Miranda, Everson Alves. II. Valença, Gustavo Paim. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

### **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: desenvolvimento de processos biotecnológicos

## ESTUDO DA SÍNTESE E HIDRÓLISE DE ACETATO DE ETILA EM FASE GASOSA CATALISADA POR ENZIMAS SUPORTADAS

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Paim Valença

Prof. Dr. Everson Alves Miranda Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP

Embel

Prof. Dr. Gustavo Paím Valença Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP

Prof. Dr. Renato Sprung Faculdade de Engenharia Química(UNICAMP

/ Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP

Heigh Fall 6310 Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL)

Esta versão corresponde à redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Victor Haber Pérez, M.S., e aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de Agosto de 2002.

risud

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

#### AGRADECIMENTOS

A culminação deste trabalho está indissoluvelmente ligada ao apoio e ajuda de muitas pessoas, às quais estarei eternamente agradecido. Assim sendo, gostaria de agradecer:

A mi madre, mi padre, mis hermanos queridos y toda mi família por sus grandes estímulos y apoyo en todos los momentos, a pesar de la separación de estos años. A mi querida Oselys por ser uno de los más grandes incentivos de mi vida, por su amor, cariño, estímulo y por la ayuda de siempre. A mis queridos hijos, especialmente a Vitico que ha pasado todos estos años lejos de mi, sabe Dios por qué?, pero por ser ellos el sentido de mi vida les doy las gracias por todo su amor. Junto a ellos mi inmensa gratitud a mi querido amigo y profesor Dr. Meinardo Boizan Justis. Muchas gracias.

Especialmente a meu orientador e professor, o Dr. Everson Alves Miranda, pela aceitação e ajuda nos momentos de dificuldades e particularmente pela orientação do trabalho durante estes anos. Obrigado por ter colocado nas minhas mãos um assunto tão interessante. Muito obrigado.

Também quero agradecer de uma maneira muito especial ao professor Dr. Gustavo Paim Valença, o qual mais que um coorientador envolveu-se diretamente no projeto com grande disposição e dando toda a ajuda científica durante o trabalho, permitindo o uso do seu Laboratório LEPAC para o desenvolvimento da pesquisa. Muito obrigado.

A todos os professores do departamento Processos Biotecnológicos, especialmente á professora Dra. Maria Helena Santana que vem acompanhando nosso trabalho desde o início, pelas discussões e sugestões científicas sempre oportunas durante o exame de qualificação.

A todos meus colegas de Pós-Graduação do Departamento de Processos Biotecnológicos e de Processos Químicos que de alguma forma contribuíram para o melhor desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria de agradecer especialmente à FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e o apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

Enfim, a todos os que me acompanharam e foram parte deste processo. Muito obrigado.

i

#### RESUMO

## Perez, V. H. ESTUDO DA SÍNTESE E HIDRÓLISE DE ACETATO DE ETILA EM FASE GASOSA CATALISADA POR ENZIMAS SUPORTADAS. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

A conversão enzimática de substratos gasosos constitui um avanço recente na engenharia de bioprocessos. Estes sistemas apresentam importantes vantagens quando comparados com os sistemas líquidos (aquosos ou em fase orgânica), as quais incluem condições de transferência de massa mais favoráveis, possibilidade de reciclo do biocatalisador e uma recuperação mais simples dos produtos, entre outras. Algumas das aplicações potencias da biocatálise em fase gasosa incluem a destoxificação de correntes gasosas, o desenvolvimento de biossensores e a síntese de diversos produtos orgânicos incluindo fármacos, fragrâncias e aromas para a indústria de cosméticos e de alimentos.

Este trabalho apresenta, os resultados experimentais do estudo cinético da reação de esterificação e hidrólise de acetato de etila em fase gasosa catalisada por dois biocatalisadores: a) Lipase PS (Amano, Japão) imobilizada em suportes de óxidos puros e mistos de Si/Mg com tamanhos de poros controlados e b) Lipozyme IM (Novo Nordisk, Dinamarca). O sistema experimental, operando continuamente em regime diferencial, é constituído por três blocos: 1) bloco de preparação dos substratos, onde é usado He como gás de arraste que gera correntes gasosas em equilíbrio com as fases líquidas; 2) bloco de reação, formado por um reator tubular de vidro; e 3) bloco de aquisição de dados, constituído por um cromatógrafo a gás e um computador, conectados em linha.

Variações na quantidade de biocatalisador não mostraram a existência de limitações por transferência de massa para as mesmas condições de reação. Desta forma, a cinética da reação foi estudada em função da concentração de acetato de etila e do teor de água no sistema, mantendose constante a temperatura de reação a 45°C, sendo que o teor de água no sistema mostrou ser um parâmetro importante no processo, conforme relatado na literatura. Foi proposto um mecanismo de reação, cuja equação da taxa avaliada em função da temperatura, para este sistema Bi-Bi, permitiu estimar a energia de ativação como sendo 24,8 kJ/kmol. A ordem de reação global caracterizada como de primeira ordem mostrou uma dependência de primeira ordem em relação às concentrações dos substratos. Finalmente, são discutidos os resultados do efeito do comprimento das cadeias do substrato sobre o desempenho da reação a partir da hidrólise do acetato de etila e butila.

Palavras-chave: biocatálise, hidrólise enzimática, enzimas suportadas, lipases, biorreator

## ABSTRACT

## Perez, V. H. ESTUDO DA SÍNTESE E HIDRÓLISE DE ACETATO DE ETILA EM FASE GASOSA CATALISADA POR ENZIMAS SUPORTADAS. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

Enzymes supported in a solid phase catalyzing reactions with substrates and products in gaseous phase constitute a recent progress in the biotechnology. It has technological applications that include: toxic gas remediation, biosensors and synthesis of pharmaceutical, fragrances and aromas for the food industry and cosmetics.

This work presents, the experimental results of the kinetic study of the esterification and hydrolysis reactions of ethyl acetate in gaseous phase catalyzed by two biocatalysts: the) Lipase PS (Amano, Japan) immobilized in supports of pure and mixed oxides of Si/Mg with controlled pore and b) Lipozyme IM (Novo Nordisk, Denmark). The experimental system is formed by three blocks: the first is responsible for the preparation of the substrates in gaseous phase, considering that a carrier gas, after bubbling in a substrate, is in equilibrium with the liquid phase, and so the partial pressure of the substrate in the gas leaving the saturation flask is equal to the vapor pressure corresponding to the bubble point pressure above the pure compound. The second is the reaction block and the last block is formed by the gas chromatography and acquisition of data systems on-line connected.

Variations in the amount of biocatalyst did not show the existence of limitations for mass transfer for the same reaction conditions. This way, the reaction kinetics was studied as a function of the ethyl acetate and water concentration with a constant reaction temperature of the 45°C. The water showed to be an important parameter in the process, as reported in the literature. A reaction mechanism Bi-Bi was proposed. The activation energy as being 24,8 kJ/kmol was calculated. The order of global reaction (determined as 1) showed a dependence of first order in relation to the substrate concentrations. Finally, the results of the effect of the length of the chains of the substrate in the hydrolysis reactions of the ethyl and butyl acetate are discussed.

Key-words: biocatalysis, enzymatic hydrolysis, supported enzymes, lipases, bioreactor

## ÍNDICE

## Página

CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO	beauer
CAPÍTULO II	7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LIPASES	7
2.2 CATÁLISE ENZIMÁTICA EM FASE GASOSA	10
2.2.1 Efeito da atividade da água sobre a estabilidade e atividade enzimática	10
2.2.2 Efeito do suporte sobre a atividade enzimática	16
2.2.3 Efeito da polaridade da fase gasosa e do substrato sobre a atividade catalítica	18
2.3 Conclusões da revisão bibliográfica	20
CAPÍTULO III	23
MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 BIOCATALISADORES COM TAMANHO DE PORO CONTROLADO	23
3.1.1 Preparação dos suportes	23
3.1.2 Caracterização dos suportes	26
3.1.2.1 Determinação do ponto úmido dos suportes	26
3.1.2.2 Difração de raios-X	26
3.1.2.3 Adsorção de nitrogênio	26
3.1.2.4 Quimissorção de CO <sub>2</sub>	27
3.1.3 Lipases utilizadas: características fundamentais	27
3.1.4 CARACTERIZAÇÃO DE LÍPASES	29
3.1.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	29
3.1.4.2 Determinação da concentração de proteínas	29
3.1.4.3 Determinação da atividade enzimática	29

3.1.5 Imobilização das Lípases nos suportes	
3.2 BIOCATALISADOR COMERCIAL: CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTAIS	
3.2.1 Caracterização do biocatalisador Lipozyme IM	
3.2.1.1 Adsorção de nitrogênio	
3.2.1.2 Análise termogravimétrica (TGA)	
3.2.2 Condições de pré-tratamento do biocatalisador	
3.3 SISTEMA EXPERIMENTAL DE REAÇÃO	
3.4 MONITORAMENTO DA REAÇÃO	
3.5 PROCEDIMENTO DE CÁLCULO DA VELOCIDADE DE REAÇÃO	
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SÓLIDOS USADOS COMO SUPORTES	
4.1.1 Determinação do ponto úmido	
4.1.2 Difração de raio-X	
4.1.3 Adsorção de nitrogênio	44
4.1.4 Quimiosorção de CO <sub>2</sub>	46
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOCATALISADORES	46
4.2.1 Caracterização das enzimas livres	47
4.2.1.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das lipases	
4.2.1.2 Determinação da atividade enzimática específica	
4.2.2 Caracterização do biocatalisador comercial: Lipozyme IM	
4.2.2.1 Adsorção de nitrogênio	50
4.2.2.2 Análise de estabilidade térmica	
4.3 REAÇÕES ENZIMÁTICAS EM FASE GASOSA	51
4.3.1 Reações de esterificação	51
4.3.1.1 Reações de esterificação com lipase PS livre	
4.3.1.2 Reações de esterificação com Lipase PS imobilizada	53

4.3.2 Reações de hidrólise	
4.3.2.2 Estudo das limitações difusionais externas	60
4.3.2.3 Estudo da possibilidade de reutilização do catalisador Lipozyme IM	
4.3.2.4 Efeito da concentração dos substratos sobre a taxa de reação	
4.3.2.5 Efeito da temperatura sobre a taxa de reação	76
4.3.2.6 Cinética enzimática e mecanismo de reação	80
4.3.2.7 Estudo do efeito do comprimento da cadeia do substrato	
CAPÍTULO V	
5.1 CONCLUSÕES	
5.2 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	90
CAPÍTULO VI	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS	

· •

## CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

Enzimas têm sido utilizadas como catalisadores, tradicionalmente, em fase aquosa. Contudo, estes sistemas apresentam sérias limitações tais como carência de estabilidade e insolubilidade de alguns substratos e produtos, inibição pelo produto e, às vezes, problemas de estabilidade operacional (YANG e RUSELL, 1996b). O uso de enzimas em solventes orgânicos pode resolver alguns destes problemas, pois este sistema catalítico apresenta, dentre outras, as seguintes vantagens quando comparado com o sistema aquoso: alta solubilidade de muitos compostos em solventes orgânicos, maior termoestabilidade da enzima e a eliminação da possibilidade de contaminação microbiana no sistema (DORDICK, 1989 e LAANE et al., 1987). Apesar destas vantagens, no inicio o uso desta tecnologia não atraiu a devida atenção devido à possível perda de atividade dos biocatalisadores quando expostos a ambientes hidrofóbicos orgânicos. Na década de 80, estudos sobre enzimas em solventes orgânicos mostraram que a presença de uma pequena quantidade de água no sistema reacional possibilitava, e em muitos casos era suficiente para garantir a manutenção da atividade enzimática em níveis comparáveis àqueles de enzimas em sistemas aquosos. Além disso, mostrou-se que enzimas em solventes orgânicos têm atividade catalítica diferente daquelas obtidas em sistemas aquosos (ZAKS e KLIBANOV, 1985).

Diversas aplicações utilizam sistemas catalíticos em solventes orgânicos, sendo esta tecnologia considerada como já estabelecida (KAZANDJIAN *et al.*, 1986; NAGAMOTO *et al.*, 1986). No entanto, sistemas enzimáticos em solventes orgânicos também apresentam limitações devido à desnaturação da enzima, formação de subprodutos a partir do solvente, necessidade de recuperação e descarte de solventes, dificuldade de separação e recuperação dos produtos finais e a necessidade de altas concentrações de enzimas nos sistemas reacionais (YANG e RUSELL, 1996b e CLAON e AKOH, 1994). Estas desvantagens limitam uma maior expansão do uso desta tecnologia.

A fines da década de 70 observou-se um avanço na catálise enzimática referente ao uso de sistemas sólido-gás, no qual os substratos gasosos eram transformados por um biocatalisador, em fase sólida, em produtos também gasosos. Este biocatalisador pode ser uma célula microbiana não viável ou uma enzimas, ou ambas na forma livre ou imobilizada. Segundo BÁRZANA (1996), os estudos pioneiros neste campo foram os de YAGI *et al.* (1969) os quais mostraram que enzimas secas possuíam atividade catalítica para substratos em fase gasosa. No entanto, apenas recentemente é que se tem revisitado este tema vislumbrando uma gama de aplicações baseadas nas seguintes vantagens (LAMARE e LEGOY, 1995):

- 1. Imobilização covalente da enzima pode ser evitada uma vez que a enzima não tem condições de abandonar o suporte dissolvendo-se na fase que o envolve.
- 2. A presença do biocatalisador em uma fase sólida permite o seu reciclo. Assim, o reator contendo estes catalisadores pode ser operado em batelada ou continuamente.
- Sendo os substratos voláteis, a presença de solventes é evitada. Desta forma, a geração de subprodutos por eventuais reações envolvendo solventes é limitada.

- Baixas viscosidades e altos valores de coeficientes de difusão fazem com que as reações sejam menos susceptíveis a limitações por transferência de massa.
- 5. A uniformidade do sistema é uma vantagem no entendimento e operação destes sistemas quando comparados aos sistemas líquidos multifásicos convencionais.
- 6. A volatilidade dos produtos simplifica uma das etapas mais caras nos processos biotecnológicos: a recuperação, separação e purificação de produtos. Os produtos podem ser fracionados por simples condensação através de ajuste de temperatura.
- Enzimas desidratadas e em forma sólida têm maior estabilidade do que quando em solução (aquosa ou não) ou quando imobilizada em contato com fase líquida.
- O controle da atividade de água possibilita obter reações não convencionais em sistemas gasosos (como por exemplo, reações de síntese ou transferência usando hidrolases).

Contudo, a grande desvantagem da biocatálise em fase gasosa é que a maioria dos substratos requeridos para este sistema reacional apresentam pontos de ebulição mais elevados que 523-573 K à pressão normal (PAIVA e MALCATA, 1997), o que dificulta a obtenção de substratos adequados para diversificar as aplicações desta tecnologia.

A maioria dos trabalhos de biocatálise desenvolvidos em fase gasosa tem utilizado enzimas isoladas, ou seja, sistemas uni-enzimáticos (BARZANA *et al.*, 1987, 1989; HWANG *et al.*, 1994; HWANG e PARK, 1994; PARVARESH *et al.*, 1992, LAMARE e LEGOY, 1993, 1995, 1997; RUSSELL e YANG, 1996; YANG e RUSSELL, 1996a, 1996b), porem há um trabalho que reporta o uso de dois enzimas combinados em biocatálise em fase gasosa (KIM e RHEE, 1992). Contudo a capacidade dos microorganismos, neste caso células não viáveis

(sistemas multi-enzimáticos), de catalisar reações em fase gasosa tem sido também reportada por diversos pesquisadores (HOU, 1984; HAMSTRA *et al.*, 1987; UCHIYAMA *et al.*, 1992; MAUGAR *et al.*, 2001).

Algumas das aplicações tecnológicas potenciais da biocatálise em fase gasosa incluem a destoxificação de correntes gasosas (tais como "nerve gas", RUSSELL e YANG, 1996), o desenvolvimento de biossensores e a síntese de diversos produtos orgânicos incluindo produtos farmacêuticos, fragrâncias usadas em perfumaria e aromas para a indústria de alimentos.

A biocatálise em fase gasosa apesar de ser um tema de interesse recente e potenciais aplicações, como dito anteriormente, e seu estudo ter sido iniciado na década de sessenta, pouco tem sido publicado nesta área de conhecimento. Ao mesmo tempo a maioria dos trabalhos publicados tem centrado seus estudos em como acontece a interação água-enzima e qual é a influencia da água na atividade e estabilidade desta. Neste contexto, alguns trabalhos merecem destaque, tal é caso de YANG e RUSSELL (1996a, 1996b) e LAMARE e LEGOY (1995). No entanto, ainda existe preocupação de como a presença do substrato afeta o grau de hidratação da enzima e como isto pode influenciar a atividade catalítica. Esta preocupação ainda vai um pouco mais longe, pois, apesar dos estudos realizados, não está claro como acontece a biocatálise em fase gasosa e se estes mecanismos de interação podem ser descritos como tradicionalmente abordado para sistemas em fase aquosa. Outros aspectos de importância como são a interação enzima-substrato com o suporte (no caso de enzimas imobilizadas) não só em relação a suas propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas como também em relação a seu caráter ácido-básico sequer têm sido estudadas. Além disso, as enzimas e reações utilizadas nestes estudos foram na maioria selecionadas como modelos, havendo pouca preocupação de realizar trabalhos de

modelagem matemática e simulação destes sistemas, bem como de desenvolvimento de processos industriais específicos.

A biocatálise em fase gasosa é uma área promissora, mas ainda há uma necessidade de continuar e aprofundar os estudos das pesquisas existentes e por sua vez iniciar o estudo não só de novas variáveis de processo, como também de outros biocatalisadores e sistemas reacionais. Desta forma, este trabalho teve por objetivo estudar as principais variáveis (efeito de diferentes suportes, atividade de água, temperatura e tipo de substrato) na cinética de reações de síntese e hidrólise de acetato de etila em fase gasosa catalisada por lipases suportadas, de acordo com as seguintes etapas:

- Preparação de suportes com porosidade controlada de óxidos mistos de magnésio e silício (MgO/SiO<sub>2</sub>).
- 2- Seleção de lípases de diversas fontes.
- 3- Imobilização destas lípases e/ou uso de enzimas comercias imobilizadas.
- 4- Aplicação destes biocatalisadores em reações modelo de síntese e hidrólise de actetato de etila em fase gasosa.

Foram encontradas algumas publicações referentes à reação de síntese de acetato de etila em fase gasosa catalisada por enzimas (HWANG e PARK, 1994, 1997 e BARTON *et al.*, 1997). Mas a hidrólise de acetato de etila em fase gasosa e catalisada por lípase não tem sido encontrada na literatura consultada (incluindo bases de dados, bibliotecas eletrônicas e diversos periódicos especializados). Por outro lado, a simplicidade destas reações nos permitiu selecioná-las como modelos. Contudo, a reação de hidrólise impôs um grau de complexidade maior quando

comparada com a reação de síntese, pois, nesta a água além de ser necessária para manter a conformação catalítica da enzima também participava na reação.

Inicialmente foi estudada a preparação de biocatalisadores com tamanhos de poros controlados. Assim a síntese de suportes inorgânicos de óxidos mistos e puros de Si e Mg foi realizada, bem como a caracterização de diversas lipases de origem microbiana com vistas a selecionar a mais promissora, para futura imobilização. Desta forma, uma enzima (lipase PS) foi selecionada e testes de reação foram realizados para avaliar seu desempenho, em forma livre e imobilizada, usando como reação modelo a esterificação de acetato de etila em fase gasosa. Apesar de ter-se obtido resultados satisfatórios, surgiram problemas que acabaram mudando o curso da pesquisa e que nos levaram a mudar a reação modelo de esterificação para uma reação de hidrólise de acetato de etila e selecionar um novo catalisador (Lipozyme IM), uma enzima da Novo Nordisk, a qual possuíamos em quantidades suficientes para o desenvolvimento do trabalho.

## CAPÍTULO II

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Nesta seção, serão abordados alguns resultados importantes sobre as lipases, suportes, tipos de reações estudadas, parâmetros operacionais e características gerais dos sistemas biocatalíticos em fase gasosa reportadas na literatura.

### 2.1 Considerações gerais sobre lipases

Lipases pertencem ao grupo da serina hidrolases (E.C. 3.1.1.3), cujo modo de ação está relacionado às suas propriedades de atuar na interface óleo/água, sendo os triglicerídeos seus substratos naturais (BORGSTON e BROCKMAN, 1984). A massa molecular das lipases varia entre 20 a 200 kDa podendo ter origem microbiana, animal ou vegetal. Basicamente são ativadas na interface óleo/água ligando-se ao substrato e à água com suas porções hidrofóbica e hidrofílica, respectivamente (SARDA e DESNUELLE, 1958).

As lipases exibem uma característica comum de modelo dobradiço conhecido como dobra  $\alpha/\beta$  hidrolase (JAEGER e REETZ, 1998; KIM *et al.*, 1997). O núcleo central das lipases é constituído por uma folha planar  $\beta$  formada por 6 cadeias  $\beta$  (diferentes) paralelas ( $\beta_1$ - $\beta_6$ ) conectadas a 6 hélices  $\alpha$ , duas nos extremos ( $\alpha_1 e \alpha_{11}$ ) e outras quatro ( $\alpha_2, \alpha_3, \alpha_7 e \alpha_{10}$ ) entre elas. O sítio ativo por sua vez é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico ou glutâmico e histidina, sendo que o resíduo nucleofílico serina encontrase no final no final da cadeia  $\beta_5$  formando uma espécie de  $\beta$ -cotovelo- $\alpha$  conhecido como cotovelo nucleofilico (Figura 1).

A hidrólise do substrato inicia com o ataque nucleofilico do sítio catalítico sobre o átomo carbono carbonílico do éster levando à formação de um intermediário tetraédrico estabilizado por pontes de hidrogênio com os átomos de nitrogênio dos resíduos da cadeia principal. Posteriormente, o álcool é liberado levando a formação de um complexo acila-lipase, o qual é finalmente hidrolisado com a liberação do ácido graxo e a regeneração da enzima.



**Figura 1**. Estrutura da lípase de *Pseudomonas cepacia* (SCHRAG *et al.*, 1997). Cadeias  $\beta$  representadas em verde e  $\alpha$  hélices em azul, sendo a posição do íon cálcio Ca<sup>2+</sup>representado por uma esfera amarela e o centro ativo (Ser 87, His 286 e Asp 264) em vermelho.

Processos catalisados por lipases se tornam mais atraentes do que os processos químicos convencionais devido à estereoespecificidade (capacidade das lipases em discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica), regioseletividade (capacidade de discriminar grupos funcionais iguais em uma molécula) e baixo consumo de energia (HIRANO, 1986).

As lipases, apesar de serem caracterizadas por romper as ligações de ésteres de triglicerídeos com o consequente consumo de água (hidrólise), podem catalisar diversos tipos de reações (LORTIE, 1997 e BALCÃO *et al.*, 1996) como apresentado na Figura 2.



Figura 2. Representação esquemática de reações catalisadas por lipases (BALCÃO *et al.*, 1996).
1) Hidrólise, 2) Esterificação, Transesterificação: 1+2) Alcoólise, 1+3) Acidólise e 1+2+3+4) Interesterificação.

As lipases são ativas entre pH 4 e 9 e entre temperaturas de 303 K e 343 K. No entanto, estes biocatalisadores, como qualquer enzima, podem sofrer desnaturação devido às temperaturas elevadas utilizadas para aumentar a produtividade dos sistemas e prevenir a contaminação microbiana e a utilização de valores de pH diferentes daquele no qual enzimas têm estabilidade máxima.

#### 2.2 Catálise enzimática em fase gasosa

A maioria dos estudos publicados até o momento sobre reações enzimáticas em fase gasosa abordam a influência da água sobre a estabilidade e a atividade enzimática. Dentre as enzimas usadas nestes sistemas encontram-se as lipases, as álcool desidrogenases, as cutinases e a subtilisina Carlsberg. Por sua vez, as reações estudadas foram basicamente de apenas três tipos: esterificações, transesterificações e oxidação de álcoois em aldeídos. Foram utilizadas faixas de temperatura desde 300 até 345 K, havendo uma menção de um trabalho realizado em 370 K. Ambos os métodos operacionais, batelada e contínuo, foram empregados. A Tabela 1 apresenta de forma resumida alguns sistemas enzimáticos estudados em fase gasosa.

#### 2.2.1 Efeito da atividade da água sobre a estabilidade e atividade enzimática

A água tem um efeito duplo nas reações catalisadas por enzimas: preserva a conformação catalítica da enzima e participa do seu processo de inativação, especificamente na termoinativação (PARVARESH *et al.*, 1992). HALLING (1994) reportou aspectos necessários para estudar a influência da água em meios catalíticos não convencionais, particularmente a necessidade de se caracterizar a disponibilidade da água no sistema através do parâmetro termodinâmico atividade da água, o qual pode ser definido como:

REAÇÃO	ENZIMA	CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS	REFERÊNCIA
Oxidação de etanol a acetaldeído	Álcool oxidase	Reator de leito fixo. Enzima imobilizada.	HIDATA e MATSUMOTO, 2000
Produção de acetaldeido	Álcool oxidase	Sistema contínuo, reator de leito fixo, temperaturas de 298, 308, 318, 328 K, enzima imobilizada.	HWANG <i>et al.</i> , 1993 e 1994
Conversão de etanol a acetaldeido	Células de Hansemula polymorpha Álcool oxidase Catalase	Sistema contínuo, 308 K. Células e enzimas imobilizadas.	KIM e RHEE., 1992
Oxidação de etanol a acetaldeído	Álcool desidrogenase	Sistema em batelada, enzima imobilizada.	BARZANA et al., 1989
Produção de ésteres acetato e propionato de etila	Lipase pancreática porcina	Sistema fechado (reciclo contínuo) em batelada. Enzima imobilizada em lã de vidro.	BARTON et al., 1997
Síntese de acetato de etila (esterificação)	Lipase pancreática porcina	Sistema em batelada, a 298 e 373 K.	HWANG e PARK, 1994, 1997
Transesterificação e reações de hidrólise	Cutinase de Fusarium solani	Sistema contínuo. Enzima imobilizada, 333 K.	LAMARE e LEGOY, 1995
Transesterificação de metil e etil propionato	Lipase pancreática porcina Cutinase de Fusarium solani	Sistema contínuo, temperaturas de 338, 353, e 373 K. Enzima livre.	PARVARES et al., 1992
Produção de aldeídos	Álcool desidrogenase	Sistema contínuo. Reciclo de NAD, temperatura de 333 K.	<b>ROBERT</b> <i>et al.</i> , 1992

Tabela 1. Reações modelo biocatalíticas estudadas em fase gasosa.

$$a_{w} = \frac{P_{vH_{2}O}}{P_{vH_{2}Oref}} = \frac{UR}{100}$$
(1)

onde UR é a umidade relativa do ar, em % e  $P_v$  e  $P_{vref}$  são as pressões de vapor da água em equilibrio com o sistema usado (na temperatura de saturação) e a pressão de vapor da água à temperatura de referência (temperatura de reação), respectivamente.

Este critério é reforçado por LAMARE e LEGOY (1995) que demonstraram que a atividade de água, e não o conteúdo de água livre na fase gasosa, é o parâmetro relevante em tais sistemas uma vez que a ligação de moléculas de água às moléculas de proteína depende deste parâmetro termodinâmico.

A síntese de acetato de etila em fase gasosa usando lipase foi estudada por HWANG e PARK (1994, 1997), os quais observaram que com o incremento do teor de água na lipase, a taxa de reação do éster diminuía. Resultados similares foram observados durante a reação de transesterificação catalisada por lipase pancreática para atividades de água superiores a 0,29 (PARVARESH *et al.*, 1992) e também na oxidação de etanol em acetaldeído em que a concentração de acetaldeído aumentava com o aumento da temperatura de reação e com a diminuição do teor de água no biocatalisador (HIDATA e MITSUMOTO, 2000). Contudo, estes resultados vão ao encontro dos resultados obtidos por BARZANA *et al.* (1987), os quais sugerem um efeito contrário da água durante a reação de oxidação de etanol a acetaldeído.

A atividade da água afetou fortemente a estabilidade e a taxa de reação na síntese de acetaldeído em fase gasosa, usando álcool desidrogenase (BÁRZANA *et al.*, 1989). Um incremento na atividade da água resultou em um aumento na atividade catalítica da enzima enquanto a estabilidade desta diminuía consideravelmente (Figura 3). Os autores concluiram que

a formação de uma fase de etanol pré-adsorvida na superficie do suporte não é um pré-requisito para o desenvolvimento da reação, indicando a interação direta do etanol gasoso com a enzima.



Figura 3. Efeito da atividade da água sobre a atividade e termoestabilidade enzimática (BÁRZANA et al., 1989).

A adsorção de água em álcool desidrogenase na presença de substratos em fase gasosa com hidrofobicidades diferentes foi estudada por YANG e RUSSELL (1996a e 1996b). Foi constatada a presença de histerese nas isotermas de adsorção e os dados experimentais foram mais bem ajustados pelo modelo de multicamadas de Huttig, ao invés do modelo de Langmuir, tradicionalmente utilizado.

A conversão de etanol em acetaldeído em um biorreator gás-sólido contínuo foi estudada utilizando células de *Hansenula polymorpha* e álcool oxidase com catalase (KIM e RHEE, 1992).

Estes autores observaram que a estabilidade da enzima álcool oxidase no reator aumentava com a diminuição do teor de água. A estabilidade das células foi maior do que a de enzimas purificadas, sendo que o sistema se manteve estável por mais de um mês em 308 K com conversão completa de etanol a acetaldeído, enquanto o teor de umidade da enzima era mantido aproximadamente em 8%. Nesse mesmo ano, ROBERT et al. (1992) publicaram um estudo sobre o papel da água na biocatálise em fase gasosa. Eles estudaram o desempenho de álcool desidrogenase e de enzimas lipolíticas em um reator gás-sólido contínuo e em relação a estas últimas enzimas concluiram que a água tinha um efeito positivo na atividade inicial da enzima, mas comprometia a estabilidade desta, ou seja, tanto a atividade quanto a estabilidade de uma enzima são altamente dependentes do nível de hidratação inicial da enzima. Neste contexto, propuseram uma isoterma de adsorção de água (Figura 4) para enzima cutinase termoestável de Fusarium solani clonada em Eschericia coli e que pode ser usada como referência na análise de comportamento de outras enzimas lipolíticas. Os autores consideraram que valores de atividade de água menores que 0,2 corresponde à água ligada à estrutura da enzima, entre 0,2 e 0,7 corresponde à água na primeira camada de hidratação e acima de 0,7 corresponde à água livre que se envolve no processo de desnaturação da enzima.

Por outro lado, CONDORET *et al.* (1997) reportaram uma isoterma de atividade de água para a Lipozyme IM, uma lipase de *Mucor miehie* imobilizada em resina de troca aniônica, à temperatura de 303 e 313 K (Figura 5) e ajustaram uma equação polinomial para o teor de água no sólido (Cws) em função da atividade de água (aw) a qual é válida para aw <0,88:

$$C_{Ws} = 0.1718 a_W - 0.377 a_W^3 + 0.605 a_W^4$$
 (2)

onde C<sub>ws</sub> é expressado em gramas de água por grama de sólido.



Figura 4. Isoterma de adsorção de água na enzima cutinase de Fusarium solani (não imobilizada) (ROBERT et al., 1992).



Figura 5. Isoterma de adsorção de água em Lipozyme IM a 303 e 313 K tanto para valores ajustados como experimentais (CONDORET *et al.*, 1997).

Ao comparar as Figuras 4 e 5, pode-se observar que as duas apresentam comportamentos bem semelhantes. Contudo a maior inclinação da curva da Figura 5 pode ser devida à diferente natureza dos sólidos usados nestes experimentos, que como explicado acima, no primeiro caso trata-se de uma enzima livre e no segundo caso de um enzima imobilizada em uma resina de troca aniônica, suporte este altamente hidrofilico. A Figura 5 por se tratar de um dos biocatalisadores em estudo (Lipozyme IM), particularmente poderá nos ser útil posteriormente na análise do desempenho deste biocatalisador na reação de hidrólise de acetato de etila em fase gasosa.

#### 2.2.2 Efeito do suporte sobre a atividade enzimática

As enzimas podem ser usadas de duas formas em meios não convencionais: em solução ou como sólidos. As enzimas sólidas podem ser usadas como precipitados, ligadas a cristais ou imobilizadas (LORTIE, 1997). Nos sistemas que contém enzimas imobilizadas em suportes sólidos, o suporte tem uma influência significativa na atividade enzimática, podendo deslocar o equilíbrio da reação devido à interação deste com as moléculas de água. Em solventes orgânicos, lipases de *Mucor miehie* e de *Candida rugosa* imobilizadas em diversos suportes têm uma dependência similar da atividade de água (VALIVETY *et al.*, 1994), enquanto a subtilisina tem forte dependência em relação ao tipo de suporte usado para um teor de água constante (ORSAT *et al.*, 1993).

Nos estudos de biocatálise, em geral se têm observado uma certa preferência pelo uso de matrizes orgânicas como suporte de enzimas. Porém alguns tipos de suportes inorgânicos têm sido utilizados tanto em pesquisa básica como industrialmente. Esta preferência deve-se fundamentalmente ao fato que suportes orgânicos apresentam alta reatividade, facilitando a

ligação com as enzimas e permitindo a sua modificação estrutural e química. Contudo, suportes inorgânicos, devido as suas propriedades físicas, são preferidos para aplicações industriais (KENNEDY e CABRAL, 1987). Alta resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ao ataque microbiano são algumas das vantagens que apresentam os suportes inorgânicos, quando comparados com os orgânicos. Além disso, os materiais inorgânicos não apresentam mudanças na sua estrutura pela influência de amplas faixas de pH, temperatura e pressão e podem ser facilmente regenerados por um processo de pirólise.

Nas pesquisas de biocatálise em fase gasosa, matrizes orgânicas e inorgânicas têm sido utilizadas, mas geralmente o efeito do suporte e as suas propriedades (hidrofobicidade, acidez, estrutura, etc.) sobre o comportamento no sistema não têm sido discutido. Alguns tipos de enzimas e suportes usados em biocatálise em fase gasosa são apresentados na Tabela 2.

Muito embora a atividade de água venha a ser a melhor maneira de se definir a disponibilidade de moléculas de água para interação com a proteína, deve-se levar também em consideração a influência do meio, na distribuição destas moléculas, tal como no caso de solventes orgânicos líquidos (LAMARE e LEGOY, 1995). Estes autores observaram um aumento da atividade enzimática com o aumento da atividade de água no sistema para cutinase imobilizada em uma resina trocadora de íons. No entanto, os mesmos autores observaram um máximo para a atividade enzimática da mesma enzima suportada por adsorção em matriz apolar. A retenção de água pelo primeiro suporte, por ser este hidrofílico, seria bem superior à retenção pelo segundo que, sendo hidrofóbico, não competiria pela água, permitindo que a menores atividades de água a enzima tivesse hidratação suficiente para que, com alta mobilidade, alcançasse desnaturação. Em sistemas com solventes orgânicos líquidos, GOLDBERG *et al.* 

PULVIN et al. 1986

(1990) mostraram a importância da partição de água entre a fase sólida e solvente na atividade enzimática.

ENZIMA	TIPO DE SUPORTE	MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO	REFERÊNCIA
Alcool oxidase de Pichia pastoris	DEAE-cellulose e pérolas de vidro poroso (CGP)	Adsorção	BARZANA et al. 1989
Catalasse de Aspergillus niger			
Álcool oxidase	Amberlite IRA-400	Adsorção	HWANG <i>et al.</i> , 1993
Álcool oxidase de Pichia pastoris	DEAE-celulose	Adsorção	KIM e RHEE, 1992
Catalasse de Aspergillus niger			
Lipase de <i>Cândida</i> cylindracea	Chromosorb P	Adsorção	LAMARE e LEGOY, 1995
Cutinase de	Resina de troca iônica	Imobilização covalente	

Tabela 2. Alguns tipos de suportes usados em biocatálise em fase gasosa.

### 2.2.3 Efeito da polaridade da fase gasosa e do substrato sobre a atividade catalítica

Partículas porosas de albumina bovina e glutaraldeído

Fusarium solani

Álcool desidrogenase

A polaridade do substrato pode afetar a adsorção de água pela enzima e assim modificar as propriedades catalíticas desta. Por exemplo, a adsorção de água pela enzima álcool desidrogenasse foi estudada em presença de substratos orgânicos gasosos para reciclar o cofator

Adsorção

NAD e avaliar a interação da água com a enzima. Estes resultados foram comparados com a adsorção de água pela enzima na presença de uma mistura de gases livres de substratos orgânicos (vapor de água e hélio). Os resultados mostraram que a presença do composto hidrofóbico 3-metil-2-buten-1-ol não afetou a adsorção de água pela enzima, enquanto que a maior hidrofilicidade da acetona propiciou menor adsorção de água, o que indicou que moléculas orgânicas podem competir com a água durante o processo de hidratação da enzima em sistemas gasosos (YANG e RUSSELL, 1996a).

Resultados similares foram obtidos por CARVALHO *et al.* (1996) no estudo sopbre a influência da presença de gases (dióxido de carbono, propano e mistura destes) na reação de transesterificação por subtilisina Carlsberg. A composição da fase gasosa afetou a adsorção de água pela enzima como nos estudos de YANG e RUSSELL (1996a e 1996b). Na presença do composto apolar, propano, a hidratação da enzima foi maior do que aquela encontrada na presença de fase gasosa polar, contendo dióxido de carbono, para a mesma concentração de água no sistema. Devido à baixa atividade da enzima na presença de dióxido de carbono, conclui-se que este gás, apesar de apresentar algumas conveniências, não é um gás promissor no arrastre de substratos.

Durante as reações de transesterificação em fase gasosa de metil e etil propionato com álcoois de cadeia lineares saturadas de tamanhos diferentes usando lipase pancreática e uma cutinase em reator de leito fixo contínuo, observou-se que a atividade da enzima dependeu da natureza do éster e do comprimento da cadeia dos álcoois, isto é, um aumento do comprimento da cadeia e, conseqüentemente, da hidrofobicidade do álcool que resultou em taxas de reações

menores mas conferiu à enzima uma maior estabilidade (ROBERT et al., 1992 e PARVARESH et al., 1992).

LAMARE *et al.* (1997) observaram que álcoois utilizados na reação recombinante de transesterificação com cutinase podem substituir as moléculas de água na solvatação, com um efeito positivo sobre a taxa da reação, favorecendo a interação da enzima com os compostos não polares, em baixos níveis de hidratação, ou seja, para baixos valores de atividade da água. Ao mesmo tempo, esses autores observaram um incremento na afinidade da enzima pelo substrato, a medida que aumentava a disponibilidade da água e a apolaridade do substrato. Assim, quando a disponibilidade da água no sítio ativo é limitada, a reatividade dos compostos não polares diminui, devido à ausência de moléculas polares necessárias para interagir com os resíduos polares, para que as interações hidrofóbicas ocorram. Neste caso foi possível observar uma ação cooperativa, de um dos substratos com a enzima, em condições tais que este tem um papel importante na solvatação da proteína, interagindo com um grande número de resíduos e favorecendo a atividade catalítica.

### 2.3 Conclusões da revisão bibliográfica

Apesar das poucas publicações existentes em relação à biocatálise em fase gasosa, uma vez realizada a revisão bibliográfica, algumas conclusões podem ser formuladas:

 A hidratação da enzima constitui um fator de extrema importância para garantir o equilíbrio entre a atividade enzimática e a estabilidade do biocatalisador em reações em fase gasosa. A atividade de água (a<sub>w</sub>) é o parâmetro mais indicado para caracterizar e controlar a disponibilidade da água nesses sistemas.

- 2. Para baixos valores de atividade da água, o substrato pode substituir as moléculas de água, com um efeito positivo sobre a velocidade da reação, favorecendo a interação da enzima com os compostos não polares. Portanto, nos sistemas em fase gasosa deve-se considerar a polaridade do substrato como um parâmetro importante na hora de se avaliar a cinética destes processos.
- 3. Nos sistemas contendo enzimas imobilizadas em suportes sólidos, o suporte pode afetar a atividade enzimática devido à dependência das suas propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas, que pode competir pela água durante a reação deslocando o equilíbrio. Os efeitos de outros parâmetros do suporte como o caráter ácido-base não foram relatados na literatura consultada.
- 4. Apesar de se ter encontrado três artigos referentes ao estudo da reação de esterificação de etanol e ácido acético para a formação de acetato de etila (BARTON *et al.*, 1997 e HWANG e PARK, 1997, 1994); não foi encontrada nenhuma publicação que abordasse o estudo da reação de hidrólise de acetato de etila em fase gasosa, a qual foi objeto de estudo deste trabalho.
- 5. Apenas um trabalho (HWANG et al. 1993) apresentou um estudo de modelagem matemática de reação de oxidação de etanol a acetaldeido em fase gasosa, a qual foi feita a partir da derivação da equação de fluxo em pistão e na qual a equação da taxa é representada por uma equação do tipo de Michaelis-Menten, derivada de um mecanismo Bi-Bi seqüencial ordenado.

6. Os estudos de como interagem entre si enzima, substrato, água e suporte e suas implicações na estabilidade, seletividade e atividade destes biocatalisadores são aspectos pouco explorados na literatura, e mencionados por LAMARE e LEGOY (1995) como questões que necessitam ser estudadas.

# CAPÍTULO III MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Biocatalisadores com tamanho de poro controlado

A preparação de biocatalisadores com tamanhos de poros controlados envolveu varias etapas: a) a síntese e caracterização de suportes inorgânicos de óxidos mistos e puros de Si e Mg; b) a caracterização de diversas lípases de origem microbiana com vistas a selecionar a mais promissora e c) finalmente a etapa de imobilização da enzima no suporte. Cada uma destas etapas será descrita detalhadamente a seguir.

#### 3.1.1 Preparação dos suportes

Para a preparação dos sólidos usados como suportes, foram utilizados nitrato de magnésio hidratado (Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>6 H<sub>2</sub>O), com pureza mínima de 99% da Merck (Alemanha) e hidróxido de amônia com 25% de NH<sub>3</sub> também da Merck (Alemanha). Também, foi utilizado óxido de sílica (SiO<sub>2</sub>) da Degussa (AEROSIL 200, área superficial 200 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>), lote n° C200 75 CII, com pureza de 99,8% de SiO<sub>2</sub> e teores máximos de impurezas de 0,05% de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,03% de TiO<sub>2</sub>, 0,025% de HCl e 0,003% de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Foram preparados óxidos puros (em ordem crescente de basicidade) de  $SiO_2$  e MgO, além de óxidos mistos formados por combinações duas a duas destes óxidos puros de acordo com razões nominais MgO/SiO<sub>2</sub> de 0:1; 1:1; 1:4; 4:1; 8:1 e 1:0. O MgO foi preparado por

precipitação a partir da mistura de uma solução aquosa de NH<sub>4</sub>OH 0,187 M adicionada gota a gota à solução 4 M de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>6 H<sub>2</sub>O, sob agitação contínua de acordo com o método proposto por SIDJABAT *et al.* (1993). Na Figura 6 é apresentado o esquema do sistema experimental utilizado na preparação dos suportes. Os óxidos mistos foram preparados por precipitação, como no caso anterior, sobre uma suspensão aquosa contendo SiO<sub>2</sub> na proporção desejada (MARŢIN, 1997).



**Figura 6**. Esquema geral de preparação dos sólidos a ser usados como suportes na preparação dos biocatalisadores com tamanho de poros controlados.

O precipitado obtido, contendo hidróxido de magnésio ou sílica ou a mistura deles, foi deixado em repouso por 24 horas na solução mãe. Posteriormente, os sólidos foram filtrados a vácuo e secados em estufa a 400 K por 12 horas, resfriados até temperatura ambiente em dessecador, moidos, peneirados e posteriormente calcinados a 1073 K durante 5 horas. A Figura 7 apresenta a seqüência das operações envolvidas na preparação destes suportes.



Figura 7. Diagrama de blocos do procedimento de preparação dos sólidos usados como suportes.

### 3.1.2 Caracterização dos suportes

#### 3.1.2.1 Determinação do ponto úmido dos suportes

Para determinar o volume de poros gotejou-se um volume de água em uma quantidade conhecida de suporte previamente calcinado. Este procedimento foi realizado sob constante agitação do sólido até atingir o ponto úmido. A saturação dos poros do sólido foi percebida pelo excesso de água no sólido e o volume de água adicionado até este ponto foi usado para o cálculo do "ponto úmido", em termos de volume de líquido por massa de suporte.

#### 3.1.2.2 Difração de raios-X

Foi utilizado um difratômetro de raios-X da marca Philips Analytical, modelo X'Pert PW3050. Efetuou-se uma varredura continua do espectro utilizando a metodologia do pó com velocidade de 0,020 °/s e radiação de K $\alpha$ -Cu de comprimento de onda de 1,5406×10<sup>-10</sup> m. Os dados obtidos foram processados usando os programas computacionais PC-APD versão 4.0 e Origin versão 5.0.

#### 3.1.2.3 Adsorção de nitrogênio

Os suportes foram caracterizados por adsorção de nitrogênio em aparelho volumétrico Micromeritics, modelo ASAP 2010 C. Os suportes foram calcinados a 1073 K por 5 h em ar estático, em seguida resfriados até a temperatura ambiente em dessecador e posteriormente transferidos para a célula de adsorção. O primeiro tratamento consistiu na evacuação da amostra até 0,1 Pa a 623 K até que a pressão dentro da célula apresentasse uma variação menor do que 0,02 Pa por dois minutos. Subseqüentemente, a célula era fechada e transferida para o módulo de análise, onde era novamente evacuada até 0,1 Pa à temperatura ambiente. Posteriormente, a
temperatura era reduzida até 77 K e eram admitidas pequenas doses de  $N_2$  desde a pressão relativa de 0,010 até 0,995 seguido pela diminuição progressiva até 0,010. As isotermas assim construídas permitiram calcular a distribuição de tamanho de poros desde diâmetros de 1 até 300 nm. Além disso, na faixa de pressão relativa de 0,050 a 0,350, os dados de adsorção permitem calcular a área superficial pelo método BET (BRUNAUER et al,1938).

# 3.1.2.4 Quimissorção de CO<sub>2</sub>

A basicidade dos suportes foi medida por adsorção de CO<sub>2</sub> em aparelho volumétrico Micromeritics, modelo ASAP 2010 C. A caracterização por quimiosorção de CO<sub>2</sub> é baseada na determinação da isoterma de adsorção a diferentes pressões de CO<sub>2</sub>. Esta isoterma que corresponde à adsorção total de CO<sub>2</sub> é formada pela adsorção física (reversível) e pela adsorção química (irreversível). Desta forma, foi possível determinar a quantidade de CO<sub>2</sub> que cada sólido é capaz de adsorver quimicamente. A adsorção de CO<sub>2</sub> foi realizada a temperaturas diferentes (303, 333 e 373 K) para permitir o cálculo da distribuição de sítios básicos na superficie dos sólidos, pois a distribuição destes sítios poderia influenciar o comportamento da enzima nas reações estudadas.

# 3.1.3 Lipases utilizadas: características fundamentais

Foram usadas lipases de diferentes fontes e fornecedores com vistas a selecionar aquelas que fornecessem melhores resultados em termos da atividade catalítica em fase líquida, a partir da reação de hidrólise de p-Nitrofenol palmitato. Na Tabela 3, são apresentadas os diferentes tipos de enzimas utilizadas, assim como as características fundamentais de cada uma delas segundo os fornecedores.

Enzima	Fonte	Procedência	Dados de fornecedores	Massa molecular (kDa)
Lipolase 100L	Aspergillus oryzae	NOVO (Brasil)	Preparado bruto, estável de 55 a 333 K e pH de 4 a 10.	50
Lipozyme IM	Mucor michei	NOVO (Brasil)	Enzima imobilizada em resina macroporosa de troca aniônica por adsorsão. Estável de 303 a 343 K, tamanho de partícula de 0,2 a 0,6 mm, densidade de 350 a 450 kg/m <sup>3</sup> .	
Lipase OF	Cândida cylindracea	MEITO ANGYO (Japão)	Enzima liofilizada.	100-120
Lipase 2212F	Aspergillus sp.	ROHM (Alemanha)	Enzima liofilizada.	 
Lipase L	Cândida lipolítica	AMANO (Japão)	Enzima liofilizada.	
Lipase FAP15	Rizomucor javanicus	AMANO (Japão)	Enzima liofilizada.	-33
Lipase PS	Pseudomonas cepacia	AMANO (Japão)	Enzima liofilizada.	33
Lipase AK	Pseudomonas fluorencens	AMANO (Japão)	Enzima liofilizada.	33,5

Tabela 3. Lipases de diversas fontes microbianas e suas características fundamentais.

# 3.1.4 Caracterização de lípases

# 3.1.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras de lipases comerciais foram avaliadas quanto à pureza por SDS-PAGE segundo LAEMMLI (1970). O gel foi preparado na concentração de poliacrilamida de 12,5 % e com espessura de 1 mm. As amostras foram preparadas em tampão TRIS-HCl pH 8,0 contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e β-mercaptoetanol. Posteriormente as amostras foram aquecidas a 373 K durante 10 minutos para favorecer a desnaturação. A separação das proteínas foi realizada a 200 V e o método de revelação usado foi a coloração com solução de nitrato de prata.

## 3.1.4.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada segundo o método reportado por BRADFORD (1976). Este método é baseado na observação da existência de duas formas coloridas diferentes do Coomassie blue G-250 (vermelho e azul). A forma vermelha é convertida na forma azul após a ligação do corante com os resíduos de aminoácidos aromáticos das proteínas. Quando ocorre a ligação do corante com a proteína a mudança de cor pode ser medida espectrofotometricamente a 595 nm de comprimento de onda. Para obter a curva de calibração, preparou-se uma solução de albumina de soro bovino (BSA) com concentração de 10 µg/ml, dissolvendo-se 1 mg de BSA em 100 ml de tampão TRIS-HCl (20 mM, pH 8,0).

# 3.1.4.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada a partir de um método espectrofotométrico, o qual baseia-se na hidrólise do p-nitrofenolpalmitato (pNPP) em p-nitrofenol (pNP) e ácido palmítico (WINKLER e STUCKMANN, 1979; PIMENTEL *et al.*, 1994; RODRIGUES, 1997). A

liberação do p-nitrofenol foi detectada em 410 nm de comprimento de onda. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de p-nitrofenol formada em um minuto por volume de solução enzimática (nmol ml<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>). O método consiste em adicionar a 3,0 ml de substrato, 330  $\mu$ l de solução enzimática numa cubeta de quartzo. Posteriormente, são feitas várias medidas de absorção em 410 nm durante 30 minutos de reação em espectrofotômetro, com temperatura controlada a 310 K, em cubeta de quartzo. Para a preparação do "teste em branco" adicionou-se 330  $\mu$ l de tampão TRIS-HCl em 3,0 ml de substrato.

O substrato foi preparado a partir da mistura de duas soluções. A solução A é preparada ao se dissolver 27 mg de pNPP em 9 ml de isopropanol e a solução B ao se dissolver 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica em 430 ml de tampão TRIS-HCl 50 mM a pH 8,0. Esta última solução é estável por 6 semanas à temperatura de 4°C. Finalmente deve-se, adicionar, sob agitação 1,0 ml da solução A gota a gota em 9 ml da solução B. Para a determinação da curva padrão de p-nitrofenol foram preparadas várias soluções com diferentes concentrações de p-nitrofenol (solução A). A mistura de reação foi feita segundo a metodologia acima descrita, mas substituindo o tampão pela solução enzimática.

#### 3.1.5 Imobilização das Lípases nos suportes

Os sólidos utilizados como biocatalisadores foram preparados usando como procedimento de imobilização a adsorção física da lipase através do método da impregnação incipiente até o ponto úmido dos óxidos inorgânicos, com a solução aquosa contendo a enzima desejada. Em balança analítica foi pesado em cápsula de porcelana 1 grama de suporte, previamente calcinado a 1073 K e resfriado em dessecador à temperatura ambiente. Em uma bureta foi adicionada a solução enzimática com uma concentração de 20 mg/ml. A impregnação foi feita gotejando-se a

solução enzimática sobre o suporte até este atingir o ponto úmido. Os biocatalisadores, depois de secos em dessecador contendo peneira molecular a temperatura ambiente foram guardados a 277 K até a sua utilização.

Na preparação de biocatalisadores, com quantidades diferentes de lipase imobilizada (adsorção fisica), foi utilizado o método de impregnação incipiente sucessiva até o ponto úmido. Este procedimento consistiu na realização de várias etapas de impregnação, cada uma delas seguidas da secagem do sólido até massa constante para a eliminação da umidade residual e eventual preparação do sólido para uma nova etapa de adsorção. Quando concluído este procedimento, os biocalisadores foram secados em dessecador à temperatura ambiente e posteriormente estocados a 277 K até a sua utilização.

# 3.2 Biocatalisador comercial: características fundamentais

A enzima imobilizada comercial utilizada foi a Lipozyme IM da Novo Nordisk A/S, Dinamarca. Basicamente, este catalisador consiste de uma preparação de lipase imobilizada em partículas de resina macroporosa de troca aniônica. Esta resina conhecida como Duolite 568 (CONDORET *et al.*, 1997) é de tipo fenólica e altamente hidrofilica, encontrando-se a enzima fortemente ligada à matriz por adsorção. Trata-se de um produto granular com um tamanho de partícula de 0,2 - 0,6 mm, e com densidade aparente de 350 - 450 kg/m<sup>3</sup>. Esta enzima foi obtida a partir de uma lipase de *Mucor miehei*, cujo código genético foi transferido para *Aspergilllus oryzae*.

## 3.2.1 Caracterização do biocatalisador Lipozyme IM

## 3.2.1.1 Adsorção de nitrogênio

A enzima Lipozyme IM foi caracterizada por adsorção de nitrogênio em um aparelho volumétrico Micromeritics, modelo ASAP 2010 C de acordo com o procedimento descrito no item 4.1.2.3, mas como neste caso a amostra continha proteína, esta foi secada em dessecador a vácuo à temperatura ambiente durante 24 horas e em seguida transferida para a célula de adsorção.

## **3.2.1.2** Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TG, DTG) foi realizada em equipamento Universal, modelo V23 C TA. Basicamente esta técnica nos permite monitorar a perda de massa de uma amostra em função da temperatura de aquecimento, que no caso de proteínas, poderia ser explicada como possíveis mudanças estruturais que levam à desnaturação. A amostra (20,1093 mg) foi analisada em atmosfera de nitrogênio puro, entre 303 e 573 K, usando uma taxa de aquecimento de 283 K min<sup>-1</sup>.

# 3.2.2 Condições de pré-tratamento do biocatalisador

Em todos os experimentos, antes de iniciar as reações, o biocatalisador (aproximadamente 150 mg) foi submetido a um processo de pré-tratamento que consistiu basicamente da hidratação deste com água durante 30 minutos. Neste caso, a concentração da água (pressão parcial) usada nesta etapa de hidratação, na fase gasosa era igual à concentração que posteriormente seria fixada quando usada como reagente em cada teste experimental, isto é, 4,58; 9,21 ou 17,54 mmHg.

# 3.3 Sistema experimental de reação

O sistema experimental (Figura 8) é constituído por um aparelho volumétrico de vidro e pode ser divido em três blocos. O primeiro bloco destinado à preparação dos substratos era formado pelos borbulhadores (3), saturadores (4) e a câmara de mistura dos gases (6). Uma corrente de gás inerte (He) passava, separadamente, nos borbulhadores contendo os dois reagentes (álcool e ácido no caso de esterificação ou éster e água no caso da reação de hidrólise). Os reagentes foram arrastados pelo gás, em forma de vapor, até seus correspondentes saturadores, cuja temperatura foi controlada através da água (proveniente de banhos termostáticos), que circulava por suas camisas externas. A vazão de cada corrente gasosa era controlada por válvulas de ajuste fino independentes.

Os borbulhadores eram mantidos à temperatura ambiente, enquanto que a temperatura do saturador variava em função da pressão de vapor desejada para cada experiência. Garantiu-se, desta forma, a saturação da corrente gasosa com o vapor de éster ou água. Neste caso, o gás de arraste, depois de borbulhar nos reagentes estava em equilíbrio com a fase líquida e a pressão parcial dos reagentes era igual à pressão de vapor correspondente à pressão acima do ponto de orvalho dos compostos puros na temperatura do saturador. As pressões de vapor foram calculadas a partir da equação de Antoine:

$$\log P = A - \frac{B}{T + C} \tag{3}$$

onde:

P é a pressão parcial em mmHg T é a temperatura em K A, B, e C são constantes



(ر) الم

Figura 8. Sistema experimental para reações em fase gasosa: (1) sistema de suprimento de gás de arraste e de referência, (2) válvula de ajuste fino, sistemas para a preparação dos substratos{(3) borbulhador e (4) saturador}, (5) banho termostatico, (6) termopares, (7) câmara de mistura dos gases, (8) biorreator, (9) cromatógrafo gasoso, (10) computador para aquisição de dados.

A pressão de vapor em cada caso foi medida pela variação da vazão volumétrica e a temperatura de saturação correspondente, determinando desta forma, a concentração de cada substrato. Em seguida as correntes foram misturadas em uma câmara e transferidas para o segundo bloco constituído pelo sistema de reação. Foi usado um reator cilíndrico de 5 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro interno, o qual foi operado de forma diferencial utilizando-se uma alta vazão volumétrica da mistura reagente pelo leito catalítico para, desta forma, evitar problemas de transferência de calor e massa.

Os substratos introduzidos no reator passavam através de um leito contendo aproximadamente 150 mg enzima suportada ou livre (liofilizada). O reator foi operado sempre com uma baixa conversão dos reagentes para evitar problemas de transferência de calor e massa particularmente problemas difusivos (conversão menor que 10 %). Duas reações foram estudadas, primeiramente a reação de esterificação e posteriormente a de hidrólise de acetato de etila conforme as equações 4 e 5, sendo as concentrações inicias dos substratos na reação de esterificação de 4,58; 9,21 e 17,54 para a água e de 14,24; 25,00; 42,4 e 73,10 para o acetato de etila, respectivamente. Em todos os experimentos a vazão total dos gases foi medida em condições de temperatura e pressão normal.

# <u>Esterificação</u>

$$CH_{3}CH_{2}OH(g) + CH_{3}COOH(g) = CH_{3}COOC_{2}H_{5}(g) + H_{2}O(g)$$
(4)  
=

<u>Hidrólise</u>

$$enzima CH_3COOC_2H_5(g) + H_2O(g) = CH_3CH_2OH(g) + CH_3COOH(g)$$
(5)

O terceiro bloco, que corresponde à etapa de análise era formado basicamente por um cromatógrafo conectado em linha com o sistema de reação e acoplado a um computador que continha uma interface que operada por um programa computacional (Borwin) que permitja a conversão da sinal analógica em digital.

## 3.4 Monitoramento da reação

Cromatografia gasosa foi usada para analisar substratos e produtos resultantes da reação, em fase gasosa. O cromatógrafo, modelo CG-35, conectado em linha com o sistema experimental foi equipado com um detector de condutividade térmica. Utlizou-se uma coluna Poropak Q de 80/100 mesh, de aço inóx com 3m. A temperatura do detector foi de 473 K, enquanto as temperaturas do vaporizador e da coluna foram de 393 e 453 K, respectivamente. Hélio foi usado como gás de arraste com vazão de 40 mL/min.

Inicialmente, foi realizada a identificação cromatográfica dos reagentes e produtos que participam do sistema reacional. A Figura 9 apresenta um cromatograma com a identificação da água, etanol, ácido acético e acetato de etíla com os respectivos tempos de retenção na coluna cromatográfica, nas condições de operação do cromatógrafo.

#### 3.5 Procedimento de cálculo da velocidade de reação

Para o cálculo da taxa de reação  $r_A$  dada em mol de substrato consumido por hora e por miligrama de biocatalisador (mol/hmg), utilizou-se a equação para reatores diferenciais:

$$-r_{\rm A} = F_{\rm Ao} X/W \tag{6}$$

como

$$\mathbf{F}_{Ao} = \mathbf{v} \, \mathbf{C}_{Ao},\tag{7}$$

36



Tempo, min

Figura 9. Identificação dos reagentes e produtos por cromatografia. Injeção de 1  $\mu$ L de mistura líquida de água, etanol, ácido acético e acetato de etila usando coluna Poropak Q de 3 m. Hélio foi usado como gás de arraste com vazão de 40 ml/min.

Substituindo a equação (7) em (6), temos que

$$-r_{\rm A} = v C_{\rm Ao} X/W \tag{8}$$

Definindo a conversão da reação como sendo

$$X = (P_{Ao} - P_A) / P_{Ao}$$
<sup>(9)</sup>

onde:

FAo é a vazão molar, mol/h

X é a conversão referente ao substrato A, %

CAo é a concentração de substrato na entrada do reator, mmHg

CA é a concentração de substrato na saída do reator, mmHg

W é a massa de biocatlisador, mg

De acordo com a equação de gás ideal (PV = nRT), podemos escrever que:

 $C_{Ao} = n/V = P_{Ao}/RT$ (10)

Substituindo a equação (10) em (8), a equação para o cálculo da velocidade de reação pode ser escrita como:

$$-\mathbf{r}_{A} = \mathbf{v} \, \mathbf{P}_{Ao} \, \mathbf{X} / \mathbf{R} \mathbf{T} \mathbf{W} \tag{11}$$

onde:

v é a vazão volumétrica, L/h

R é a constante dos gases, 0,082 atm L /mol K

T é a temperatura, K

P<sub>Ao</sub> é a pressão parcial do substrato A na entrada do reator, atm.

# CAPÍTULO IV

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

# 4.1 Caracterização dos sólidos usados como suportes

# 4.1.1 Determinação do ponto úmido

Este parâmetro permitiu determinar o volume de solução enzimática que poderia ser adicionado aos suportes para a imobilização da lipase de interesse. A capacidade de adsorção de água (Tabela 4) foi maior quando se trabalhou com 100 % de sílica no suporte. Em geral, esperava-se uma menor adsorção de água pelos suportes constituídos por MgO o que nos sugeriu inferir que parte da água adicionada foi usada na formação de hidróxido de magnésio.

Razão nominal MgO/SiO2	1:0	8:1	4:1	1:1	1:4	0:1
Ponto úmido (ml g <sup>-1</sup> )	1,6	1,1	1,8	0,8	1,1	2,4

<b>Tabela 4.</b> Adsorção de água pelos suportes para as diferentes razões nominais MgO
---

# 4.1.2 Difração de raio-X

Os suportes preparados foram caracterizados por difração de raios-X com a finalidade de avaliar qualitativamente sua composição estrutural. Além disso, esta análise foi realizada antes e depois da calcinação dos suportes com o propósito de observar a mudança do hidróxido de magnésio a óxido de magnésio causada pela calcinação.

Nos difratogramas de raios-X (Figuras 10 a 15), antes e depois da calcinação, observaram-se diferentes graus de cristalinidade. As fases cristalinas identificadas corresponderam à presença de MgO nos suportes, enquanto as fases amorfas corresponderam à presença de SiO<sub>2</sub>. De acordo com os ângulos 20 e intensidades relativas reportados pelo "Joint Comittee of Powder Difraction Standards (JCPDS)", reportados na Tabela A1 do Anexo, constatou-se a presença de Mg(OH)<sub>2</sub> na estrutura do sólido com razão nominal MgO:SiO<sub>2</sub> de 1:0 antes da calcinação, apresentando halos significativos por volta de 18,2° e 37,0° (Figura 11), enquanto que o difratograma do sólido com razão nominal MgO:SiO<sub>2</sub> de 0:1 apresentou apenas um halo significativo por volta de 20,9° sendo identificado como SiO<sub>2</sub> (Figura 10).

No caso dos difratogramas referentes aos sólidos mistos com razão nominal MgO:SiO<sub>2</sub> 1:1; 1:4 e 4:1 observou-se diminuição gradativa referente aos picos relativos ao Mg(OH)<sub>2</sub> e aumento do halo referente a SiO<sub>2</sub>, antes da calcinação. Além disso, verificou-se a presença de dois halos, um por volta de 40° e o outro por volta de 60° (Figuras 12 a 15) atribuídos à presença de silicato de magnésio (MgSiO<sub>3</sub>). Quando trabalhou-se com razão MgO/SiO<sub>2</sub>mais próxima de 1, maior foi a intensidade dos halos referentes ao MgSiO<sub>3</sub> (Figura 15), o que indica que há necessidade simultânea dos óxidos de Mg e Si para formar este composto. Nos casos em que usou-se razões nominais MgO:SiO<sub>2</sub> de 1:0; 1:1; 1:4; 4:1 e 8:1, observou-se a mudança de Mg(OH)<sub>2</sub> a MgO (Figuras 11 a 15), depois da calcinação. Este fato era esperado devido à calcinação ter sido realizada a 1073 K justamente para garantir esta transformação.



Figura 10. Difratograma de raios X para amostra de MgO/SiO<sub>2</sub> com razão nominal 0:1 antes e depois da calcinação.



Figura 11. Difratograma de raios X para amostra de MgO/SiO<sub>2</sub> com razão nominal 1:0 antes e depois da calcinação.



Figura 12. Difratograma de raios X para amostra de MgO/SiO<sub>2</sub> com razão nominal 1:1 antes e depois da calcinação.



**Figura 13**. Difratograma de raios X para amostra de MgO/SiO<sub>2</sub> com razão nominal 1:4 antes e depois da calcinação.



Figura 14. Difratograma de raios X para amostra de MgO/SiO<sub>2</sub> com razão nominal 4:1 antes e depois da calcinação.



Figura 15. Difratograma de raios X para amostra de MgO/SiO<sub>2</sub> com razão nominal 8:1 antes e depois da calcinação.

# 4.1.3 Adsorção de nitrogênio

Foram medidas a área superficial pelo método de BET, o volume de poros e o diâmetro médio dos poros dos sólidos utilizados como suportes (Tabela 5). O diâmetro médio de poros nos suportes está na faixa de 17 a 34 nm, tamanhos considerados como adequados para facilitar a adsorção das lipases em estudo. Tal afirmação é baseada no fato de que as enzimas apresentam tamanho médio na faixa de 40 a 250 kDa, o que equivale a uma faixa de 4 a 25 nm (PETROPOULUS *et al.*, 1990). Neste caso, as lipases selecionadas a partir dos ensaios de atividade específica apresentam tamanhos na faixa de 33 a 100 kDa (3 a 10 nm) aproximadamente.

RAZÃO NOMINAL MgO/SiO2	COMPOSIÇÃO DE SÍLICA NOS SUPORTES (%)	ÁREA SUPERFICIAL (m²/g)	VOLUME DE POROS (cm <sup>3</sup> /g)	DIÂMETRO DE POROS (nm)
0:1	100,00	178	1,51	34
1:4	80,00	166	0,75	18
1:1	50,00	119	0,54	18
4:1	20,00	86	0,37	17
8:1	11,11	55	0,38	27
1:0	0,00	40	0,33	33

Tabela 5. Resultados da caracterização dos suportes por adsorção de nitrogênio.

A composição dos sólidos preparados influenciou significativamente as áreas superficiais específicas (Figura 16). A área superficial aumentou na medida que diminuiu o teor de MgO. Assim, por exemplo, com a variação da razão nominal MgO:SiO<sub>2</sub> no suporte de 4:1 para 1:4 observou-se aumento de 193% na área superficial. Este comportamento concorda plenamente com os resultados obtidos na caracterização dos suportes por difração de raios-X, posto que os suportes com menor teor de MgO, os quais foram os menos cristalinos, apresentaram uma elevada área superficial específica.

Conclusões similares podem ser formuladas em relação à influência da composição dos suportes sobre o volume específico de poros, o qual variou de 0,33 (suporte com razão nominal MgO:SiO<sub>2</sub> de 1:0) a 1,51 cm<sup>3</sup>/g (suporte com razão nominal MgO:SiO<sub>2</sub> de 0:1).



**Figura 16**. Variação da área superficial (método de BET) com a composição de sílica nos suportes preparados de acordo com o procedimento descrito no item 4.1.1 e apresentado de forma geral na Figura 7.

Noto-se também, que existe uma relativa diferença entre o volume de poros determinado pelo método do ponto úmido e pelo método de adsorção de nitrogênio. Esta diferença pode ser atribuída à formação de Mg(OH)<sub>2</sub> quando é adicionada a água no suporte para determinar a capacidade de adsorção dos sólidos resultando em um consumo maior de água, ou pode ser que na adsorção de N<sub>2</sub> o volume de poros fosse menor porque neste caso a adsorção acontece só nos microporos e mesoporos ao contrario do que acontece na adsorção de água a qual adsorve também nos macroporos resultando em um volume de poros maior quando medido por este último método.

# 4.1.4 Quimiosorção de CO<sub>2</sub>

A partir das isotermas de adsorção de CO<sub>2</sub>, determinou-se o caráter básico dos suportes em estudo. A estimativa da quantidade de gás quimiosorvido irreversivelmente foi realizada extrapolando a primeira isoterma até a pressão zero. A Tabela A2 (anexos) apresenta os resultados de volume de CO<sub>2</sub> adsorvido, número de sítios ativos e a densidade de sítios para cada um dos suportes para três valores de temperatura. A medida que aumenta o teor de MgO nos suportes aumenta também o número de sítios básicos, devido ao caráter ligeiramente básico do MgO. No cálculo do número de sítios considerou-se que uma molécula de CO<sub>2</sub> quimissorve-se em um sítio ativo na superfície do suporte.

## 4.2 Caracterização dos biocatalisadores

Neste item serão descritos os resultados referentes à análise e caracterização das lípases usadas na preparação dos catalisadores preparados nos suportes de óxidos mistos, bem como os referentes ao catalisador comercial usado, a Lipozyme IM.

# 4.2.1 Caracterização das enzimas livres

# 4.2.1.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das lipases

Uma análise dos resultados da eletroforese (Figura 17) permitiu verificar do ponto de vista qualitativo a presença de diversos contaminantes em todas as amostras de lipases comerciais disponíveis. As faixas 6 e 7 aparentemente correspondem às preparações enzimáticas menos impuras (lipases com massas moleculares de 33 e 33,5 kDa, respectivamente). Um comportamento muito interessante foi observado na faixa 8, na qual, além de se tratar de uma amostra das mais impuras, foi detectada concentração elevada de proteína entre 30 e 43 kDa. No entanto, de acordo com informações fornecidas pelo fabricante, a lipase nesta preparação tem massa molecular de aproximadamente 50 kDa.



Figura 17. Eletroforese para lipases de diversas fontes. Faixa 1: marcadores de massa molecular (94 kDa, fosforilase; 67 kDa, albumina; 43 kDa, ovalbumina; 30 kDa, anidrase carbônica; 20,1 kDa, inibidor tripsina; 14,4 kDa, α-lacto albumina); faixa 2: Lipase OF; faixa 3: Lipase L; faixa 4: Lipase FAP-15; faixa 5: Lipase 2212-F; faixa 6: Lipase PS; faixa 7: Lipase AK e faixa 8: Lipolase 100L EX.

# 4.2.1.2 Determinação da atividade enzimática específica

Para estimar a atividade enzimática foi necessário determinar as concentrações de proteína nas amostras de lipases a partir de uma curva padronizada usando como referência proteína BSA de acordo com o método de "BRADFORD"

Para a determinação da atividade enzimática usando o método da hidrólise do p-nitrofenolpalmitato (pNPP) foi necessário construir uma curva padrão (Figura 18) que relacionasse a concentração de p-nitrofenol e a absorbância a 410 nm de comprimento de onda.



**Figura 18**. Curva padrão de p-nitrofenol usada para determinar a atividade enzimática das lípases em estudo a partir da hidrólise de p-nitrofenolpalmitato. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de p-nitrofenol formado em um minuto volume de solução enzimática.

Uma vez determinada a concentração de proteínas e a atividade enzimática segundo o método da hidrólise do pNPP, para as sete lipases em estudo, calculou-se a atividade enzimática específica para cada uma delas (Tabela 6).

As enzimas LIPASE PS, AK, OF e LIPOLASE 100L EX, respectivamente, apresentaram os maiores valores de atividade específica. As Lipases PS e AK apresentaram atividades específicas quase 20 a 60 vezes maiores quando comparadas com a Lipase OF e a Lipolase 100 L EX, respectivamente. Este fato vai ao encontro dos resultados da eletroforese, já que as lipases AK e PS foram as que apresentaram menor teor de impurezas. Como a lipase AK apresentou algumas dificuldades de solubilização durante a preparação das soluções enzimáticas, optou-se por escolher a lipase PS como a enzima a ser usada na preparação dos biocatalisadores.

ENZIMA	CONCONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA (µg ml <sup>-1</sup> )	ATIVIDADE ESPECÍFICA (nmol min <sup>-1</sup> μg <sup>-1</sup> )
Lipase OF	91,76	1,454
Lipase L	33,73	0,111
Lipase FAP-15	100,12	0,022
Lipase 2212-F	70,53	0,035
Lipase PS	90,38	30,071
Lipase AK	60,08	34,125
Lipolase 100 L EX	$39,27 \ge 10^3$	0,504

Tabela 6. Atividade enzimática de lipases medida a partir da hidrólise de p-nitrofenol palmitato.

# 4.2.2 Caracterização do biocatalisador comercial: Lipozyme IM

Apesar da Lipozyme IM ser um biocatalisador comercial alguns parâmetros foram determinados com a finalidade de conhecer melhor este biocatalisador, cujos resultados serão discutidos a seguir.

#### 4.2.2.1 Adsorção de nitrogênio

Foi medida a área superficial pelo método BET, o volume de poros e o diâmetro médio dos poros da Lipozyme IM, cujos resultados foram 86m<sup>2</sup>/g, 0,57cm<sup>3</sup>/g e 26nm, respectivamente, os que, mostram que a Lipozyme IM apresenta grande área superficial. O valor do diâmetro médio de poros, também grande (26nm), corrobora a natureza porosa do biocatalisador, de acordo com a informação fornecida pelo fabricante.

# 4.2.2.2 Análise de estabilidade térmica

A estabilidade térmica é um importante parâmetro na caracterização de um biocatalisador. A análise termogravimétrica é uma técnica adequada para avaliar o efeito da temperatura sobre uma enzima (TURNER e VULFSON, 2000; CÁSTRO *et al.*, 2000). Esta análise (Figura 19) permitiu estudar as mudanças de massa de uma amostra de Lipozyme IM como função da temperatura, bem como a faixa de temperatura que conseqüentemente pode provocar mudança conformacional na enzima, o que pode estar relacionado a desnaturação desta.

Os resultados indicaram basicamente a presença de três picos de perda de massa. Numa primeira etapa, na faixa de temperatura de 303 a 423 K, ocorre uma pequena perda de massa (2,519 %) devido provavelmente à desidratação da água intersticial contida no biocatalisador. Entre 423 e 623 K ocorre perda de massa continua (35,04%), provavelmente devido a completa

decomposição da estrutura orgânica da lipase e apartir de 623 K observa-se perda de massa continua também significativa devido provavelmente a mudanças nas propriedades químicas da matriz orgânica. Segundo NIGEL e VULFSON (2000) a lipase *Mucor miehei* apresenta desnaturação na região de 388 K, aproximadamente. Contudo o fato desta enzima estar imobilizada numa matriz orgânica pode proporcionar-lhe um incremento na sua termoestabilidade, quando comparada com a enzima livre.

# 4.3 Reações enzimáticas em fase gasosa

# 4.3.1 Reações de esterificação

As reações de esterificação de acetato de etila em fase gasosa foram estudadas com a lipase PS em forma livre e imobilizada em diversos óxidos puros e mistos de Si e Mg (biocatalisadores com tamanho de poro controlado).





# 4.3.1.1 Reações de esterificação com lipase PS livre

Inicialmente foram realizados experimentos com Lipase PS livre, isto é não imobilizada, catalisando a reação de esterificação de acetato de etila. Em primeiro lugar, estes experimentos permitiram verificar, de acordo com os resultados obtidos (Figura 19), a ocorrência da reação de esterificação em fase gasosa. Contudo, no inicio da reação observou-se um incremento da conversão de 0,6 a 3,6 % na primeira hora e meia de reação, mas a posteriormente a conversão começou a cair gradativamente até aproximadamente 0,1% de conversão às três horas de reação.



**Figura 20**. Conversão de etanol da reação de síntese de acetato de etila em fase gasosa usando 500 mg Lipase PS livre a 313 K. Vazão total dos gases foi de 40 ml/min e as pressões parciais de etanol e ácido acético foram de 48,6 e 10 mmHg, respectivamente.

Este comportamento, observado repetidamente, possivelmente poderia estar associado à perda de atividade devida a um efeito de inibição por ácido acético, o qual era usado como substrato com uma concentração equivalente a uma pressão parcial de 10 mmHg. Neste contexto,

foi de interesse realizar experimentos com enzimas imobilizadas, provavelmente mais estáveis, para desta forma se ter um melhor desempenho durante a reação.

# 4.3.1.2 Reações de esterificação com Lipase PS imobilizada

Em uma primeira etapa decidiu-se trabalhar com o biocatalisador constituído por lipase PS imobilizada no suporte misto MgO/SiO<sub>2</sub> na proporção 4/1, mas não foi possível monitorar adequadamente a reação basicamente porque as quantidades de ácido acético na corrente de saída não foram as esperadas, de modo que não foi possível fechar o balanço de carbono. Suspeitou-se então que provavelmente o ácido acético poderia estar reagindo com o suporte e formando acetato de Mg, conseqüentemente estar-se-ia modificando a estrutura do catalisador.

Devido aos problemas anteriores, decidiu-se trabalhar com o suporte de sílica pura (SiO<sub>2</sub>) e para tanto foram preparados dois biocatalisadores, com quantidades diferentes de lipase PS a partir de uma suspensão enzimática de 30 mg/ml em tampão fosfato 50 mM (pH 8) e de acordo com o ponto úmido para o SiO<sub>2</sub> (2,4 mL), em uma etapa e em cinco etapas de imobilização, tendo o primeiro 72 mg de lipase PS/grama de SiO<sub>2</sub> e o segundo 360 mg de lipase PS/grama de SiO<sub>2</sub>, respectivamente.

Os testes de reação realizados com ambos catalisadores (Figura 21) permitiram constatar que o catalisador preparado com impregnações sucessivas (5 etapas) teve melhor desempenho quando comparado com aquele preparado com uma única etapa de impregnação, sendo este desempenho proporcional à quantidade de enzima no suporte, ou seja, 5 vezes mais lipase proporcionou praticamente uma conversão 5 vezes maior. Contudo, no inicio da reação ocorreu uma rápida desativação do catalisador, atingindo-se o estado estacionário a partir de 0,5 h de reação para conversão de 4% aproximadamente e se manteve constante por um pouco mais de

53

duas horas de reação. Dois fatores podem estar associados a esta perda de atividade: primeiro a perda parcial de água pela enzima devido à exposição do biocatalisador à temperatura de reação e segundo ao efeito de inibição pelo acido acético.

Resultados similares foram obtidos por HWANG e PARK (1997) e BARTON *et al.* (1997), os quais, apesar de não terem usado reator diferencial na suas pesquisas, encontraram forte efeito inibitório do ácido acético sobre atividade enzimática de lipase pancreática porcina livre e imobilizada em lã de vidro durante a reação de esterificação de acetato de etila em fase gasosa.



**Figura 21**. Efeito do teor de enzima PS na imobilização em SiO<sub>2</sub> durante a reação de Esterificação de Acetato de Etila a 323 K.--**-**--Uma etapa de impregnação; --**-**-- Cinco etapas de impregnação A vazão total dos gases foi de 40 ml/min, enquanto que as pressões parciais de etanol e ácido acético e a massa de biocatalisador foram de 22,85 mmHg, 10 mmHg, e 300 mg, respectivamente.

Em sistemas Bi-Bi, por exemplo em reações de esterificação, a inibição pelo substrato ácido pode ser explicada pela hipótese de que o ácido reage com o complexo acila-enzima e forma um complexo inativo que não permite a transferência desse intermediário acila para o álcool (SEGEL, 1975a). Contudo diversos artigos reportam a inibição por álcool durante reações de esterificação em solventes orgânicos. Por exemplo, foi observado que a presença de excesso de etanol afetou drasticamente o rendimento de butirato de etila e outros ésteres etílicos, enquanto que o ácido butirico não inibiu a mesma reação (KRISHNA e KARANTH, 2001).

Tanto o ácido acético como o etanol são compostos muito polares, mas os efeitos dos substratos sobre o desempenho do catalisador devem ser analisados a partir do coeficiente de partição de cada substrato e da afinidade do suporte pela água (CASTRO *et al.*, 2000). Não só devemos considerar a polaridade dos substratos senão também a do suporte.

Outra abordagem para tentar explicar os problemas encontrados com o biocatalisador de SiO<sub>2</sub> puro foi realizada a partir da verificação da existência de fase condensada no interior dos poros do catalisador. Para tal propósito, foi realizada uma estimativa da pressão de condensação critica a partir da equação (11) conhecida como equação de Kelvin e cujos resultados (Tabela 7) permitiram verificar a existência de uma fase condensada no interior dos poros já que em todos os casos a pressão de condensação critica foi menor que a pressão de saturação, mas o que não fica claro é se isto é uma condição preestabelecida para a ocorrência da reação.

$$\ln\left(\frac{\mathbf{P}^*}{P_0}\right) = -\left(\frac{2\sigma\nu\cos\theta}{RTr_m}\right) \tag{12}$$

em que P<sup>\*</sup>é a pressão de condensação crítica, mmHg

P<sub>0</sub> é a pressão de saturação, mmHg

 $\sigma$  é a tensão superficial, J/m<sup>2</sup>

v é o volume molar,  $m^3/Kmol$ 

 $\theta$  ângulo de contato entre o sólido e a fase condensada

r<sub>m</sub> é o radio de curvatura do menisco do líquido, m

Tabela 7. V	alores da rela	$\tilde{20} P^{/}P_0 em$	função da tem	peratura para SiO <sub>2</sub> puro.
-------------	----------------	--------------------------	---------------	--------------------------------------

		$\mathbf{P}^*/\mathbf{P}_0$			
Sustância	Diâmetro de poro (nm)	20 °C	40 °C	45 °C	
	341	0,968	0,973	0,974	
Etanol	48 <sup>2</sup>		0,980	0,981	
	341	0,960	0,968	0,969	
Acido acetico	48 <sup>2</sup>	0,973	0,978	0,978	
Acetato de etila	34 <sup>1</sup>	0,940	-	-	
	48 <sup>2</sup>	0,960	_	-	
:	34 <sup>1</sup>	0,960	0,970	0,970	
Agua	48 <sup>2</sup>	0,977	0,979	0,980	

<sup>1</sup> Diametro médio de poros correspondente à distribuição de poros global no suporte.

<sup>2</sup> Diametro médio de poros correspondente à distribuição de poros mais representativa no suporte.

Independentemente dos problemas de desativação apresentados pelo catalisador com 360 mg de lipase PS/grama de SiO<sub>2</sub>, pode-se considerar que esse era um catalisador promissor para realizar os estudos de biocatálise, posto que se observaram indícios claros de ocorrência de reação na fase gasosa e também porque os valores de conversão observados ao se atingir o estado estacionário corresponderam aos esperados para um reator diferencial, isto é, valores abaixo de 10%. Contudo, dois aspectos acabaram interferindo significativamente o desenvolvimento da pesquisa: a) as quantidades de Lipase PS disponíveis, até então, eram insuficientes para desenvolver o trabalho e b) as altas concentrações de ácido acético, usadas na reação de esterificação, foram um sério problema, pois dificultou o desempenho dos catalisadores e o monitoramento da reação, além de ser um problema para a coluna cromatográfica, porque ácidos reagem com as matrizes das colunas empacotadas.

Estes fatores nos levaram a mudar a reação modelo de esterificação para uma reação de hidrólise de acetato de etila. Também foi necessário selecionar um novo catalisador e foi escolhida a Lipozyme IM, um biocatalisador da Novo Nordisk, a qual possuíamos em quantidades suficientes para o desenvolvimento do trabalho. Desta forma, os resultados apresentados no seguimento deste trabalho referem-se à reação de hidrólise de acetato de etila catalisada pela enzima Lipozyme IM.

#### 4.3.2 Reações de hidrólise

Diversos testes de reação foram realizados com a finalidade de validar o sistema experimental e avaliar as possíveis limitações difusionais, o efeito da concentração dos substratos, tratamento (hidratação) do biocatalisador e a temperatura de reação sobre o desempenho do biocatalisador Lipozyme IM, durante a reação de hidrólise de acetato de etila em fase gasosa.

# 4.3.2.1 Verificação da reprodutibilidade de dados experimentais durante as reações de hidrólise de acetato de etila em fase gasosa

Com o propósito de verificar a reprodutibilidade dos experimentos de hidrólise de acetato de etila e validar o sistema experimental, foram realizados vários testes de reação em triplicata

57

(Figura 22). Como pode-se observar há sempre uma queda exponencial da conversão no inicio da reação, isto é quando tempo de reação tende a zero, até que ao cabo de 1 hora aproximadamente o sistema reacional atinge o estado estacionário. Antes dos reagentes serem introduzidos no reator o biocatalisador foi exposto a uma corrente de H<sub>2</sub>O em He na temperatura ambiente por 30 min e posteriormente isolado do fluxo dos gases para que o equilíbrio fosse estabelecido nos gases reagentes. Uma hora antes da reação, a temperatura do reator foi aumentada para 318K fazendo com que a pressão total e a pressão de vapor de água dentro do reator aumentasse.



**Figura 22**. Hidrólise de acetato de etila (experimento realizado em triplicata). Condições de reação: massa de catalisador de 150,0 mg; vazão total dos gases de 50 mL/min; temperatura de reação 318 K; concentrações (pressões parciais) de acetato de etila e água de 15,24 e 4,57 mmHg, respectivamente.

Assim, ao iniciar a passagem dos reagentes sobre o leito catalítico as pressões de vapor de água na corrente gasosa e no reator não eram iguais, uma vez que a 318K a pressão parcial de água era 71,88 mmHg e o biocatalisador foi tratado com pressões parciais de água de 4,58; 9,21 e 17,54 mmHg. Esse aumento pressão parcial de água ao iniciar a passagem da corrente gasosa foi observada na ausência de acetato de etila. Portanto, esse comportamento, observado em todos os experimentos de hidrólise de acetato de etila, provavelmente é devido à competição pela água entre a enzima e o suporte, conhecido por suas propriedades hidrofilicas.

Devido a estes problemas foi de interesse verificar a existência de uma fase condensada no interior dos poros da resina de troca aniônica e para tal propósito, foi realizada uma estimativa da pressão de condensação critica a partir da equação (11). Os resultados (Tabela 8) confirmaram a existência de fase condensada no interior dos poros já que a pressão de condensação critica foi menor que a pressão de saturação. Contudo, ainda não esta claro como este aspecto pode interferir ou favorecer o desempenho da reação de hidrolise de acetato de etila em fase gasosa e portanto, constitui um aspecto a ser aprofundado em trabalhos futuros. BARZANA *et al.* (1989) quando estudaram a oxidação enzimática de etanol a acetaldeído em fase gasosa demonstraram que a existência de uma fase condensada de etanol na superfície do suporte não era um pré-requisito para a ocorrência de reação uma vez que esta era resultado da interação direta do etanol gasoso com a enzima. Contudo, todo o etanol foi oxidado a acetaldeído indicando que as moléculas adsorvidas de alguma forma tiveram acesso à enzima.

Retomando a análise dos resultados apresentados na Figura 22 observou-se que antes do sistema atingir o estado estacionário (1,25 h de reação aproximadamente) houve uma variação nos dados inferior a 30%. Uma vez atingido o estado estacionário, no entanto, as curvas

59

praticamente se superpõem com diferença máxima de 5%, indicando uma boa reprodutibilidade. Para confirmação, determinou-se o desvio padrão dos valores de conversão para tempos iguais de reação. Assim, por exemplo, no início da reação (para 0,333 h) o valor médio da conversão foi 17,7% com desvio padrão de 1,5; mas a medida que foi atingido o estado estacionário (a partir de 1,25 h de reação, aproximadamente) o desvio padrão foi de  $9 \times 10^{-2}$  para valor médio de conversão de 4,4%. Desta forma, podemos considerar que os dados experimentais apresentam boa reprodutibilidade, principalmente, quando foi atingido o estado estacionário, apresentando um erro de aproximadamente 2% com relação ao valor médio da conversão.

		$\mathbf{P}^*/\mathbf{P}_0$			
Sustância	Diâmetro de poro <sup>1</sup> (nm)	20 °C	40 °C	45 °C	
Água	26	0,959	0,960	0,960	
Acetato de etila	26	0,920	-	-	
Ácido acético	26	0,954	0,960	0,961	
Etanol	26	0,959	0,965	0,966	

**Tabela 8.** Valores da relação  $P^*/P_0$  em função da temperatura para Lipozyme IM.

<sup>1</sup> Diametro médio de poros correspondente à distribuição de poros global no suporte.

# 4.3.2.2 Estudo das limitações difusionais externas

Devido ao uso de um reator de leito fixo, foi necessário verificar se não existiam limitações difusionais no sistema. Neste experimento, os parâmetros do processo, tais como, vazão volumétrica, concentrações de substrato (pressões parciais) e temperatura de reação foram

mantidos constantes e iguais a 52,5 mL/min, 14,24 mm Hg para o acetato de etila e 4,57 mm Hg para a água e 318 K, respectivamente.

O experimento consistiu em diminuir a massa do catalisador à metade aproximadamente (de 153,3 mg para 77,5 mg) e verificar o comportamento da conversão da reação para a reação de hidrólise de acetato de etila.

Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 23. Pode-se verificar que quando diminui-se a massa de biocatalisador até a metade a conversão inicial cai de 26,4 % para 13,3 % (atinge-se a metade da conversão também), verificando-se desta forma a ausência de limitações difusionais no sistema. Contudo, a partir de 30 minutos de reação a conversão para a reação catalisada por 77,3 mg de Lipozyme IM fica num valor aproximadamente constante (entre 6 – 7 %), chegando a ter desempenho praticamente igual ao observado para a reação com 153,3 mg de enzima ao cabo de 1 hora.

Neste contexto, alguns comentários são passíveis de serem feitos para tentar explicar este comportamento. Assim, denominemos W1 e W2 como as massas de Lipozyme IM usadas em cada experimento com 153,3 e 77,3 mg, respectivamente. A vazão mássica total F se manteve constante e portanto, a velocidade espacial modificada F/W1 < F/W2. No entanto, como a pressão parcial de água no sistema foi constante (4,57 mmHg) agora tínhamos maior disponibilidade de água no sistema por unidade de massa de catalisador W2. Este fato pode explicar a ocorrência de conversões similares para ambos experimentos ao cabo de 1 hora de reação.

61



**Figura 23**. Efeito da massa de catalisador na conversão catalítica de acetato de etila. --**-**-153,3 mg de Lipozyme IM; --**-**- 77,5 mg de Lipozyme IM. Vazão volumétrica, concentrações de substrato (pressões parciais), e temperatura de reação iguais a 52,5 mL/min, 14,24 mm Hg para o acetato de etila e 4,57 mm Hg para a água e 318 K, respectivamente.

# 4.3.2.3 Estudo da possibilidade de reutilização do catalisador Lipozyme IM

Com o propósito de verificar a possibilidade de reciclo do catalisador foram realizados vários testes de reação sem retirar o catalisador do reator (Figura 24). Os parâmetros de operação do sistema, isto é, vazão volumétrica, as concentrações de substrato (pressões parciais) e a temperatura de reação foram mantidos constantes e iguais a 54 mL/min, 14,24 mm Hg para o acetato de etila e 17,54 mm Hg para a água e 318 K, respectivamente.

Duas etapas de reciclo foram realizadas com tempos de hidratação diferentes ao início de cada reação, mas mantendo-se o teor de água na corrente gasosa constante (igual a 17,54 mmHg).
O experimento consistiu em verificar, a partir de um teste de referência, se o catalisador não retirado do reator, ao ser reutilizado e hidratado, atingiria os níveis de conversão apresentados na reação de referência. O biocatalisador pré-hidratado por 30 min, seguido de uso na reação de hidrólise foi mantido no reator após a conclusão da reação e novamente reidratado por 30 min, seguido de uso para completar a primeira etapa de reutilização deste. Posteriormente, este biocatalisador foi mantido no reator e novamente reidratado, mas agora por 15 h e seguido de uso para completar a segunda etapa de reutilização.



Figura 24. Efeito do reciclo do catalisador (Lipozyme IM) na reação de hidrólise de acetato de etila. --∎-- reação modelo com enzima tratada por 30 min em fluxo contínuo com água; --●-- reação com catalisador mantido no reator após a primeira reação e reidratado por 30 min; --▲--reação com catalisador mantido no reator após a primeira etapa de reutilização e reidratado por 15 h. Vazão total, temperatura e composição de substratos de 54 mL/min, 318 K e 14,24 mmHg para o éster e 17,54 mmHg para a água, respectivamente.

Pôde-se verificar que, uma vez atingido o estado estacionário, houve diminuição da conversão de 11% para 8% aproximadamente para o biocatalisador reutilizado e reidratado por 30 minutos. Ou seja, nas condições usadas para regeneração o biocatalisador conserva 70% de sua atividade inicial.

Esta desativação (aproximadamente de 30%) pode ser devida à perda de água (desidratação) no catalisador, que acontece durante a reação e que não é reposta durante o tratamento de hidratação na primeira etapa de reutilização, uma vez que catalisadores enzimáticos perdem atividade durante processos de desidratação (HWANG, 1992). Os resultados (curva representada em verde pela Figura 24) mostraram que depois da primeira etapa de reutilização o biocatalisador, quando foi reidratado por 15 horas, manteve sua atividade inicial, uma vez atingido o estado estado estacionário.

Estes resultados permitiram confirmar que a água é uma variável importante nestes processos e que é possível reutilizar o biocatalisador, conforme reportado na literatura (LAMARE e LEGOY, 1995; RUSSELL e YANG, 1996), como uma das vantagens dos processos catalíticos em fase gasosa. Por outro lado a hidratação do biocatalisador fresco, para tempos de tratamento: 0,5; 1 e 2 h com pressão parcial de água de 17,539 mmHg na temperatura ambiente (Figura 25), não mostrou nenhum efeito significativo sobre o desempenho da reação, devido provavelmente à saturação da água no biocatalisador.



Figura 25. Efeito do tempo de hidratação da enzima, com fluxo contínuo de água sobre a reação de hidrólise de acetato de etila. Tempo de pré-hidratação do biocatalisador --∎-- 0,5 h; --●-- 1 h e --▲-- 2 h. Vazão total, temperatura e composição de substratos de 54 mL/min, 318 K e 14,24 mmHg para o éster e 17,54 mmHg para a água, respectivamente.

#### 4.3.2.4 Efeito da concentração dos substratos sobre a taxa de reação

Para estudar os efeitos dos substratos sobre a reação, diversos testes foram realizados, primeiramente fixando a concentração da água e variando a concentração de éster e posteriormente fixando a concentração de éster e variando a concentração da água. No caso da água foram utilizados três valores de concentração (pressões parciais) de 4,58; 9,21 e 17,54 mmHg, enquanto que para o éster foram utilizados quatro valores de concentração (pressões parciais) de 14,24; 25,0; 42,4 e 73,1 mmHg (Figuras 26 a 28).



**Figura 26**. Estudo cinético para diferentes concentrações de éster --**n**-- 14,24 mmHg; --**o**-- 25,0 mmHg; --**A**-- 42,4 mmHg e -- $\nabla$ -- 73,1 mmHg, mantendo-se constante a concentração de água (4,58 mmHg) na hidrólise de acetato de etila. Vazão total de 54 mL/min e temperatura a 318 K.



**Figura 27**. Estudo cinético para diferentes concentrações de éster --**n**-- 14,24 mmHg; --**e**-- 25,0 mmHg; --**A**-- 42,4 mmHg e -- $\nabla$ -- 73,1 mmHg, mantendo-se constante a concentração de água (9,21 mmHg) na hidrólise de acetato de etila. Vazão total de 54 mL/min e temperatura a 318 K.



**Figura 28**. Estudo cinético para diferentes concentrações de éster --**m**-- 14,24 mmHg; --**m**-- 25,0 mmHg; --**A**-- 42,4 mmHg e -- $\nabla$ -- 73,1 mmHg, mantendo-se constante a concentração de água (17,54 mmHg) na hidrólise de acetato de etila. Vazão total de 54 mL/min e temperatura a 318 K.

Os resultados mostram que para uma pressão parcial de água fixa a conversão diminui com o aumento da pressão parcial de éster, sendo que a maior redução ocorre quando a pressão parcial de éster passa de 14,24 para 25,00 mmHg. Ao contrário, para uma pressão parcial de éster fixa há ligeiro aumento na conversão com o aumento na pressão parcial de água.

Na Figura 29, a conversão da reação é expressa em função da razão concentração de éster na fase gasosa/massa de Lipozyme IM usada no reator. Ainda que neste caso a massa de enzima usada fosse constante, com o aumento da razão éster/enzima ocorria diminuição da conversão como explicado anteriormente, mas a concentração de etanol na fase gasosa aumenta.

Dois procedimentos foram utilizados para estimar as taxas de reação: a) a partir dos valores experimentais de conversão, b) a partir do ajuste de modelos do tipo exponencial

67

decrescente para a conversão em função do tempo de reação (X=f(t)). Para o primeiro caso, os resultados são apresentados nas Tabelas A3 a A5 (anexos). Para o segundo caso, os resultados dos ajustes são apresentados nas Figuras 30 a 32, enquanto a Tabela 9 apresenta de forma resumida os modelos ajustados, as conversões estimadas para dois tempos de reação (1 h e 1,5 h) correspondentes ao estado estacionário, bem como as suas respectivas taxas de reação.



**Figura 29**. Conversão de acetato de etila --- e formação de etanol --- em função da razão acetato de etila gasoso (mmHg)/massa de lipozyme IM (mg) à temperatura de 318 K ao cabo de 1,5 h de reação. Vazão total de 54 mL/min e concentração de água 17,54 mmHg.



2

**Figura 30**. Ajuste da conversão em função do tempo de reação (x=f(t)) segundo o modelo exponencial decrescente da forma  $x=B+Aexp^{-(t)/C}$ , em que x e t são a conversão e o tempo de reação respectivamente e A, B e C são constantes, para pressão parcial fixa de 4,54 mmHg de água e variando a concentração do éster: a) 14,24 mmHg; b) 25,00 mmHg, c) 42,40 mmHg e d) 73,10 mmHg.



Figura 31. Ajuste da conversão em função do tempo de reação (x=f(t)) segundo o modelo exponencial decrescente da forma  $x=B+Aexp^{-(t)/C}$ , em que x e t são a conversão e o tempo de reação respectivamente e A, B e C são constantes, para pressão parcial fixa de 9,21 mmHg de água e variando a concentração do éster: a) 14,24 mmHg; b) 25,00 mmHg, c) 42,40 mmHg e d) 73,10 mmHg.



Figura 32. Ajuste da conversão em função do tempo de reação (x=f(t)) segundo o modelo exponencial decrescente da forma  $x=B+Aexp^{-(t)/C}$ , em que x e t são a conversão e o tempo de reação respectivamente e A, B e C são constantes, para pressão parcial fixa de 17,539 mmHg de água e variando a concentração do éster: a) 14,24 mmHg; b) 25,0 mmHg , c) 42,40 mmHg e d) 73,10 mmHg.

**Tabela 9**. Taxas de reação da hidrólise de acetato de etila determinada para as diferentes concentrações dos substratos. A vazão total e a temperatura foram de 54 mL/min e 318 K, respectivamente.

Pressão Parcial de Água (mmHg)	Pressão Parcial de Éster (mmHg)	Equação da conversão para 0,0833≤ t <sub>reação</sub> ≥2,0833h	Conversão do Éster (%)		Taxa de Reação ×10 <sup>4</sup> (mol h <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	
			1 h	1,5 h	1 h	1,5 h
4,58	14,24	7,2+19,7e <sup>(-t/0,27)</sup>	7,7	7,2	1,27	1,20
	25,00	4,5+15,5e <sup>(-1/0,21)</sup>	4,6	4,5	1,35	1,31
	42,4	4,2+10,1e <sup>(-t/0,37)</sup>	4,9	4,4	2,43	2,18
	73,10	0,99+7,7e <sup>(-t/1,54)</sup>	5,0	3,9	4,2	3,31
9,21	14,24	8,7+28,6e <sup>(-t/0,24)</sup>	9,1	8,7	1,51	1,45
	25,00	5,8+20,9e <sup>(-t/0,24)</sup>	6,1	5,7	1,79	1,70
	42,40	3,7+12,7e <sup>(-1/0,39)</sup>	4,7	3,9	2,31	1,95
	73,10	3,8+6,7e <sup>(-1/0,48)</sup>	4,7	4,1	3,96	3,50
17,54	14,24	10,4+41,2e <sup>(-1/0,28)</sup>	11,6	10,6	1,92	1,76
	25,00	6,3+29,3e <sup>(-t/0,26)</sup>	6,9	6,4	2,03	1,87
	42,40	4,3+23,3e <sup>(-t/0,31)</sup>	5,3	4,5	2,61	2,22
	73,10	5,4+11,9e <sup>(-t/0,15)</sup>	5,4	5,4	4,63	4,62

Em nenhuma das equações utilizadas (Tabela 9) para ajustar os pontos experimentais a conversão é maior do que 100% (B+A, quando t=0) pois esta varia aproximadamente de 9 até 52%. De acordo com as equações ajustadas a conversão é máxima quando t=0 o que garante a validade do modelo.

Uma vez estimadas as taxas de reação, em uma primeira tentativa de explicar os efeitos dos substratos, determinou-se a ordem de reação global (n) e as ordens de reação referentes a cada substrato, segundo a expressão:

$$-r_{\rm A} = k \operatorname{Pi}_{a}^{\alpha} \operatorname{Pi}_{e}^{\beta} \tag{13}$$

onde:

k é a constante da taxa, mol h<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>mmHg<sup>-1</sup>

Pia e Pie são as pressões parciais de água e éster, respectivamente, em mm Hg

 $\alpha$  e  $\beta$  são as ordens de reação em relação ao água, ao éster e à atividade de água, respectivamente.

A equação (13) foi resolvida numericamente, a partir dos dados da Tabela 9, utilizando a técnica de ajuste não linear para a estimativa dos parâmetros através do programa computacional POLYMATH versão 4.0. O critério estabelecido para a avaliação da qualidade do ajuste, foi a soma dos quadrados dos resíduos (SQR) entre o valor experimental e calculado pela equação ajustada. Os valores dos parâmetros obtidos foram:

$$k = 0.02 \text{ mol h}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{mmHg}^{-1}$$
  
 $\alpha = 0.2$   
 $\beta = 0.74$   
 $SQR = 1.3 \times 10^{-8}$ 

O valor da soma dos quadrados dos resíduos da ordem de  $10^{-8}$  indica que o erro é de  $10^{-4}$ , sugerindo-nos desta forma que o modelo utilizado se ajusta bem aos valores experimentais. Em relação ao efeito dos substratos, alguns comentários podem ser feitos em virtude dos valores dos coeficientes  $\alpha$  e  $\beta$ . A reação é de ordem 0,74 com respeito ao éster (acetato de etila) e de 0,2 com relação à água. Na Figura 33, pode-se observar que a medida que aumenta a concentração da água no sistema, para valores fixos de concentração de éster, aumenta também a taxa de reação, mas este efeito é muito maior para o aumentos na concentração de éster.



Figura 33. Efeito da concentração da água sobre a taxa de reação para o tempo de 1,5 h durante a hidrólise de acetato de etila para concentrações de éster (pressão parcial) ---- 14,24 mmHg; ---- 25,00 mmHg, ---- 42,40 mmHg e -- $\nabla$ -- 73,10 mmHg. Vazão total de 54 mL/min à temperatura de 318 K.

Este comportamento comprova a dependência da enzima pela água, que além de ser substrato, é responsável também pela manutenção da conformação catalítica da enzima LAMARE e LEGOY, 1995). Então, como a água é um dos reagentes e ao mesmo tempo é responsável pela atividade catalítica da enzima a sua contribuição poderia ser dividida em duas partes: uma como reagente, Pi<sub>a</sub>, e outra responsável pela manutenção da atividade da enzima (atividade de água,  $A_w$ ), mas ainda não foi possível encontrar uma equação que explique fisicamente esta dependência. A ordem global da reação (n =  $\alpha + \beta$ ) foi determinada como 0,94 (a reação é aproximadamente de primeira ordem), ou seja, a reação depende da concentração dos substratos.

Quando a concentração de substrato é pequena, a taxa de reações enzimáticas em fase aquosa de sístemas que seguem a lei de Michaelis-Menten é proporcional à concentração de substrato. Ainda não é possível dizer se essa reação segue um modelo do tipo de Michaelis-Menten. Este resultado será explorado mais detalhadamente no item 4.3.2.6. Na Figura 34 são apresentados de forma global os efeitos da concentração dos substratos sobre a taxa de reação em um gráfico tridimensional, no qual pode-se observar que efetivamente, um aumento na concentração dos substratos produz um aumento na taxa de reação. Este incremento na taxa é mais moderado em relação à concentração de água, mas ela praticamente duplica com o aumento da concentração de éster.



**Figura 34**. Efeito da concentração dos substratos sobre a taxa de reação na hidrólise de acetato de etila em fase gasosa a 318 K, usando Lipozyme IM.

#### 4.3.2.5 Efeito da temperatura sobre a taxa de reação

Com o propósito de se ter informação sobre a estabilidade do biocatalisador foram realizados vários experimentos de hidrólise de acetato de etila com valores diferentes de temperatura: 308, 318, 328 e 338 K (Figura 35). Esses resultados foram úteis na estimativa dos parâmetros termodinâmicos da reação, particularmente a energia de ativação. Em todos os experimentos manteve-se constante a vazão total dos gases (54,0 mL/min) bem como a concentração de acetato de etila (14,24 mmHg) e da água (17,54 mmHg).



Figura 35. Efeito da temperatura sobre a taxa de reação na hidrólise de acetato de etila.; --▲--308 K; --●-- 318 K; --■-- 328 K e --♦-- 338 K. Vazão total de 54,0 mL/min, 150 mg de Lipozyme IM e pressões parciais de 14,24 mmHg para o acetato de etila e 17,539 mmHg, para a água.

Após meia hora de reação, um incremento da temperatura de reação de 308 à 328 K resultou em um aumento da taxa de reação (Figura 35). Contudo, perda de atividade do catalisador foi observada a 328 K, ao cabo de 1,5 h de reação aproximadamente, sugerindo uma possível desativação parcial do biocatalisador devido ao aumento da temperatura. KIM e RHEE (1992) e YANG e RUSSELL (1996) obtiveram também aumentos da conversão com incrementos de temperatura 298 à 313 K, ao estudar reações enzimáticas em fase gasosa, mas acima de 323 observaram desativação do biocatalisador. O biocatalisador no experimento a 338 K mostrou perda de atividade maior em relação aos outros três experimentos, realizados a 308, 318 e 328 K, durante a primeira meia hora de reação.

Dois fatores opostos concorrem para a variação da taxa de reação: a temperatura e a atividade de água. Se a enzima não desnatura nas temperaturas de reação, então, um aumento da temperatura resulta no aumento da taxa de reação. Por outro lado, um aumento de temperatura para uma pressão parcial fixa de água resulta numa diminuição da atividade de água, levando à perda de atividade da enzima. Este comportamento pode ser observado mais claramente na Figura 36 para 1,5 h de reação, que foi o tempo escolhido para o calculo das taxas de reação.



Figura 36. Taxa de reação em função da temperatura durante a hidrólise de acetato de etila em fase gasosa ao cabo de 1,5 h. Vazão total dos gases de 54,0 ml/min, 150 mg de Lipozyme IM e pressões parciais de 14,24 mmHg e 17,54 mmHg, para o acetato de etila e a água, respectivamente.

De acordo com PARVARESH *et al.* (1992), os quais obtiveram resultados semelhantes, aos discutidos anteriormente, ao estudar reações de transesterificação com lípase e cutinase, esta perda de atividade deve ser analisada não apenas pelo efeito da temperatura mas como um efeito combinado entre a temperatura de reação e o teor de água da enzima, posto que essa perda de umidade inicial leva conseqüentemente a uma atividade menor, mas a enzima se comporta de forma mais estável.

Resultados similares aos mostrados na Figura 36 foram reportados por BOY *et al.* (1999) ao estabelecer um método para avaliar a estabilidade de diversas enzimas em fase aquosa, incluindo a Lipozyme IM. Eles apresentam um gráfico de atividade específica em função da temperatura, no qual a Lipozyme IM é desnaturada a partir de 313 K.

Neste contexto, GANDHI *et al.* (1997), estudaram a estabilidade da Lipozyme IM incubando 500 mg de enzima em água em diferentes temperaturas (303, 323 e 333 K) e concluíram, que ao cabo de uma hora aproximadamente a enzima tinha perdido 70 % da sua atividade, quando a temperatura variou de 303 a 333 K. No entanto, nas condições do presente experimento, aumento de temperatura resulta também em diminuição na atividade de água e não é possível afirmar, no momento, se o catalisador esta desativando ou se a diminuição na taxa é devida a diminuição na atividade de água. Esta perda de atividade de água é considerada partindo de que no início da reação há perda de água pelo sistema como mostrado na Figura 37 e como o suporte da Lipozyme IM é altamente hidrofilico pode estar ocorrendo uma competição pela água entre a enzima e o suporte.



Figura 37. Teor de água na corrente de He na saída do reator (--\*--) em relação à cinética da reação de hidrólise de acetato de etila mantendo-se constante a concentração de água (17,54 mmHg) para diferentes concentrações de éster: --**u**-- 14,24 mmHg; --**u**-- 25,0 mmHg, --**u**-- 42,4 mmHg e -- $\nabla$ -- 73,1 mmHg. A vazão total e a temperatura foram de 54 mL/min e 318 K, respectivamente.

#### 4.3.2.6 Cinética enzimática e mecanismo de reação

A reação de hidrólise de acetato de etila em fase gasosa deve ser tratada como um sistema Bi-Bi (sistemas reacionais onde participam uma enzima e dois substratos) porque a água nesse caso, ao contrário dos sistemas em fase aquosa, não se encontra em excesso.

A princípio, pode-se considerar que os substratos representados por A e B (Figura 38) se ligam aleatoriamente a enzima, mas a ligação do primeiro substrato pode afetar a afinidade da enzima pelo segundo substrato. Neste caso os produtos P e Q também são liberados aleatoriamente.



Figura 38. Esquema do mecanismo aleatório de interação enzima substrato no qual cada substrato e produto correspondente A, B, P e Q representam a água, o éster, o etanol e o ácido carboxílico, respectivamente. Os sítios de enlace para cada substrato estão disponíveis na enzima (SEGEL, 1975b).

Este tipo de reações não pode ser descrita pela equação de Michaelis-Menten pois essa equação é válida para reações catalíticas que ocorrem em sistemas homogêneos (JAEGER e REETZ, 1998). De acordo com SEGEL (1975a) as reações Bi-Bi podem ser estudadas considerando um equilíbrio rápido entre os substratos e a enzima seguido pela decomposição do complexo enzima-substrato (EAB), formado entre a enzima e os dois substratos, nos produtos (Figura 39).



Figura 39. Esquema de reação para um sistema em equilíbrio tipo Bi-Bi.

Para o estudo deste sistema pode-se considerar a existência de equilíbrio rápido entre os reagentes e a enzima. Este mecanismo considera que A e B são reagentes, onde B é o substrato e A pode ser um co-substrato, uma co-enzima ou um ativador e que estes reagentes podem-se ligar aleatoriamente à enzima, sendo que ao se ligar o primeiro substrato, a constante de dissociação para o segundo substrato é alterada pelo fator  $\alpha$ . Desta forma, a constante aparente de Michaelis-Menten (Km) em relação a cada um dos substratos pode ser definida como:

$$Km_A = \alpha K_A \tag{14}$$

$$Km_B = \alpha K_B$$
 (15)

Assume-se ainda que a etapa limitante da reação é a decomposição do complexo EAB, representada por:

 $EAB \xrightarrow{k_p} E + P$ 

Considerando que A representa a água e B representa o acetato de etila, é possível escrever uma equação para o cálculo da taxa que represente este mecanismo, da seguinte forma:

$$r_{A} = \frac{k_{0} \exp^{-ka/kT} [A][B]}{(\alpha K_{A} K_{B} + \alpha K_{A}[B] + \alpha K_{B}[A] + [A][B])}$$
(16)

onde:

k<sub>0</sub> é o fator pré-exponencial

E<sub>a</sub> é a energia de ativação, kJ/mol

T é temperatura da reação, K

R é a constante dos gases, 8,31 J/mol K

[A] e [B] são as pressões parciais de água e éster, respectivamente, Pa

KA e KB são constantes de equilíbrio, mmHg

 $\alpha$  é um fator que expressa a relação de ligação de um substrato respeito ao outro com a enzima

A equação (16) foi resolvida numericamente utilizando a técnica de ajuste não linear para a estimativa dos parâmetros através do programa computacional POLYMATH versão 4.0. O critério estabelecido para a avaliação da qualidade do ajuste foi a soma dos quadrados dos resíduos (SQR) entre o valor experimental e aquele calculado a partir da equação ajustada. Os valores dos parâmetros obtidos foram:

 $k_0 = 23,19 \text{ mol } h^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Ea = 24,8 kJ mol<sup>-1</sup>  $K_A = 0,68 \text{ mmHg}$  $K_B = 18,7 \text{ mmHg}$  $\alpha = 12,3$  De acordo com estes resultados podemos considerar que o ajuste foi bem sucedido uma vez que a soma dos quadrados dos resíduos foi de  $1,742 \times 10^{-8}$ , obtendo-se um erro de  $10^{-4}$ . Valor de  $\alpha$  maior que 1 significa que a ligação do primeiro substrato com a enzima diminui a afinidade da enzima pelo segundo substrato e, conseqüentemente, a constante K aparente para cada substrato A ou B aumenta com o aumento da concentração do outro substrato (SEGEL, 1975a).

BOY *et al.* (1999) reportaram valores de Ea para a Lipozyme IM da ordem de 60,2 kJ/mol para reação de hidrólise de triglicerídeos em fase aquosa. Neste caso a Ea calculada em fase gasosa (24,8 kJ/mol) é aproximadamente, 40 % da energia de ativação em fase aquosa. YANG e RUSSELL (1996) observaram resultados similares para álcool desidrogenase, onde a Ea=7,47 kJ/mol em fase gasosa foi 50 % da Ea=14 kJ/mol em fase aquosa.

Uma análise mais detalhada dos valores das constantes  $\alpha$ , K<sub>A</sub> e K<sub>B</sub> nos sugere que no mecanismo proposto existe um caminho preferencial para a formação dos produtos. Os valores de cada constante são mostrados a seguir:

 $K_{A}=k_{.1}/k_{1}=0,68 \text{ mmHg}$   $K_{B}=k_{.3}/k_{3}=18,7 \text{ mmHg}$   $Km_{A}=\alpha K_{A}=k_{.2}/k_{2}=8,364 \text{ mmHg}$  $Km_{B}=\alpha K_{B}=k_{.4}/k_{4}=230,01 \text{ mmHg}$ 

de modo que  $K_A$  é aproximadamente 30 vezes menor que  $K_B$  o que sugere que  $k_1 > k_3$  e portanto a primeira etapa de reação corresponde à formação do complexo EA. Esta suposição também é sustentada ao analisar os valores de Km para cada substrato, sendo Km<sub>A</sub> também 30 vezes menor que Km<sub>B</sub> e ,portanto, para fins práticos o mecanismo geral para este tipo de reação transforma-se em um Bi-Bi seqüencial ordenado (Ordered Bi-Bi) constituído pelas seguintes etapas:  $E + A \quad \longleftarrow \quad EA$  $EA + B \quad \longleftarrow \quad EAB$  $EAB \quad \longmapsto \quad E + P$ 

O baixo valor da constante  $Km_A$  em relação a  $Km_B$  indica uma alta afinidade da enzima pela água. Desta forma, a ligação de A (água) com a enzima causa mudança conformacional nesta que expõe um sítio de ligação para B (éster) conforme é apresentado na Figura 40.



Figura 40. Esquema do mecanismo sequencial ordenado de interação enzima substrato onde cada substrato e produto correspondente A, B, P e Q representam a água, o éster, o etanol e o ácido carboxílico, respectivamente (SEGEL, 1975b).

#### 4.3.2.7 Estudo do efeito do comprimento da cadeia do substrato

Experimentos foram realizados para estudar o efeito do comprimento da cadeia do substrato sobre o desempenho da reação. Neste contexto, estudamos a hidrólise de dois ésteres com ordem decrescente de polaridade, isto é acetato de etila com maior polaridade que o acetato de butila. Nos ensaios mantiveram-se constantes os valores de temperatura de reação (318 K), a

massa de catalisador (150 mg de Lipozyme IM), o fluxo total dos gases (54 mL/min) e a concentração de água (17,54 mm Hg).

Os substratos (ésteres) são líquidos em sua forma natural e portanto eles precisam ser vaporizados para serem utilizados na reação em fase gasosa. Mas, como as pressões de vapor destes compostos são muito diferentes tentou-se trabalhar à temperatura de saturação mais baixa possível, para desta forma obter concentrações de acetato de butila de 8,2 mmHg a 293 K e de acetato de etila de 14,24 mmHg a 263 K. Esta problemática de fato nos impõs restrições na realização dos testes experimentais no tocante à concentração na fase vapor. A temperatura de 293 K é o limite superior para a temperatura do saturador, posto que acima de 293 K não é possível garantir a total saturação do vapor obtido no borbulhador e nem que haverá condensação a jusante do saturador, uma vez que a temperatura do laboratório era em torno de 298 K.

Na Figura 41 são apresentados os resultados cinéticos para as duas reações estudadas. Os valores das conversões quando atingiu-se o estado estacionário foi de 10,6% para o acetato de etila e aproximadamente de 20% para o acetato de butila. As reações apresentaram comportamentos bem diferenciados o que nos permite confirmar que a atividade das enzimas depende da natureza dos substratos e do comprimento de suas cadeias, conforme anteriormente discutido por PARVARESH *et al.* (1992).

86



**Figura 41**. Efeito do substrato sobre o desempenho da reação de hidrólise de acetato de etila mantendo-se constante a pressão parcial de água (17,54 mmHg). Reação com acetato de etila com uma pressão parcial de 14,24 mmHg (-- $\blacksquare$ --); e reação com acetato de butila com uma pressão parcial de 8,2 mmHg (-- $\blacksquare$ --). Vazão total dos gases de 54 mL/min, e a temperatura de reação foi de 318 K.

No início do experimento, a taxa da reação foi maior para o acetato de etila (de cadeia menor) mas a conversão caiu rapidamente de 40 para aproximadamente 11,5% na primeira hora de reação, enquanto que para o acetato de butila (de cadeia maior), apesar de atingir uma conversão menor no início da reação, apresentou maior estabilidade atingindo valores de conversão de aproximadamente 20% ao cabo dos vinte primeiros minutos de reação.

Os altos valores de conversão do acetato de butila uma vez atingido o estado estacionário, quando comparados com os valores obtidos para o acetato de etila podem ser explicados ao se considerar um aumento da afinidade da enzima pelo substrato quando diminui sua polaridade, para condições de hidratação adequadas. ROBERT *et al.* (1992) recomendam trabalhar com valores de atividade entre 0,2 e 0,7, sendo que no nosso caso para as reações aqui estudadas trabalhamos com atividade de água de 0,24.

LAMARE *et al.* (1997), ao estudarem reações de transesterificação e hidrólise de ésteres, reportaram que quando a disponibilidade de água no sítio ativo era limitada, a reatividade dos compostos apolares diminuía devido à ausência de moléculas polares necessárias para interagir com os resíduos polares ou para permitir que as interações hidrofóbicas tomassem lugar. Eles também observaram a hidrólise de propionato de metila e de etila em fase gasosa quando usaram de atividade de água de 0,2.

# CAPÍTULO V

### **CONCLUSÕES E SUGESTÕES**

#### **5.1 CONCLUSÕES**

De acordo com os resultados obtidos ao longo deste trabalho podemos formular as seguintes conclusões:

- A enzima Lipozyme IM pode ser usada para a hidrólise de acetato de etila em fase gasosa em sistema operado continuamente nas condições experimentais utilizadas, sendo possível a sua reutilização sob condições de hidratação adequadas.
- Confirmou-se que a concentração de água mostrou ser um parâmetro fundamental no processo, apresentando efeito positivo na hidratação da enzima e, conseqüentemente, melhor desempenho da reação.
- 3. No caso particular deste trabalho, onde estudamos uma reação de hidrólise, e portanto a água participa na reação, não foi possível dividir a sua contribuição em duas partes: uma como reagente e a outra como responsável pela manutenção da atividade catalítica da enzima utilizada.
- 4. Ao estudar os efeitos da concentração dos substratos, fixando a concentração de um deles e variando a concentração do outro e vice-versa, observou-se que aumentos na concentração destes favoreceram a taxa de reação, obtendo-se uma ordem global de reação de aproximadamente 1 (primeira ordem).

- 5. Aumentos da temperatura da reação de 308K a 328K resultaram também em aumento da conversão no início da reação de hidrólise de acetato de etila, observando-se nesta última temperatura perda de atividade a partir de 1,5 horas de reação. A temperatura de 338K o biocatalisador apresentou desativação muito maior quando comparada com os casos anteriores observando-se como a termoestabilidade da enzima a diminui ao longo do tempo de reação.
- 6. Foi proposto um mecanismo de reação Bi-Bi (uma reação com uma enzima e dois substratos), que a princípio, parece representar coerentemente a hidrólise de acetato de etila em fase gasosa e cujo modelo ajustado para diferentes temperaturas de reação nos permitiu determinar a energia de ativação da reação (Ea) como sendo igual a 24,8 kJ/mol.

### 5.2 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros recomenda-se realizar as seguintes atividades:

- Ensaios de adsorção no sistema experimental de substratos e produtos para esclarecer problemas com relação ao ácido acético e determinar experimentalmente os coeficientes de partição para os substratos.
- Estudos cinéticos com biocatalisadores preparados com enzimas com alto grau de pureza em suportes com tamanho de poros controlado.
- Implementar modificações técnicas no sistema experimental com finalidade de se ter um sistema mais versátil para o estudo dos processos biocatalíticos em fase gasosa. Resulta conveniente se trabalhar com quantidades maiores de água.
- Estudos de modelagem e simulação matemática destes sistemas para poder predizer o seu comportamento em diferentes condições.

## CAPÍTULO VI

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALVES, G. M. "Síntese de ésteres de aroma por lipases microbianas em meio livre de solvente orgânico". Dissertação de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- 2. BALCÃO, V.M.; PAIVA, A.L. and MALCATA, F.X. Bioreactor with immobilized lipases: State of the art. Enzyme and Microbial Technology, vol. 18, Pp. 392-416, 1996.
- 3. BARTON, J.W.; REED, E.K. and DAVISON, B.H. Gas-phase enzyme catalysis using immobilized lipase for ester production. <u>Biotechniques</u>, vol. 11(10), Pp. 747-750, 1997.
- BÁRZANA, E.; KAREL, M.; KLIBANOV, A. Enzyme-catalyzed gas phase reactions. <u>Applied Biochemistry and Biotechnology</u>, vol. 15, Pp. 25-34, 1987.
- 5. BARZANA, E.; KAREL, M.; KLIBANOV, A. Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous phase. <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol. 34, Pp.1178-1185, 1989.
- BÁRZANA, E. Gas phase biosensors. <u>Advances in Biochemistry Engineering</u>, vol. 53, Pp. 1-15, 1996.
- 7. BORGSTON, B.; BROCKMAN, H.L. Lipases. Elsevier, Amsterdam. 1984.

- BOY, M.; DOMINIK, A.; VOSS, H. Fast determination of biocatalyst process stability. <u>Process Biochemistry</u>, vol. 34, Pp 535-547, 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. <u>Analytical.</u> <u>Biochemistry</u>, vol. 72, Pp. 248-254, 1976.
- 10. BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. Journal of the American Chemical Society, vol. 60, Pp. 309, 1938.
- 11. CASTRO, H. F.; SILVA, M.L.C.P. and SILVA, G.L.J.P. Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase. <u>Brazilian Journal of Chemical</u> <u>Engineering</u>, vol. 17 (4-7) Pp. 849-857, 2000.
- 12. CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P.C. and PEREIRA, E.B. Influence of substrate partition coefficient on the performance of lipase catalyzed synthesis of citronellyl acetate by alcoholysis. <u>Brazilian Journal of Chemical Engineering</u>, vol. 17 (4-7) Pp. 859-865, 2000.
- CARVALHO, I. B.; SAMPAIO, T. C.; BARREIROS, S. Solvent effects on the catalytic activity of subtilisin suspended in compressed gases. <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol. 49, Pp. 399-404, 1996.
- CLAON, P. A.; AKOH, C. C. Enzymatic synthesis of geraniol acetate in n-hexane with Candida antartica lipase. Journal Of The American Oil Chemists Society, vol.71(6), Pp. 575-578, 1994.

- 15. CONDORET, J-S.; VANKAN, S. and JOULIA, X. Prediction of water adsorption curves for heterogeneous biocatalysis in organic and supercritical solvents. <u>Chemical</u> <u>Engineering Science</u>, vol. 52 (2), Pp. 213-220, 1997.
- 16. DORDICK, J.S. Enzymatic catalysis in monophasis organic solvents. Enzyme and Microbial Technology, vol.11, Pp. 194-211, 1989.
- GANDHI, N.N.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B.; MUKESH, D. Deactivation of immobilized lipozyme: effect of butanol, temperature and water content. <u>Chemical</u> <u>Engineering Journal</u>, vol. 65, Pp 159-164, 1997.
- GOLDBERG, M.; THOMAS, D.; LEGOY, M. D. The control of lipase-catalized transesterification reaction rates. <u>European Journal Biotechnology</u>, vol. 190, Pp. 603-609, 1990.
- HALLING, P.J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, test, and recomendations for experimental desing and analysis. <u>Enzyme and</u> <u>Microbial Technology</u>, vol. 16, Pp. 178-206, 1994.
- HAMSTRA, R.S.; MURRIS, M.R. and TRAPER, J. The influence of immobilization and reduced water activity on gaseous-alkene oxidation by *Micobacterium* PY1 and *Xanthobacter* PY2 in a gas-solid bioreactor. <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol.29, Pp. 884-891, 1987.

- HIDATA, N. and MATSUMOTO, T. Gaseous ethanol oxidation by immobilized enzyme in a packed bed reactor. <u>Industrial and Engineering Chemistry Research</u>, vol. 39 (4), Pp. 909-915, 2000.
- 22. HIRANO, J. The present situation of biotechnology in the oleochemical industry. Chemical Economy and Engineering Review, vol. 18(7-8), Pp. 9-13, 1986.
- 23. HOU, C.T. Propylene oxide production from propylene by immobilized whole cells of *Methylosimus* sp. CRL 31 in a gas-solid bioreactor. <u>Applied Microbiology and</u> <u>Biotechnology</u>, vol. 19, Pp. 1-4, 1984.
- 24. HWANG, S.O.; PARK, Y. H. Ethyl acetate production in a batch bioreactor. <u>Bioprocess</u> <u>Engineering</u>, vol. 17, Pp. 51-54. 1997.
- 25. HWANG, S.O.; PARK, Y. H. Ethyl acetate production in the gas phase. <u>Biotechnology</u> Letters, vol. 16(4), Pp. 379-384. 1994.
- 26. HWANG, S.O.; TRANTOLO, D.J. WISE, D.L. Gas phase acetaldehyde production in a continuous bioreactor. <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol.42, Pp. 667-673. 1993.
- 27. HWANG, S.O. "Gas Phase Enzyme Biocatalytic Processing". Ph. D. Thesis, Northeastern University, Boston, MA, USA, 1992.
- JAEGER, K-E. and REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. <u>Trends in Biotechnology</u>, vol. 16, Pp 396-403, 1998.

- 29. KAZANDJIAN, R. Z.; DORDICK, J. S.; KLIBANOV, A. Enzymatic analyses in organic solvents. <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol. 28, Pp 417-421, 1986.
- 30. KENEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Enzyme Imobilization. In Biotechnology: Enzyme technology, vol. 7a, Cap. 7, Pp. 347-404. VCH, Alemanha. 1987.
- 31. KIM, K.K.; SONG, H.K.; SHIN, D.H.; HWANG, K.Y. and SUH, S.W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. <u>Structure</u>, vol. 5, Pp 173-185, 1997.
- KIM, C. and RHEE, S. "Enzymatic Conversion of Etanol into Acetaldehyde in a Gas-Solid Bioreactor". <u>Biotechnology Letters</u>, vol. 14(11), Pp 1059-1064, 1992.
- 33. KRISHNA, S.H. and KARANTH, N.G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A kinetic study. <u>Biochimica et Biophysica Acta</u>, vol. 1547, Pp. 262-267, 2001.
- 34. LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol. 20, Pp.81-87, 1987.
- 35. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. <u>Nature</u> (LONDON), vol. 227. Pp. 680-685, 1970.
- 36. LAMARE, S. and LEGOY M.D. Working at controlled water activity in a continuous process: the gas/solid system as a solution. <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol. 45, Pp. 387-397, 1995.

- 37. LAMARE, S.; ROBERT, L.; LEGOY M.D. Kinetic Studies of Fusarium solani pisi cutinase used in a gas/solid system: Transesterfication and Hydrolysis Reactions. <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol. 56(1), Pp. 1-8, 1997.
- LORTIE, R. Enzyme catalyzed esterification. <u>Biotechnology Advances</u>, vol. 15(1), Pp. 1-15, 1997.
- 39. MARTIN, E. "Reação de acoplamento oxidativo de metano sobre catalisadores de Li/MgO-SiO". Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- MAUGARD, T.; LAMARE, S. and LEGOY, M.D. Gas phase biotransformation reaction catalyzed by baker's yeast. <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol. 73 (2), Pp. 164-168, 2001.
- 41. NAGAMOTO, H.; YASUDA, T.; INOUE, H. Effect of organic solvents on the activity of glucoamylase. <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol. 28, Pp. 1172-1177, 1986.
- 42. NIGEL, A and VULFSON, E.N. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity?. Enzyme and Microbial Technology, vol. 27, Pp 108-113, 2000.
- 43. ORSAT, B.; DRTINA, G. J.; WILLIAMS, M.G.; KLIBANOV, A. M. Effect of support material and enzyme pretreatment on enantioselectivity of immobilized subtilisin in organic solvents. <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol. 44, Pp. 1265-1269, 1993.

- 44. PAIVA, A.L. and MALCATA, F.X. Integration of reaction and separation with lipases: An overview. Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic, vol. 3, Pp. 99-109, 1997.
- 45. PARVARESH, F.; ROBERT, H.; THOMAS, D.; LEGOY, M.D. Gas phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes. <u>Biotechnology and</u> <u>Bioengineering</u>, vol. 39, Pp. 467-473, 1992.
- 46. PIMENTEL, M.C.B.; KRIEGER, N.; COELHO, L. C. C. B. Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. <u>Applied Biochemistry and Biotechnology</u>, vol.49, Pp. 59-74, 1994.
- 47. PETROPOULOS, J. H. Restrict diffusion of molecular in porous affinity chromatography adsorbents. <u>Bioseparation</u>, vol.1, Pp. 69-88, 1990.
- 48. PULVIN, S.; LEGOY, M. D.; LORTIE, R.; PENSA, M.; THOMAS, D. Enzyme technology and gas phase catalysis: Alcohol dehydrogenase example. <u>Biotechnology</u> <u>Letters</u>, vol. 8(11), Pp. 783-784, 1986.
- 49. ROBERT, H.; LAMRE, S.; PARVARESH, F.; LEGOY, M.D. The Role of Water in gaseous biocatalysis. <u>Biocatalysis in Non-conventional Media</u>, Pp 85-92, 1992.
- 50. RODRIGUES, M. S. M. K. Produção de Lipases e sua Aplicação na Eliminação de Resinas em Lignocelulósicos, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, 1997.

- 51. RUSSELL, A. J. and YANG, F.X. Catalyze gas-phase reactions with enzyme. CHEMTECH, vol. (October), Pp 24-27, 1996.
- SARDA, L. and DESNUELLE, P. <u>Biochim. Biophys. Acta</u>, vol. 30, Pp. 513-521, 1958.
   In: BALCÃO, V.M.; PAIVA, A.L. and MALCATA, F.X. Bioreactor with immobilized lipases: State of the art. <u>Enzyme and Microbial technology</u>, vol. 18, Pp. 392-416, 1996.
- 53. SCHRAG, J.D.; LI, Y.; CYGLER, M.; LANG, D.; BURGDORF, T.; HECHT, H-J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T.J.; OLIVER, J.D.; STRICKLAND, L.C.; DUNAWAY, C.M.; LARSON, S.B.; DAY, J. and McPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. <u>Structure</u>, vol. 5, Pp 187-202, 1997.
- 54. SEGEL, I.H. Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. John Wiley & Sons, New York, USA, 1975a.
- SEGEL, I.H. Biochemical Calculations. 2.Ed. John Wiley & Sons, New York, USA, 1975b.
- 56. SIDJABAT, O.; TRIMM, D. L.; WAINWRIGHT, M. S. The preparations and properties of magnesia catalyst supports. <u>Journal of Chemical Technology and Biotechnology</u>, vol.56, Pp. 241, 1993.
- 57. TURNER, N. A. and VULFSON, E. N. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity?. Enzyme and Microbial Technlogy, vol. 27, Pp. 108-113, 2000.
- 58. UCHIYAMA, H.; ORUGI, K.; YAGI, O. and KOKUFUTA, E. Trichlororthylene degradation by immobilized resting-cells of *Methylocystis* sp. M in a gas-solid bioreactor. <u>Biotechnology Letters</u>, vol. 14 (7), Pp. 619-622, 1992.
- 59. VALIETY, R. H.; HALLING, P. J.; PEILOW, A. R. Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media. Effects of supports, loading and enzyme preparation. <u>European Journal of Biochemistry</u>. vol. 222, Pp. 461-466, 1994.
- 60. WINKEL, U. K. & STUCKAMANNM, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. <u>Journal of Bacteriology</u>, vol. 138, n. 3, Pp. 633-670, 1979.
- 61. YANG, F.X. and RUSSELL, A. J. The role of hydration in enzyme ativity and stability:
  1. water sortion by alcohol dehydrogenase in a continuous gas phase reactor. <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol. 49, Pp. 709-716, 1996(a).
- 62. YANG, F.X. and RUSSELL, A. J. The role of hydration in enzyme activity and stability:
  2. Alcohol dehydrogenase activity and stability in a continuous gas phase reactor.
  <u>Biotechnology and Bioengineering</u>, vol. 49, Pp. 709-716, 1996(b).
- 63. YAGI, T.; TSUDA, M.; MORI, Y.; INOKUCHI, H. Journal of American Chemical Society, vol. 91, Pp 2801, 1969.
- 64. ZAKS, A.; KLIBANOV, A. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. <u>Proceedings</u> of the National Academy Science. USA, vol. 82, Pp. 3192-3196, 1985.

## ANEXOS

**Tabela A1.** Ângulos 2θ e intensidades relativas dos principais planos de difração de raios-X dos materiais estudados segundo "Joint Comittee of Powder Difraction Standards" (JCPDS).

Compostos	Ângulos 2 $ heta$ (graus) e intensidades relativas				
Mg(OH) <sub>2</sub>	42,8/x	62,3/5	78,3/2	37,0/1	74,7/1
MgO	42,9/100	18,5/5	58,7/3	62,3/1	72,0/1
MgSiO4	39,7/59	40,0/33	41,8/15	52,3/60	61,9/27
SiO <sub>2</sub>	20,9/16	26,6/100	39,5/8	50,1/13	59,9/9

**0**---

Razão nominal MgO/SiO <sub>2</sub>	Temperatura (°C)	V <sub>m</sub> (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	$N_s  imes 10^{-19}$	$D_s \times 10^{-17} \ (g^{-1} m^{-2})$
	30	0,0384	1,0320	0,5798
0:1	60	0,0276	0,7417	0,0796
	100	0,1162	0,3123	0,1754
	30	1,2570	3,3780	8,4450
1:0	60	1,0135	2,7240	6,8100
	100	0,8713	2,3414	5,8535
	30	0,4096	1,1010	0,9255
	60	0,3014	0,8099	0,6806
	100	0,1904	0,5117	0,4299
	30	0,7181	1,9297	1,1625
1:4	60	0,4683	1,2585	0,7511
	100	0,2349	0,6312	3,8027
	30	2,5831	6,9415	8,0715
4:1	60	2,2109	5,9414	6,9086
in the second	100	1,9151	5,1465	5,9843
	30	1,0868	2,9205	1,7593
8:1	60	0,8383	2,2528	1,3571
	100	0,7596	2,0412	1,2296

Tabela A2. Quimiosorção: volume de  $CO_2$  adsorvido  $(V_m)$ , número de sítios ativos  $(N_s)$  e densidade de sítios básicos  $(D_s)$ .

Tempo (h)	Taxas de reação ×10 <sup>4</sup> com éster com 14,24 mmHg	Taxas de reação×10 <sup>4</sup> com éster com 25,0 mmHg	Taxas de reação×10 <sup>4</sup> com éster com 42,4 mmHg	Taxas de reação×10 <sup>4</sup> com éster com 73,1 mmHg
0,0833	3,6155	4,3586	6,2136	7,4564
0,3333	2,0438	2,0296	3,7331	5,5502
0,5833	1,5850	1,7795	2,9934	5,2934
0,8333	1,4674	1,5847	2,8948	4,3531
1,0833	1,3399	1,5469	2,9589	4,0912
1,3333	1,3299	1,2067	2,2783	4,0555
1,5833	1,1064	1,2154	2,3030	3,4349
1,8333	1,1577	1,1515	1,6668	3,2393
2,0833	1,0418	1,2271	1,8646	1,9130
2,3333	45 million		45 tai	2,2531

Tabela A3. Taxas de reação para 4,58 mmHg de água.

Tempo (h)	Taxas de reação×10 <sup>4</sup> com éster com 14,24 mmHg	Taxas de reação×10 <sup>4</sup> com éster com 25,0 mmHg	Taxas de reação×10 <sup>4</sup> com éster com 42,4 mmHg	Taxas de reação×10 <sup>4</sup> com éster com 73,1 mmHg
0,0833	6,0384	6,8991	8,0685	6,0384
0,3333	3,0391	4,4728	6,0161	3,0391
0,5833	2,5303	3,2385	5,2611	2,5303
0,8333	1,7807	2,9687	4,2511	1,7807
1,0833	1,7754	1,8005	3,6134	1,7754
1,3333	1,8667	1,7803	3,4043	1,8667
1,5833	1,7214	2,1255	3,4757	1,7214
1,8333	1,5469	2,0466	3,4731	1,5469
2,0833	1,6225	1,7852	3,4723	1,6225

Tabela A4. Taxas de reação para 9,21 mmHg de água.

.

Tempo (h)	Taxas de reação×10 <sup>4</sup> com éster com 14,24 mmHg	Taxas de reação×10 <sup>4</sup> com éster com 25,0 mmHg	Taxas de reação×10 <sup>4</sup> com éster com 42,4 mmHg	Taxas de reação×10 <sup>4</sup> com éster com 73,1 mmHg
0,0833	6,8419	8,1270	11,1402	10,5851
0,3333	3,5625	3,8498	5,3802	5,6539
0,5833	2,8437	2,9397	4,3348	5,1948
0,8333	2,0521	2,5384	3,7923	4,8292
1,0833	1,9163	2,3436	2,2931	104 ME MA
1,3333	1,8285	2,0034	1,9972	4,9227
1,5833	1,7821	1,6021	2,1797	4,5146
1,8333	1,5734	1,7039	2,0318	4,0725
2,0833	1,6993	1,5353	2,0959	

Tabela A5. Taxas de reação para 17,54 mmHg de água.