

Universidade Federal do Rio de Janeiro

ALINE RICHETTI

**ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE PALMITATO DE 2-ETILEXILA
EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE**

EQ/UFRJ

2009

ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE PALMITATO DE 2-ETILEXILA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

ALINE RICHETTI

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos Requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite

Octávio Augusto Ceva Antunes

Rio de Janeiro

Março de 2009

ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE PALMITATO DE 2-ETILEXILA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

Aline Richetti

Dissertação de Mestrado submetida ao corpo docente da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Programa de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada por:

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.
(EQ/UFRJ) (Orientadora)

Octávio Augusto Ceva Antunes, D.Sc.
(IQ/UFRJ) (Orientador)

Helen Treichel, D.Sc.
(URI – Campus Erechim)

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.
(EQ/UFRJ)

Maria Helena Miguez da Rocha Leão, D.Sc.
(EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, março de 2009

R529e Richetti, Aline

Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente / Aline Richetti. - 2009.

84 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2009.

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite
Octávio Augusto Ceva Antunes

1. Esterificação enzimática. 2. Palmitato de 2-etilexila. 3. Química – Dissertações.

I. Leite – Selma Gomes Ferreira; Antunes - Octávio Augusto Ceva (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. III. Título.

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfo e glória, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito, que nem fazem muito e nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota”

(Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

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

A meus pais, Paulo e Maria Elena, por todo apoio e amor que foram a mim dedicados. Agradeço a vocês por tudo. É a vocês, principalmente, que eu dedico esta conquista.

Aos meus irmãos Cláudia, Alice e Paulinho que sempre me apoiaram e me ajudaram.

Ao Tito por ser um dos grandes incentivos da minha vida, por seu amor, carinho, apoio e pela ajuda de sempre.

Aos meus orientadores, Selma e Octávio, pela confiança e dedicação que depositaram em mim, oportunizando o desenvolvimento desse trabalho; e pela ajuda, amizade e paciência.

Em especial às Profas. Débora de Oliveira e Helen Treichel, por toda a ajuda e disposição durante a realização deste trabalho, por compartilharem de seus conhecimentos, pela paciência e amizade.

Aos Profs. Rogério, Marco, Natália e Daniel, por toda a contribuição dada para a realização deste trabalho.

À minha amiga e colega de Laboratório Andréa, pela ajuda, amizade e carinho, pelo ombro amigo nos momentos difíceis e por me transmitir força e confiança para seguir em frente.

Aos amigos e colegas de Laboratório Karen, Ingrid, Nakédia, Daniela, Rodrigo, Jane e Jaqueline, especialmente Paulo, Gabriel, Ivana e Lilian pela amizade, incentivo e ajuda.

Aos meus amigos e colegas de Laboratório de Biotecnologia Lindomar e leda pela amizade, auxílio, companheirismo e risadas.

A empresa Jovii Cosmecêutica pelo fornecimento do material para realização deste trabalho.

À Capes, CNPq, FAPERJ e Finep pelo financiamento à pesquisa.

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

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE PALMITATO DE 2-ETILEXILA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

Aline Richetti

Março/2009

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite

Octávio Augusto Ceva Antunes

O objetivo deste trabalho foi investigar a produção enzimática de palmitato de 2-etilexila utilizando como substratos ácido palmítico e 2-etil-hexanol e como catalisadores as lipases imobilizadas comerciais Novozym 435 e Lipozyme RM IM em sistema livre de solvente. Foram realizados dois planejamentos experimentais sequenciais com a Lipozyme RM IM e três planejamentos experimentais com Novozym 435, a fim de otimizar a produção enzimática de palmitato de 2-etilexila. Os resultados obtidos no segundo planejamento para a Lipozyme RM IM mostram que a condição experimental razão molar ácido:álcool 1:3, 70°C, 150rpm, 10% (p/p substratos) de enzima e 6 horas de reação conduziram às maiores conversões, obtendo-se cerca de 95% de produto. Utilizando a Novozym 435 os resultados obtidos no terceiro planejamento mostram que a condição experimental razão molar ácido:álcool 1:5,5, 70°C, 150rpm, 10,5% (p/p substratos) de enzima e 6 horas de reação conduziram às maiores conversões, na ordem de 93%. A partir destas condições o estudo cinético foi realizado com as duas enzimas, avaliando o efeito da razão molar ácido:álcool, da concentração de enzima e da temperatura no processo. De forma geral, os resultados obtidos na avaliação cinética permitem concluir que com excesso de álcool, concentrações relativamente baixas de enzima e temperaturas mais elevadas, além de tempo reduzido de reação, conduziram à conversões em palmitato de 2-etilexila próximas de 100%.

Abstract of Dissertation presented to Chemical and Biochemical Process Technology Program, as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Chemical and Biochemical Process Technology Program.

ENZYMATIC PRODUCTION OF 2-ETHYLHEXYL PALMITATE IN SOLVENT-FREE SYSTEM

Aline Richetti

March/2009

Advisors: Selma Gomes Ferreira Leite

Octávio Augusto Ceva Antunes

The objective of this work was to investigate the 2-ethylhexyl palmitate enzymatic production using as substrates acid palmitid and 2-ethyl-hexanol and as biocatalyst two commercial immobilized lipases (Novozym 435 and Lipozyme RM IM) in a solvent-free system. Two experimental design were accomplished in sequence with Lipozyme RM IM and three experimental design with Novozym 435, in orden to optimize the 2-ethylhexyl palmitate enzymatic production. The results obtained in the second experimental design for the Lipozyme RM IM show that the experimental condition of substrates molar ratio of 1:3, 70°C, 150rpm, enzyme concentration of 10% (w/w of substrates) and 6 hours of reaction leds to the highest conversion, about 95% of product. Using Novozym 435 the results obtained in the third experimental design showed that the experimental condition, of substrates molar ratio of 1:5.5, 70°C, 150rpm, enzyme concentration of 10.5% (w/w substrates) and 6 hours of reaction led to the highest conversion, in order of 93%. From these conditions, the kinetics study was carried out with, the two enzymes, evaluating the effects of acid:alcohol molar ratio, enzyme concentration and temperature on process conversion. In a general form, the results obtained in the kinetics evaluation alow to conclude that an excess of alcohol, relatively lower of enzyme concentration and temperature of 70°C, and a reduced time of reaction, led to 2-ethylhexyl palmitate conversions near of 100%.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Os substratos: 2-etil-hexanol e ácido palmítico	4
3.2 O catalisador: Lipases	6
3.3 Reações catalisadas por lipases	9
3.4 Reações de esterificação catalisadas por lipases	11
3.4.1 Reações de esterificação catalisadas por lipases em solvente orgânico	12
3.4.2 Reações de esterificação catalisadas por lipases em sistema livre de solvente.....	14
3.5 Esterificação enzimática de ésteres de ácidos graxos	15
3.6 Esterificação enzimática de ácido palmítico e 2-etil-hexanol.....	16
3.7 Considerações Parciais.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 MATERIAL	19
4.1.1 Enzimas.....	19
4.1.2 Reagentes	19
4.1.3 Substratos	20
4.1.4 Padrão Químico	20
4.1.5 Equipamentos	20
4.2 MÉTODOS	20
4.2.1 Avaliação da solubilidade dos substratos em diferentes solventes orgânicos.....	21
4.2.2 Seleção da lipase a ser utilizada como biocatalisador nas reações	21
4.2.3 Produção enzimática de palmitato de 2-etilexila	21
4.2.4 Determinação do tempo reacional.....	22

4.2.5 Determinação da atividade de esterificação das lipases	22
4.2.6 Recuperação das lipases após a reação.....	23
4.2.7 Metodologia analítica para determinação da conversão da reação	24
4.2.7.1 Preparação das amostras para análise	24
4.2.7.2 Análise.....	24
4.2.8 Otimização da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila	24
4.2.9 Estudo cinético da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 Testes preliminares para a síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila .	29
5.1.1 Avaliação da solubilidade entre os substratos.....	29
5.1.2 Determinação da lipase a ser utilizada como biocatalisador.....	31
5.1.3 Determinação do tempo reacional	32
5.2 Otimização da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila utilizando as lipases Novozym 435 e Lipozyme RM IM em sistema livre de solvente	33
5.3 Cinética da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente	48
5.3.1 Testes de amostragem	48
5.3.2 Efeito da razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol na cinética de produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente	49
5.3.3 Efeito da concentração de enzima na cinética de produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente.....	52
5.3.4 Efeito da temperatura na cinética de produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente.....	55
5.4 Considerações finais	58
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	60
6.1 Conclusões.....	60
6.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
APÊNDICE A – ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	67
APÊNDICE B – DETALHAMENTO DOS RESULTADOS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do 2-etil-hexanol.....	4
Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido palmítico.....	5
Figura 3 - Esterificação do ácido palmítico com um álcool monohídrico.....	5
Figura 4 - Fórmula estrutural do palmitato de 2-etilexila.....	16
Figura 5 - Esterificação enzimática para produção de palmitato de 2-etilexila. Razão molar A.P:E.H 1:1, concentração de enzima 10% [E] (p/p substratos), (1:5 p/v) de éter de petróleo em relação ao ácido palmítico, 10 horas de reação adição de sílica gel (1g), 24 horas de reação e 40°C.....	31
Figura 6 - Cinética da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente e com a adição de solvente n-hexano (1:3,5 p/v) em relação ao ácido palmítico, na temperatura de 60°C, razão molar A.P:E.H 1:1, concentração da enzima de 10% [E] (p/p substratos).....	33
Figura 7 - Superfície de resposta para produção de palmitato de 2-etilexila utilizando Novozym 435 referentes ao primeiro planejamento experimental. Conversão em função da temperatura e razão molar (a), da temperatura e concentração da enzima (b) e da razão molar e concentração de enzima (c)..	36
Figura 8 - Superfície de resposta para produção de palmitato de 2-etilexila utilizando Lipozyme RM IM referentes ao primeiro planejamento experimental. Conversão em função da temperatura e razão molar (a), da temperatura e concentração da enzima (b) e da razão molar e concentração de enzima (c)..	37
Figura 9 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de palmitato de 2-etilexila utilizando a enzima Lipozyme RM IM em função da razão molar e concentração da enzima – Segundo planejamento experimental.	41
Figura 10 - Gráfico de Pareto da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila utilizando a enzima Novozym 435 em função das variáveis estudadas no segundo planejamento experimental.....	42
Figura 11 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de 2-etihexil palmitato utilizando a enzima Novozym 435 em função da razão molar e concentração da enzima – Terceiro planejamento experimental.....	45

Figura 12 – Efeito da razão molar sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila à temperatura de 70°C, concentração de enzima de 10% (p/p substratos) e agitação em 150rpm em sistema livre de solvente utilizando a enzima Novozym 435.	51
Figura 13 – Efeito da razão molar sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila à temperatura de 70°C, concentração de enzima de 10% (p/p substratos) e agitação em 150rpm em sistema livre de solvente utilizando a enzima Lipozyme RM IM.	51
Figura 14 – Efeito da concentração de enzima sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila à razão molar ácido palmítico:etil-hexanol 1:6, temperatura de 70°C e agitação de 150rpm em sistema livre de solvente utilizando a enzima Novozym 435.....	53
Figura 15 – Efeito da concentração de enzima sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila à razão molar ácido palmítico:etil-hexanol 1:6, temperatura de 70°C e agitação de 150rpm em sistema livre de solvente utilizando a enzima Lipozyme RM IM.	53
Figura 16 - Efeito da temperatura sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila à razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol de 1:6, concentração de enzima de 10% (p/p substratos) e agitação de 150rpm em sistema livre de solvente utilizando a enzima Novozym 435.	57
Figura 17 - Efeito da temperatura sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila à razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol de 1:6, concentração de enzima de 10% (p/p substratos) e agitação de 150 rpm em sistema livre de solvente utilizando a enzima Lipozyme RM IM.....	57
Figura A.1 – Cromatogramas do tempo de retenção do palmitato de 2-etilexila (a), ácido palmítico (b) e 2-etil-hexanol (c).....	68
Figura A.2 – Curvas de calibração para palmitato de 2-etilexila (a) e para o ácido palmítico (b).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis e níveis estudados no primeiro planejamento fatorial completo 2^3 para produção enzimática de palmitato de 2-etilexila.	25
Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados no segundo planejamento fatorial completo 2^2 , para otimização das condições para produção enzimática palmitato de 2-etilexila.	26
Tabela 3 - Variáveis e níveis estudados no terceiro planejamento fatorial completo 2^2 , para otimização das condições para produção enzimática palmitato de 2-etilexila, utilizando a enzima Novozym 435.	26
Tabela 4 – Efeito da razão molar entre os substratos na produção enzimática de palmitato de 2-etilexila.	27
Tabela 5 – Efeito da concentração de enzima na produção enzimática de palmitato de 2-etilexila.	27
Tabela 6 – Efeito da temperatura na produção enzimática de palmitato de 2-etilexila.	27
Tabela 7 - Teste de solubilidade em sistema livre de solvente.	30
Tabela 8 - Teste de solubilidade utilizando solvente orgânico n-hexano.	30
Tabela 9 - Teste de solubilidade utilizando solvente orgânico éter de petróleo.	30
Tabela 10 - Teste de solubilidade utilizando solvente orgânico iso-octano. ...	30
Tabela 11 - Matriz do primeiro planejamento experimental 2^3 realizado (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em palmitato de 2-etilexila.	34
Tabela 12 - Coeficientes de regressão para a esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila – Primeiro planejamento experimental.	35
Tabela 13 - Análise de variância para a produção de palmitato de 2-etilexila no primeiro planejamento experimental.	35
Tabela 14 - Matriz do segundo planejamento experimental (valores codificados e reais) com respostas em conversão em palmitato de 2-etilexila nas reações conduzidas em 70°C, agitação de 150rpm e tempo de reação de 6 horas.	39

Tabela 15 - Análise de variância para a produção de palmitato de 2-etilexila no segundo planejamento experimental utilizando a enzima Lipozyme RM IM. ...	40
Tabela 16 - Conversão em palmitato de 2-etilexila utilizando a enzima Lipozyme RM IM: valores experimentais, preditos pelo modelo e desvios relativos.	42
Tabela 17 - Matriz do terceiro planejamento experimental (valores codificados e reais), com respostas em conversão em palmitato de 2-etilexila nas reações conduzidas a 70°C, agitação de 150rpm e tempo de reação de 6 horas, utilizando a enzima Novozym 435.	43
Tabela 18 - Análise de variância para a produção de palmitato de 2-etilexila no terceiro planejamento experimental utilizando a enzima Novozym 435.	44
Tabela 19 - Conversão em palmitato de 2-etilexila utilizando a enzima Novozym 435: valores experimentais, preditos pelo modelo e desvios relativos.	46
Tabela 20 - Comparação entre amostra destrutiva e não-destrutiva no tempo de 8 horas de reação utilizando Novozym 435.	48
Tabela 21 - Taxa inicial de reação em função da razão molar na esterificação enzimática em sistema livre de solvente utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM.	52
Tabela 22 - Taxa inicial de reação em função da concentração de enzima na esterificação enzimática em sistema livre de solvente utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM.	55
Tabela 23 - Taxa inicial de reação em função da temperatura na esterificação enzimática em sistema livre de solvente utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM.	58
Tabela A.1 - Padrão e substratos analisados e seus tempos de retenção.	67
Tabela A.2 - Quantidades de solução estoques utilizadas do produto de palmitato de 2-etilexila e do substrato ácido palmítico para preparo das soluções padrões em diferentes concentrações.	69

Tabela B.1 - Concentração dos substratos ácido palmítico e 2-etil-hexanol (mmol) utilizados nos testes de avaliação de solubilidade em sistema livre de solvente e utilizando solventes orgânicos n-hexano, éter de petróleo e iso-octano.....	72
Tabela B.2 - Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila avaliando-se o biocatalisador a ser utilizado no meio reacional, razão molar A.P/E.H 1:1, 10% de enzima [E] (p/p substratos), (1:5 p/v) de éter de petróleo em relação ao ácido palmítico, 10 horas de reação adição de sílica gel (1g), 24 horas de reação e 40°C, utilizando as lipases imobilizadas Novozym 435 e Lipozyme RM IM.....	72
Tabela B.3 - Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila na cinética da produção enzimática palmitato de 2-etilexila utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM em sistema livre de solvente e com a adição de solvente n-hexano (1:3,5 p/v) em relação ao ácido palmítico, na temperatura de 60°C, razão molar A.P:E.H 1:1, concentração da enzima de 10% [E] (p/p substratos).....	73
Tabela B.4 - Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila (%) para o primeiro planejamento experimental utilizando Novozym 435.....	73
Tabela B.5 - Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila (%) para o primeiro planejamento experimental utilizando Lipozyme RM IM.....	74
Tabela B.6 - Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila (%) para o segundo planejamento experimental utilizando Novozym 435.....	74
Tabela B.7 - Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila (%) para o segundo planejamento experimental utilizando Lipozyme RM IM.....	75
Tabela B.8 - Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila (%) para o terceiro planejamento experimental utilizando Novozym 435.....	75

Tabela B.9 - Resultados experimentais da conversão de palmitato de 2-etilexila (%) para a cinética avaliando o efeito da razão molar com Novozym 435.....	76
Tabela B.10 - Resultados experimentais da conversão de palmitato de 2-etilexila (%) para a cinética avaliando o efeito da razão molar com Lipozyme RM IM.....	77
Tabela B.11 - Resultados experimentais da conversão de palmitato de 2-etilexila (%) para a cinética avaliando o efeito da concentração de enzima com Novozym 435.....	78
Tabela B.12 - Resultados experimentais da conversão de palmitato de 2-etilexila (%) para a cinética avaliando o efeito da concentração de enzima com Lipozyme RM IM.....	79
Tabela B.13 - Resultados experimentais da conversão de palmitato de 2-etilexila (%) para a cinética avaliando o efeito da temperatura com Novozym 435.....	80
Tabela B.14 - Resultados experimentais da conversão de palmitato de 2-etilexila (%) para a cinética avaliando o efeito da temperatura com Lipozyme RM IM.....	81
Tabela B.15 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual nas reações de determinação da tempo reacional de síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente utilizando a enzima Novozym 435.....	82
Tabela B.16 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual nas reações de determinação da tempo reacional de síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente utilizando a enzima Lipozyme RM IM.....	82
Tabela B.17 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual nas reações de determinação da tempo reacional de síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila utilizando solvente n-hexano e a enzima Novozym 435.....	83
Tabela B.18 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual nas reações de determinação da tempo reacional de síntese	

enzimática de palmitato de 2-etilexila utilizando solvente n-hexano e a enzima Lipozyme RM IM.....	83
Tabela B.19 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual na produção de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente no 2º Planejamento Experimental utilizando a enzima Novozym 435.....	84
Tabela B.20 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual na produção de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente no 2º Planejamento Experimental utilizando a enzima Lipozyme RM IM.....	84
Tabela B.21 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual na produção de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente no 3º Planejamento Experimental utilizando a enzima Lipozyme RM IM.....	84

1. INTRODUÇÃO

Os ésteres são uma das mais importantes classes de compostos orgânicos que são sintetizados por vários mecanismos, entre eles a reação entre um álcool e ácido carboxílico, com a eliminação de água, denominada esterificação. Ésteres obtidos enzimaticamente a partir de ácidos graxos possuem também aplicações na obtenção de produtos para cuidado pessoal (Malcata et al., 1990; Hasan et al., 2006).

Ésteres de ácidos graxos de 2-etil hexanol tal como palmitato de 2-etilexila, objeto do presente estudo, têm várias aplicações em indústrias químicas, cosméticas, farmacêuticas e alimentares (He et al., 2002). A produção comercial do palmitato de 2-etilexila é baseada na esterificação por catálise química, o qual apresenta uma série de desvantagens, como por exemplo, a formação de muitos produtos indesejáveis e um alto consumo de energia (Tan et al., 2006).

Como alternativa ao processo convencional, a síntese enzimática – envolvendo lipases – apresenta diversas vantagens, pois, dependendo da metodologia e da enzima aplicadas, pode garantir maiores rendimentos em reações com temperaturas próximas da ambiente, o que proporciona produtos de qualidade, com economia de energia e reduzida ocorrência de subprodutos (Koblitz, 2003).

Lipases (Triacilglicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3), conhecidas como hidrolases, têm a função natural de catalisar a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa. Lipases atuam na interfase orgânica aquosa catalisando a hidrólise de ligações éster carboxilases presentes em acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes não aquosos. Nestas condições podem catalisar reações de esterificação, transesterificação ou interesterificação. Sua estabilidade a altas temperaturas, ampla faixa de atuação em relação ao pH e sua enâncio seletividade na resolução de misturas racêmicas tornam estas enzimas atraentes e versáteis (Freire e Castilho, 1999; Sharma et al., 2001).

As lipases são originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência (Saxena *et al.*, 2003). As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato e facilidade de produção em escala, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (Hasan *et al.*, 2006).

As lipases têm encontrado aplicações em diversos tipos de indústrias, tais como de alimentos, química fina (síntese de ésteres), tratamento de efluentes e farmacêutica (Maldonado, 2006).

O uso de lipases nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos eficientes processos executados pela natureza. A economia de energia e minimização da degradação térmica são provavelmente as maiores vantagens na substituição de tecnologias químicas atuais pelas biológicas (Hasan *et al.*, 2006).

Em meio orgânico, as lípases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Entre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres apresenta-se como uma vertente bastante promissora (Castro *et al.*, 2004).

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi investigar a produção enzimática de palmitato de 2-etilexila. Como objetivos específicos, pode-se citar: desenvolvimento de metodologia para produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema com solvente orgânico e na ausência do mesmo, estudo do efeito das variáveis do processo (razão molar, concentração de enzima e temperatura) empregando técnicas de planejamento experimental visando a otimização da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila e posterior estudo cinético da reação na condição experimental selecionada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte no que concerne à esterificação enzimática de ácidos graxos, na presença e ausência de solventes orgânicos. Com base no exposto anteriormente, levando em consideração os objetivos delineados para este trabalho, ênfase especial será dada ao sistema ácido palmítico e 2-etil-hexanol.

3.1 Os substratos: 2-etil-hexanol e ácido palmítico

O 2-etil hexanol é um solvente orgânico, miscível em quase todos os solventes orgânicos, e praticamente insolúvel em água. Sua principal aplicação é na produção de plastificantes, destacando-se o DOP (di-octil ftalato). Encontra utilização também como intermediário químico na produção de acrilatos, tensoativos, agente anti-espumante, fabricação de herbicidas, dispersante e molhante na moagem de pigmentos. Apresenta peso molecular de 130,23, ponto de ebulição de 183,5°C, e densidade de 0,828-0,834 g.cm-3 (www.elekeiroz.com.br). Sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 1.

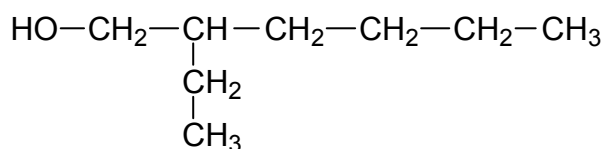


Figura 1 - Fórmula estrutural do 2-etil-hexanol.

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos de cadeias longas, encontrados em gorduras e óleos naturais. Podem ou não apresentar ligações duplas entre as moléculas de carbono, sendo classificados como saturados (nenhuma ligação dupla) ou insaturados (com ligações duplas). Os ácidos graxos insaturados podem ser monoinsaturados (apenas uma ligação dupla) ou poliinsaturados (mais de uma ligação dupla). Quimicamente, os ácidos graxos consistem de compostos que apresentam uma cadeia carbônica relativamente

longa, contendo em uma extremidade o grupo alquila – CH₃, e na outra extremidade o grupo carboxila – COOH.

Dentre os diversos ácidos graxos existentes e conhecidos, pode-se destacar o ácido n-hexadecanóico, comercialmente conhecido como ácido palmítico (Sales, 2006).

O ácido palmítico possui uma cadeia saturada com 15 carbonos e uma extremidade com COOH, perfazendo assim um total de 16 átomos de C, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 2.

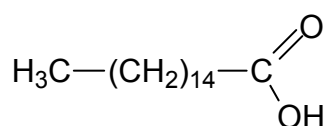


Figura 2 - Fórmula estrutural do ácido palmítico.

O ácido palmítico apresenta as seguintes propriedades físicas: sólido branco, com densidade de 0,855 g.cm⁻³, ponto de fusão de 62°C, e ponto de ebulição de 215°C, com peso molecular de 256,4 mol/mol.

Com relação às propriedades químicas, é insolúvel em água, pouco solúvel em etanol e acetona gelada, mas altamente solúvel em álcool, acetona e clorofórmio aquecido.

A principal fonte de obtenção do ácido palmítico é o óleo de palma, o qual contém cerca de 40% de ácido palmítico em sua composição.

O ácido palmítico pode participar de várias reações químicas, entre elas a reação de esterificação, obtendo-se assim um éster pela reação direta do ácido palmítico com um álcool monohídrico, conforme esquema apresentado na Figura 3 (Sales, 2006).

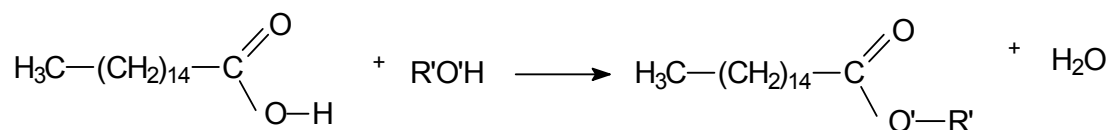


Figura 3 - Esterificação do ácido palmítico com um álcool monohídrico.

3.2 O catalisador: Lipases

Muito da história da bioquímica refere-se à pesquisa em enzimas. Em 1926, James Sumner's isolou e cristalizou a primeira enzima, a urease, que catalisa a hidrólise da uréia em NH_3 e CO_2 . Com exceção de alguns RNAs (ribozimas) que são catalisadores durante seu próprio processamento, todas as enzimas são proteínas, as quais aumentam a velocidade de uma reação por um fator de 10^{14} , mais do que uma reação não catalisada (Voet et al., 2000).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (Dalla-Vechia et al., 2004).

Atualmente, aproximadamente 4000 enzimas são conhecidas, e destas cerca de 200 são usadas comercialmente, sendo que a maioria das enzimas é de origem microbiana (Sharma et al., 2001).

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

As lipases são originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência (Saxena et al., 2003).

Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas, e na sua grande maioria, não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como "Generally Regarded As Safe ("GRAS") (Jaeger et al., 1994). Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por ele produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação (Vulfson, 1994).

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica principalmente por não requererem cofatores, atuarem em uma faixa de pH relativamente grande, serem muito estáveis nesse meio, apresentarem especificidade, regioseletividade e enantioseletividade. As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, mais recentemente, para aplicações industriais (Pandey et al., 1999; Gandhi, 1997, Hasan et al.; 2006).

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

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

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

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

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. As lipases são divididas em 3 grupos baseados em sua especificidade:

- Lipases não específicas (ex. produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Cromobacterium viscosum* e *Pseudomonas* sp.) que catalisam a hidrólise das moléculas de acilglicerol de forma aleatória, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares aqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior.

- Lipases 1,3 específicas (ex. produzidas por *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roqueforti*) liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 e formam, por esta razão, produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não-regiosseletivas, ou mesmo pelo catalisador químico inferior.

- Lipases ácido-graxo específicas são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em *cis* no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos insaturados, ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum*. Esta habilidade de produzir novos tipos de misturas de triacilgliceróis utilizando lipases regiospecíficas é uma das características mais interessantes para a aplicação no setor de óleos e gorduras (Castro et al., 2004).

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para

fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (Villeneuve et al., 2000).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (Dalla-Vecchia et al., 2004).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica. (Dalla-Vecchia et al., 2004).

Tan et al. (2006) estudaram um método prático para síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila por lipase imobilizada sobre membranas de fibra sintética em reator de batelada e obtiveram 95% de conversão. He et al. (2002) obtiveram 91% de conversão em palmitato de 2-etilexila imobilizando a enzima de *Candida* sp. 99-125 em uma espuma de poliuretano pré-tratada.

3.3 Reações catalisadas por lipases

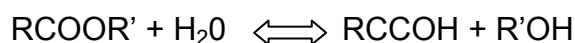
Com base no exposto anteriormente, pode-se concluir que as lipases são biocatalisadores versáteis, capazes de catalisar diferentes reações. Além de hidrolisar as ligações éster de triacilgliceróis com o consumo de água, são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (Kazlauskas e Bornscheuer, 1998; Gandhi, 1997; Yahya et al., 1998).

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas que são primeiramente responsáveis pela hidrólise de acilglicerídeos. Contudo, um número de

diferentes ésteres de altos e baixos pesos moleculares, tiol ésteres, amidas, etc, são utilizados como substratos por este único grupo de enzimas. O extenso campo para emprego, em uma variedade de reações, dotado de ampla especificidade do substrato, é também aumentado pelo fato destas lipases serem capazes de catalisar a reação reversa de síntese corretamente e eficientemente. De fato, algumas lipases são mais desejáveis para aplicações de síntese do que hidrólise.

As duas principais categorias na qual as lipases catalisam reações podem ser classificadas como:

- HIDRÓLISE



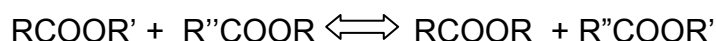
- SÍNTESE

Reações nesta categoria podem ser classificadas como:

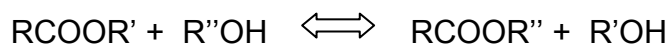
1) Esterificação:



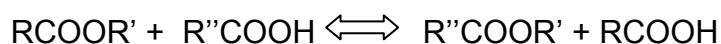
2) Interesterificação:



3) Alcoólise:



4) Acidólise:



As reações 2, 3 e 4 são frequentemente agrupadas dentro de um simples termo: TRANSESTERIFICAÇÃO (Gandhi, 1997).

3.4 Reações de esterificação catalisadas por lipases

A habilidade das lipases em catalisar a reação reversa de síntese pode ser aplicada na obtenção de inúmeros produtos de interesse. Misturas de esterificação geralmente contêm somente os substratos e enzimas sendo a água um sub-produto da reação. Uma grande quantidade de trabalhos tem sido apresentados na literatura no sentido de elucidar os mecanismos cinéticos de reações de esterificação catalisadas por lipases (Gandhi, 1997).

A água gerada durante a reação de esterificação é considerada o mais importante parâmetro que precisa ser controlado. Mesmo sob condições de baixa concentração de água, durante o curso da reação, 1mol de água é formado para cada mol de éster sintetizado. Como solventes hidrofílicos são geralmente evitados para prevenir a inativação da enzima, a formação desta fase aquosa pode ocorrer facilmente durante a reação. Remoção de água por diversas metodologias pode prevenir este fenômeno e ajudar na direção da reação para sua conclusão com altas conversões (Castro et al., 1995). Gubicza et al. (2000) estudaram a produção enzimática de isoamil acetato em hexano em larga escala com contínua remoção de água utilizando Novozym 435 e obtiveram 95,5% de conversão.

Industrialmente, a esterificação catalisada por lipases foi comercializada pela Unichema International para produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de pureza e qualidade, como o isopropil miristato, isopropil palmitato e palmitato de 2-etilexila, que são ingredientes empregados na formulação de cremes, cosméticos e outros produtos de higiene. O processo em questão é conduzido em reatores agitados, utilizando uma preparação de lipase imobilizada numa temperatura entre 50-70°C. A água gerada durante a reação de esterificação é removida por destilação a vapor. O processo permite a recuperação da preparação enzimática e sua reutilização em bateladas subseqüentes (Castro et al., 2004).

Lipases também podem catalisar a síntese de ésteres de poliglicerol. Esses tipos de ésteres são ingredientes multifuncionais, sendo usados como emulsificantes, substitutos de gorduras, como meio de solubilização de

vitaminas lipossolúveis para facilitar a incorporação destas em sistemas lipofóbicos, podendo ser utilizados também como aditivos em sorvetes, margarinas, coberturas, sobremesas e produtos de panificação (Castro et al., 2004).

3.4.1 Reações de esterificação catalisadas por lipases em solvente orgânico

Em meio orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água (Yahya et al., 1998). Entre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres apresenta-se como uma vertente bastante promissora, conforme atestam os processos já implantados industrialmente (Vulfson, 1994; Yahya et al., 1998, Castro e Anderson, 1995).

Inúmeros ésteres são considerados de grande importância na vida cotidiana. Produtos naturais, tais como triglicerídeos, fosfolipídeos, esteróides, aromatizantes e fragrâncias, apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas que possuem (Castro et al., 2004).

O critério mais importante na seleção de um solvente não-aquoso é sua compatibilidade com o catalisador e os substratos da reação. Para tal, o solvente orgânico não deve afetar fortemente a camada de hidratação da enzima, necessária para manter sua conformação nativa.

Solventes orgânicos usados em reações de esterificação catalisadas por lipases incluem benzeno, tolueno, n-hexano, ciclohexano, heptano, octano, iso-octano, nonano, éter de petróleo, acetona, clorofórmio, etil acetato, entre outros (Castro e Anderson, 1995). Em um sistema reacional utilizando heptano como solvente, Krishna et al. (2000) obtiveram 95% de conversão de isoamil acetato, utilizando 3g/L de Lipozyme IM-20 (34% p/p substratos), com concentração equimolar dos substratos (0,06M) a 40°C em 72 horas. As reportadas reações enzimáticas avaliadas usando tais solventes são fortemente afetadas pela polaridade do meio orgânico. Tal resultado segue o consenso de que alta

atividade do biocatalisador é atingida em solventes relativamente hidrofóbicos, e nenhuma ou baixa atividade é observada em solventes relativamente hidrofílicos (Castro e Anderson, 1995).

As lipases podem ser usadas para sintetizar ésteres sob condições com baixa disponibilidade de água. Contudo, solventes orgânicos não-polares, tal como hexano, heptano e ciclohexano, têm sido usados como meio de reação para a síntese de ésteres de diferentes ácidos graxos (Kumar et al., 2004).

Reações de esterificação de lipases em meio anidro (ex. solventes orgânicos e fluidos supercríticos), têm sido uma área de grande interesse nos últimos anos. Vija et al. (1997) investigaram a síntese de isoamil acetato em CO₂ supercrítico e hexano e obtiveram 95% de conversão utilizando Novozym 435 em n-hexano e com Lipolase em CO₂ supercrítico. A ausência de água elimina a competitiva reação de hidrólise. Além disso, a especificidade do substrato, regioseletividade e estereoseletividade da enzima podem ser controladas pela diversidade do meio reacional. Embora os solventes orgânicos, os quais são geralmente usados para reações catalisadas por lipases, sejam praticamente anidros, eles contêm traços de água. A água não somente afeta a enzima, mas também age como um nucleófilo competitivo (Gandhi et al., 2000).

Uma das mais sérias desvantagens do uso de enzimas em síntese orgânica é a pobre solubilidade da maioria dos compostos orgânicos com mais de quatro átomos de carbono onde o processo é executado em água. A água é um solvente pobre para quase todas as aplicações na indústria química, uma vez que muitos compostos orgânicos são instáveis em soluções aquosas. Além disso, a remoção de água é mais tediosa e cara do que onde solventes orgânicos são usados devido ao mais baixo ponto de ebulição destes. O uso de solventes orgânicos apresenta diversas vantagens, tais como: fácil recuperação do substrato e produtos com alta proporção; é possível o uso de substratos não-polares e em muitos casos as lipases são termodinamicamente mais ativas (Gotor-Fernández et al., 2006).

3.4.2 Reações de esterificação catalisadas por lipases em sistema livre de solvente

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

Sínteses sob condições em sistema livre de solvente, definidas como a situação na qual o reagente por si próprio atua como solvente, têm sido usadas comercialmente, e algumas investigações estão focadas no estudo de reações em sistemas livre de solvente. Embora altas conversões venham sendo obtidas em sistemas livres de solvente, as taxas de transferência de massa são limitadas. Sistemas no qual as lipases catalisam as reações são geralmente heterogêneos pelo fato do substrato ser solúvel no solvente e as lipases insolúveis. Então, a reação ocorre na interface entre a enzima e o solvente. A heterogeneidade da reação resulta na resistência da transferência de massa por causa das baixas taxas de difusão do reagente para o sítio ativo das enzimas (Kumar et al., 2004).

Güvenç et al. (2002) estudaram a produção enzimática de isoamil acetato em sistema livre de solvente. Utilizando a enzima comercial Novozym 435, em 6 horas de reação, razão molar ácido/álcool de 1:2, 30°C, 150rpm, com adição de 5% de enzima (g/g substratos), obtiveram 80% de conversão.

Reações executadas sob condições de sistema livre de solvente são processos ambientalmente favoráveis, uma vez que vários solventes são agentes poluidores (Santos et al., 2007). Utilizando a enzima comercial Novozym 435 em sistema livre de solvente, os autores citados anteriormente avaliaram a síntese de butil ésteres, onde a maior proporção obtida correspondeu a 49% utilizando ácido butírico como doador de grupos.

Há algumas desvantagens devido à utilização de solventes orgânicos em reações, tal como toxicidade, inflamabilidade, ou custos de recuperação e reciclagem. Por isso, um sistema livre de solvente, sem a adição de nenhum

solvente orgânico, pode ser uma escolha benéfica contra algum possível efeito prejudicial na estabilidade da enzima ou no seu equilíbrio termodinâmico causado por solventes orgânicos. Chang et al. (2006) estudaram a formação de hexil laurato, importante emoliente para aplicações cosméticas, utilizando a enzima Lipozyme IM 77 em sistema livre de solvente. As condições ótimas de síntese foram encontradas no tempo de reação de 40,6 minutos, 58,2°C, concentração da enzima de 25,4 mg/volume (0,196 BAUN) e um pH de 5,9, com 69,7% de conversão.

3.5 Esterificação enzimática de ésteres de ácidos graxos

Ésteres são uma das mais importantes classes de compostos orgânicos que são sintetizados por vários mecanismos, entre eles a reação entre um álcool e ácido carboxílico, com a eliminação de água, denominada esterificação (Malcata et al., 1990).

Os produtos de esterificação de ácidos de longas cadeias (12-20 átomos de carbono) com alcoóis de cadeia longa são usados como lubrificantes e plastificantes para maquinaria de alta precisão. Ésteres resultantes da reação de ácidos de longas cadeias (12-20 átomos de carbono) com alcoóis de cadeia curta (3-8 átomos de carbono) são usados como aditivos em indústrias de alimentos, detergentes, cosméticos e farmacêutica (Zaidi et al., 1995).

Arakawa et al. (1971) reportaram a primeira síntese enzimática de ascorbil laurato em solução aquosa. Enomoto et al. (1990) registraram uma patente de esterificação em solvente orgânico, e esterificações em álcool t-amil foram reportadas por Humeau et al. (1995) (Viklund et al., 2003).

Vários sistemas de esterificação enzimática de ésteres de ácidos graxos foram investigados: com ou sem solventes orgânicos e fluidos pressurizados, com enzimas imobilizadas ou não imobilizadas, ou outros meios.

Garcia et al. (1999) investigaram a cinética da esterificação de ácido palmítico catalisada por Novozym 435 para a síntese de isopropil palmitato, onde obtiveram 70% de conversão, em 2 horas de reação, temperatura de 65-75°C e concentração do biocatalisador de 2,2-7,83 wt%.

O palmitato de 2-etilexila, conhecido comercialmente como Ceraphyl 368, é um emoliente de toque não graxo de excelente espalhabilidade. É um líquido incolor lipossolúvel, usado na fabricação de cosméticos (www.jovii.com.br).

A Unichema Internacional (Espanha) lançou a produção de miristato de isopropil, palmitato de isopropil e palmitato de 2-etilexila para utilização como emoliente em produtos de cuidados pessoais, tal como cremes para a pele e cremes para bronzear, óleos de banho, etc. Lipase imobilizada de *Rhizomucor meihei* foi usada como biocatalisador. A empresa afirma que o uso de enzima no lugar do convencional catalisador ácido resulta em produtos de mais alta qualidade, exigindo menos esforços em processos de purificação (Hasan et al., 2006).

A produção comercial de palmitato de 2-etilexila é baseada na esterificação por catálise química, o qual tem uma série de desvantagens, como por exemplo, a formação de muitos produtos indesejáveis e um alto consumo de energia (Tan et al., 2006).

A literatura apresenta poucos estudos a respeito da esterificação enzimática para obtenção de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente e utilizando solvente orgânico. Podem ser citados os trabalhos de He et al. (2002), que estudaram a síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos de 2-etilhexil, especialmente palmitato de 2-etilexila, por lipase imobilizada de *Candida* sp. 99-125. Em um sistema livre de solvente, com 10% (p/p substratos) de lipase imobilizada, razão molar 2-etil-hexanol/ácido palmítico 1:1 e 40°C obtiveram 84% de conversão. Os mesmos autores estudaram a esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em um sistema contendo éter de petróleo, 10% (p/p substratos) de lipase imobilizada, razão molar álcool/ácido 1:1, a 40°C com sílica gel como adsorvente e obtiveram 91% de conversão.

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

de batelada. Obtiveram 95% de conversão utilizando razão molar ácido palmítico/2-etil-hexanol 1:1,3 - 1:1,5, 40°C, lipase usada na imobilização 5000 IU/g- 6000 IU/g membrana, em sistema com éter de petróleo, onde o reator de membrana pôde ser utilizado por 21 bateladas.

3.7 Considerações Parciais

Como visto, há poucos estudos na literatura a respeito da esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente e utilizando solventes orgânicos.

Neste contexto, o presente trabalho aborda a produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente, onde os efeitos de vários parâmetros na reação foram investigados, tal como razão molar ácido palmítico/2-etil-hexanol, concentração de enzima, tempo de reação e temperatura, utilizando as lipases comerciais imobilizadas de *C. antarctica* (Novozym 435) e *R. miehei* (Lipozyme RM IM).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental deste trabalho, relacionado à otimização da conversão da reação de esterificação enzimática para obtenção de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Enzimas

Foram utilizadas duas lipases comerciais de origem microbiana:

- Novozym 435 (*Candida antarctica*) imobilizada em resina acrílica macroporosa, adquirida da Novozymes S/A.
- Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*) imobilizada em resina de troca iônica, adquirida da Novozymes S/A.

4.1.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes:

- Hexano (Vetec);
- Iso- octano (Vetec);
- Éter de petróleo (Quimex);
- Álcool Etílico (Vetec);
- Acetona (F. Maia);
- Hidróxido de Sódio (Quimex).

Para as análises de HPLC, foram utilizados reagentes para UV/ HPLC – grau espectroscópico: acetona (Vetec) e álcool metílico (J.T. Baker).

Todos os reagentes, exceto o solvente orgânico n-hexano, o qual foi secado com sódio metálico para as reações de síntese, foram empregados sem nenhum tratamento adicional.

4.1.3 Substratos

Como substratos foram usados:

- Ácido láurico (Vetec) e álcool n-propílico (Vetec) para dosagem da atividade de esterificação das lipases;
- Ácido palmítico (conteúdo de água de 0,2) (Vetec) e 2-etil-hexanol (Merck - PS) (conteúdo de água de 0,1) para reações de esterificação.

4.1.4 Padrão Químico

O padrão químico para as análises, palmitato de 2-etilexila, conhecido comercialmente como Ceraphyl 368, foi gentilmente cedido pela Empresa Jovii Cosmecêutica, com sede em Cachoeirinha – RS.

4.1.5 Equipamentos

Dentre os equipamentos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, pode-se citar:

- Agitador magnético marca Fisatom, modelo 550;
- Balança Analítica marca Bel Engineering;
- Estufa modelo JP 101, marca J. Prolab;
- pHmetro digital PG 2000, marca Gehaka;
- Dessecador;
- Rotavapor marca Fisatom, modelo 550;
- Shaker marca Menoncin S/A;
- Freezer modelo Frost Free 270, marca Brastemp;
- HPLC marca Agilent 1100 series;
- Coluna Cromatográfica Zorbax C-18 - Fase Reversa, (4,6x250mm), 5 Micron, marca Agilent;
- Karl Fisher DL 50 Graphix, marca Mettler.

4.2 MÉTODOS

Nesta seção será apresentada a metodologia empregada em todas as etapas executadas visando a produção enzimática de palmitato de 2-etilexila.

4.2.1 Avaliação da solubilidade dos substratos em diferentes solventes orgânicos

Para a seleção dos solventes em função da solubilidade dos substratos, a seguinte metodologia foi utilizada: os substratos foram colocados em béqueres e agitados magneticamente, utilizando diferentes temperaturas e razões molares, na presença e ausência de solvente orgânico. Através da análise visual a solubilidade era avaliada, após dissolução dos substratos em cada solvente, por um tempo médio de 10 minutos.

As seguintes razões molares, temperaturas e solventes foram utilizados:

- Razões molares ácido palmítico/2-etil 1-hexanol: 1:1, 2:1, 4:1 e 6:1;
- Temperaturas: 25°, 40° e 60°C;
- Solventes: hexano, éter de petróleo e iso octano.

4.2.2 Seleção da lipase a ser utilizada como biocatalisador nas reações

As lipases comerciais imobilizadas Novozym 435 e Lipozyme RM IM foram escolhidas para testes iniciais da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila pelas suas propriedades catalíticas em reações de esterificação. As reações foram realizadas conforme metodologia de He et al. (2002). A razão molar ácido:álcool utilizada foi de (1:1) (R.M), temperatura de 40°C (T), concentração da enzima [E] 10%(p/p), volume de éter de petróleo (1:5 p/v ácido palmítico), 10 horas de reação tendo sido realizada a adição de 1g de sílica-gel e tempo total de reação de 24 horas.

4.2.3 Produção enzimática de palmitato de 2-etilexila

Como substratos para a produção enzimática de palmitato de 2-etilexila foram utilizados ácido palmítico e 2-etil-hexanol. Os substratos foram adicionados em erlemeyers de 50mL e todos os experimentos foram realizados em *shaker* com agitação constante de 150rpm. Foram conduzidas reações utilizando solvente orgânico, o qual foi adicionado juntamente com os substratos. Em paralelo, a mesma condição experimental foi testada em sistema livre de solvente. Após dissolução completa dos substratos, a enzima foi adicionada, previamente ativada durante 1 hora a 40°C em estufa e o tempo

reacional foi contado a partir da adição da mesma. Após o término do tempo de reação, tanto nos experimentos utilizando solvente orgânico quanto nos conduzidos em sistema livre de solvente, o biocatalisador foi filtrado com papel filtro, lavado com n-hexano e o solvente da amostra foi evaporado em rotavapor.

Nos experimentos onde foi avaliado o efeito da razão molar (R.M), da concentração de enzima [E] e da temperatura (T) na cinética da reação, alíquotas foram retiradas do meio reacional nos tempos pré-determinados.

Todas as amostras foram congeladas a - 20°C, para posterior análise.

4.2.4 Determinação do tempo reacional

Os tempos reacionais foram testados utilizando as duas lipases comerciais, Lipozyme RM IM e Novozym 435. Amostras foram retiradas nos tempos de 0, 4, 6, 12, 18 e 24 horas, visando a obtenção da cinética da reação. As quantidades utilizadas nas reações foram as seguintes: razão molar (1:1) (ácido palmítico/2-etil-hexanol) (R.M), temperatura de 60°C (T), concentração da enzima de 10% (p/p) [E]. Foram feitas reações em sistema livre de solvente e utilizando solvente n-hexano, o qual foi adicionado 5mL na reação (1:3,5 p/v) em relação ao ácido palmítico.

Antes do início da reação, a atividade de esterificação da enzima foi medida conforme procedimento descrito a seguir. Cessado o tempo reacional, a enzima foi filtrada e recuperada conforme procedimento descrito no item 4.2.6, e a atividade residual foi medida.

4.2.5 Determinação da atividade de esterificação das lipases

A atividade de esterificação das lipases foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação, entre o ácido láurico e álcool propílico com razão molar ácido-álcool de 3:1 à temperatura de 60°C, com a enzima a 5% (p/p) mantida sob agitação por 40 minutos. Antes do início da reação, a enzima foi ativada em estufa a temperatura de 40° C durante 1 hora. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator de vidro aberto, de 20mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho

termostático. Alíquotas de 150µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e diluídas em 20mL de acetona-etanol (1:1) com a finalidade de cessar a reação e de extração dos ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,01mol x l⁻¹, até pH 11.

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1µmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas (Oliveira et al., 2006).

Para o cálculo da atividade enzimática, empregou-se a Equação 1:

$$Atividade (U / g) = \frac{[(V_{NaOH}^0) - (V_{NaOH}^{40})]}{t.ma} \cdot N \cdot 10^3 \quad (1)$$

onde:

A= Atividade de esterificação (U/g);

V⁰_{NaOH} = Volume de NaOH utilizado na titulação do branco (mL);

V⁴⁰_{NaOH} = Volume de NaOH utilizado na titulação da amostra(mL);

N= Normalidade da solução;

t= tempo de reação (minutos);

ma= massa de amostra utilizada na reação (g).

4.2.6 Recuperação das lipases após a reação

Para a recuperação das enzimas ao final de cada reação, os biocatalisadores imobilizados foram separados do meio reacional por filtração com papel de filtro, em seguida, foram realizadas duas lavagens com 10mL de hexano P.A. Este procedimento é uma variação do método desenvolvido por Castro et al. (1995). Após a enzima foi mantida por 3 horas em estufa a 40°C, e por no mínimo 18 horas em dessecador, para retirada total do solvente (Langone, 1998).

A atividade enzimática foi determinada no início e no final das reações em todos os experimentos realizados, objetivando o acompanhamento da

alteração da atividade das enzimas, devido ao seu emprego na reação de esterificação de palmitato de 2-etilexila.

A medida da atividade enzimática é de grande importância, pois assim pode-se verificar se a enzima manteve sua atividade durante a reação. Neste trabalho, a atividade será reportada como atividade residual (%), definida como a razão entre o valor da atividade enzimática final e inicial.

4.2.7 Metodologia analítica para determinação da conversão da reação

4.2.7.1 Preparação das amostras para análise

As amostras obtidas foram preparadas diluindo-se toda a amostra em 50mL de fase móvel.

No estudo cinético onde foi avaliado o efeito da razão molar (R.M), da concentração de enzima [E] e da temperatura (T) na conversão, foram retiradas alíquotas (50 μ L) nos tempos pré-estabelecidos, e as mesmas foram diluídas em 450 μ L de fase móvel. Todas as amostras foram filtradas em filtro millex para posterior análise.

4.2.7.2 Análise

A quantificação foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), - Agilent 1100 séries, usando uma coluna modelo C-18 - Fase Reversa (Zorbax SB-C18), volume de injeção de 20 μ L, fluxo de 1mL/min, fase móvel acetona/metanol/água (70:25:5), temperatura da coluna 35°C, com detector de índice de refração.

Através do padrão químico foi feita a curva de calibração e os resultados foram calculados em termos de conversão do produto. Detalhes são apresentados no Apêndice A.

4.2.8 Otimização da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila

Na determinação das condições para produção enzimática de palmitato de 2-etilexila com as enzimas comerciais imobilizadas Novozym 435 e Lipozyme IM, foi utilizada uma estratégia seqüencial de planejamentos fatoriais.

Inicialmente foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos para cada enzima. Através de resultados obtidos em testes preliminares, o tempo de reação nesta etapa foi fixado em 6 horas. As faixas de temperatura (T), razão molar (R.M) e concentração de enzima [E] (p/p substratos) estudadas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Variáveis e níveis estudados no primeiro planejamento fatorial completo 2^3 para produção enzimática de palmitato de 2-etilexila.

Variáveis/Níveis	Temperatura (°C)	Razão Molar (mol/mol) (A.P/E.H)	[E] (%)(p/p substratos)
-1	40	1:1	1
0	55	1:2	5,5
1	70	1:3	10

A.P: ácido palmítico

E.H: 2-etil-hexanol

Os experimentos foram realizados conforme procedimento experimental descrito no item 4.2.3, onde os substratos, nas quantidades estabelecidas no planejamento de experimentos, foram adicionados em erlemeyers de 50mL, colocados em shaker com agitação constante de 150rpm e, após completa diluição, a enzima foi adicionada. O tempo reacional foi contado a partir da adição da enzima.

Após a análise estatística do primeiro planejamento, foi realizado um delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR), totalizando 11 experimentos. O tempo total de reação foi de 6 horas, fixado anteriormente. As faixas de razão molar (R.M) e concentração de enzima [E] (%)(p/p substratos) estudadas são apresentadas na Tabela 2.

Para a enzima Novozym 435, ainda foi realizado um terceiro planejamento fatorial completo 2^2 , com dois pontos axiais para cada variável independente e triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. O tempo total de reação foi de 6 horas e temperatura de 70°C, fixados

anteriormente. As faixas de razão molar (R.M) e concentração de enzima [E] (%) (p/p substratos) estudadas são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados no segundo planejamento fatorial completo 2^2 , para otimização das condições para produção enzimática palmitato de 2-etilexila.

Variáveis/Níveis	Razão Molar (mol/mol) (A.P/E.H)	[E] (%) (p/p substratos)
-1,41	1:1	3
-1	1:1,5	5
0	1:3	10
1	1:5	15
1,41	1:6	17

Tabela 3 - Variáveis e níveis estudados no terceiro planejamento fatorial completo 2^2 , para otimização das condições para produção enzimática palmitato de 2-etilexila, utilizando a enzima Novozym 435.

Variáveis/Níveis	Razão Molar (mol/mol) (A.P/E.H)	[E] (%) (p/p substratos)
-1,41	1:1	1
-1	1:2,3	3,8
0	1:5,5	10,5
1	1:8,7	17,2
1,41	1:10	20

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

4.2.9 Estudo cinético da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila

Após otimizar as condições experimentais das variáveis estudadas no processo enzimático, o efeito da razão molar (R.M), concentração da enzima

[E] e temperatura (T) na cinética da reação foi avaliado, utilizando as duas enzimas comerciais imobilizadas (Novozym 435 e Lipozyme IM).

Alíquotas foram retiradas do meio reacional nos tempos 0, 5, 10, 15 e 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas.

As razões molares (R.M), concentrações da enzima [E] (%) (p/p substratos) e temperaturas (T) utilizadas no estudo são apresentadas nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente.

Tabela 4 – Efeito da razão molar entre os substratos na produção enzimática de palmitato de 2-etilexila.

Temperatura (°C)	[E] (%) (p/p substratos)	Razão Molar (mol/mol) (A.P/E.H)
70	10	1:1; 1:3; 1:5; 1:7; 1:10

Tabela 5 – Efeito da concentração de enzima na produção enzimática de palmitato de 2-etilexila.

Temperatura (°C)	[E] (%) (p/p substratos)	Razão Molar (mol/mol) (A.P/E.H)
70	1; 5; 10; 15; 20	1:6

Tabela 6 – Efeito da temperatura na produção enzimática de palmitato de 2-etilexila.

Temperatura (°C)	[E] (%) (p/p substratos)	Razão Molar (mol/mol) (A.P/E.H)
30; 40; 50; 60; 70	10	1:6

4.2.10 Avaliação da velocidade da reação

Em cada uma das etapas do estudo cinético onde foram avaliados os efeitos da razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol, concentração da enzima e temperatura com as duas enzimas utilizadas Novozym 435 e Lipozyme RM IM foi realizada a avaliação da velocidade inicial de reação.

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

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

$$r = \left. \frac{dC}{dt} \right|_{t=0} \quad (2)$$

onde:

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

C = conversão de 2 etilhexil palmitato no tempo t (%);

C_0 = conversão de palmitato de 2-etilexila no tempo 0 (%);

t = tempo (min);

t_0 = tempo do início da reação (min).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo do processo de produção enzimática de palmitato de 2-etilexila utilizando as lipases comerciais imobilizadas de *C. antarctica* (Novozym 435) e *R. miehei* (Lipozyme RM IM).

5.1 Testes preliminares para a síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila

Nesta etapa foram realizados experimentos relacionados à escolha do solvente orgânico, escolha da enzima e determinação do tempo de reação a ser aplicado para a obtenção de dados no planejamento de experimentos.

Todas as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados referentes à reação são apresentados em termos de conversão em palmitato de 2-etilexila.

O detalhamento dos cálculos é apresentado no Apêndice A, juntamente com um cromatograma ilustrativo de uma amostra real.

5.1.1 Avaliação da solubilidade entre os substratos

Realizou-se, primeiramente, um teste a fim de avaliar a solubilidade dos substratos ácido palmítico (A.P) e 2-etil-hexanol (E.H) na ausência e na presença de solvente orgânico, utilizando diferentes temperaturas e razões molares entre os substratos. Foram testados os solventes orgânicos éter de petróleo, n-hexano e iso-octano, em função de trabalhos já apresentados na literatura (He et al., 2002).

Os resultados obtidos seguindo metodologia descrita no item 4.2.1, com agitação constante de 150rpm, diferentes razões molares, com as respectivas temperaturas utilizadas e quantidades necessárias de solvente orgânico usadas para total solubilização dos substratos são apresentadas nas Tabelas 7, 8, 9 e 10. Para uma melhor organização e visualização dos resultados experimentais nas tabelas abaixo, números foram atribuídos em relação à

solubilidade dos substratos, onde:

- 1- Substratos não solúveis;
- 2- Substratos pouco-solúveis;
- 3- Substratos totalmente solúveis.

Tabela 7 - Teste de solubilidade em sistema livre de solvente.

Razão Molar A.P/E.H	T. ambiente 25°C	Temperatura 40°C	Temperatura 60°C
1:1	1	2	3
2:1	1	2	3
4:1	1	2	2
6:1	1	1	*

* condição não testada

Tabela 8 - Teste de solubilidade utilizando solvente orgânico n-hexano.

Razão Molar A.P/E.H	T. ambiente 25°C	Temperatura 40°C	Temperatura 60°C	Solvente (mL) adicionado		
				T.A	40°C	60°C
1:1	1	3	*	1	0,8	*
2:1	*	3	*	*	2,4	*
4:1	*	3	3	*	5,4	0,4
6:1	*	*	3	*	*	0,6

* condição não testada

T.A = temperatura ambiente

Tabela 9 - Teste de solubilidade utilizando solvente orgânico éter de petróleo.

Razão Molar A.P/E.H	T. ambiente 25°C	Temperatura 40°C	Temperatura 60°C	Solvente (mL) adicionado		
				T.A	40°C	60°C
1:1	1	3	*	1	1,5	*
2:1	1	3	*	1	3,5	*
4:1	*	3	3	*	7,3	0,3
6:1	*	*	3	*	*	0,9

* condição não testada

Tabela 10 - Teste de solubilidade utilizando solvente orgânico iso-octano.

Razão Molar A.P/E.H	T. ambiente 25°C	Temperatura 40°C	Temperatura 60°C	Solvente (mL) adicionado		
				T.A	40°C	60°C
1:1	2	3	*	1	1,2	*
2:1	*	3	*	*	2,6	*
4:1	*	3	3	*	6,8	0,2
6:1	*	*	3	*	*	0,4

* condição não testada

Com base nos resultados apresentados, pode-se observar que os solventes n-hexano e iso-octano necessitaram menores quantidades para solubilizar os substratos. Como o n-hexano é um solvente de menor custo, além de apresentar temperatura normal de ebulição de 68,7°C, facilitando, desta forma, a execução de experimentos a temperaturas mais elevadas, o mesmo foi escolhido para ser utilizado nos experimentos na presença de solvente orgânico.

5.1.2 Determinação da lipase a ser utilizada como biocatalisador

Com relação à escolha da lipase, duas enzimas, as quais não são citadas na literatura para a produção enzimática de palmitato de 2-etilexila foram testadas: Novozym 435 e Lipozyme RM IM. Os experimentos foram realizados conforme metodologia descrita anteriormente para produção enzimática de palmitato de 2-etilexila. A concentração de enzima foi mantida na mesma proporção para os dois experimentos.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5, onde pode ser observado que, a conversão final encontrada foi de 89,5% utilizando a enzima Lipozyme RM IM e 97,4% com a Novozym 435.

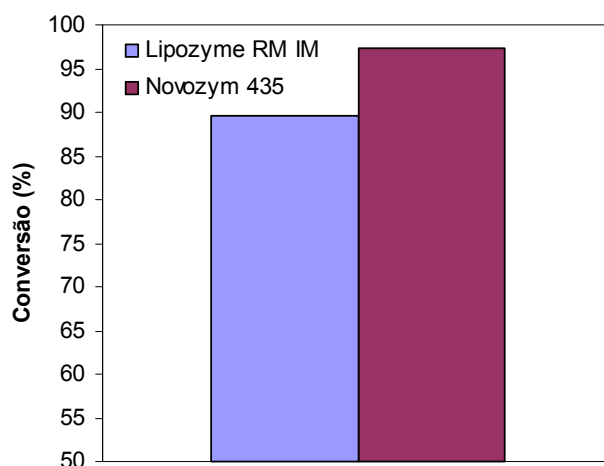


Figura 5 - Esterificação enzimática para produção de palmitato de 2-etilexila. Razão molar A.P:E.H 1:1, concentração de enzima 10% [E] (p/p substratos), (1:5 p/v) de éter de petróleo em relação ao ácido palmítico, 10 horas de reação adição de sílica gel (1g), 24 horas de reação e 40°C.

A condição utilizada no experimento foi a mesma condição otimizada por He et al. (2002), que obteve 91% de conversão utilizando razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol de 1:1, 10% de enzima [E] (p/p substratos), (1:5 p/v) de éter de petróleo em relação ao ácido palmítico, 10 horas de reação adição de sílica gel (1g) para adsorção de água, 24 horas de reação e 40°C, utilizando a lipase imobilizada de *Candida* sp. 99-125.

Com base nos resultados obtidos, os quais apresentaram uma boa conversão em palmitato de 2-etilexila com as duas enzimas utilizadas, Novozym 435 e Lipozyme RM IM, ambas foram selecionadas para os próximos experimentos.

5.1.3 Determinação do tempo reacional

Como etapa precedente à execução do planejamento de experimentos, alguns ensaios foram realizados, visando a avaliação preliminar da cinética da reação, com o tempo máximo de 24 horas, a fim de definir um tempo reacional ideal para a próxima etapa deste trabalho. Os experimentos foram realizados com as duas enzimas previamente testadas (Novozym 435 e Lipozyme RM IM). Cada teste foi conduzido em sistema livre de solvente e com a adição do solvente orgânico n-hexano, o qual foi selecionado no item 5.1.1. A cinética realizada foi destrutiva, com intervalos de tempos de 0, 4, 6, 12, 18 e 24 horas. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Figura 6. Os pontos estão unidos por uma linha contínua para melhor visualização.

A partir da Figura 6, pode-se verificar que o rendimento da reação, nos quatro sistemas estudados, aumenta com o tempo e atinge o ponto máximo no tempo de 6 horas.

A observação da figura permite verificar que uma boa conversão foi obtida, sem a utilização do solvente orgânico, sugerindo a utilização do sistema livre de solvente em todos os experimentos no planejamento de experimentos, com as duas enzimas previamente testadas.

Com base nos dados obtidos, os quais apresentaram uma boa conversão em palmitato de 2-etilexila, optou-se por utilizar para os próximos experimentos o tempo de reação de 6 horas, agitação de 150rpm e um sistema

livre de solvente, com as duas enzimas estudadas, Novozym 435 e Lipozyme RM IM.

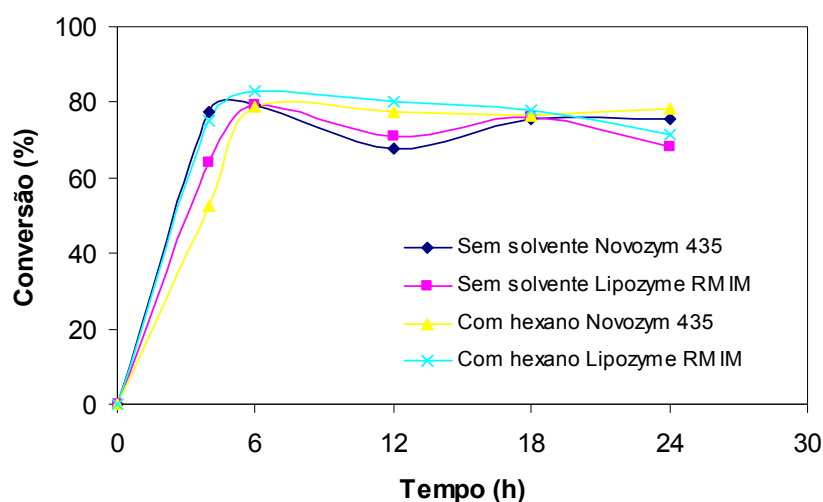


Figura 6 - Cinética da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente e com a adição de solvente n-hexano (1:3,5 p/v) em relação ao ácido palmítico, na temperatura de 60°C, razão molar A.P:E.H 1:1, concentração da enzima de 10% [E] (p/p substratos).

5.2 Otimização da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila utilizando as lipases Novozym 435 e Lipozyme RM IM em sistema livre de solvente

Nesta etapa avaliou-se o efeito da temperatura (T), razão molar (R.M) e concentração da enzima [E] (%) (p/p substratos) na produção enzimática de palmitato de 2-etilexila. A Tabela 11 apresenta a matriz do planejamento com os valores codificados e reais, e as respostas para a conversão em palmitato de 2-etilexila. A partir desta tabela pode-se observar que foram obtidas diferentes conversões em função dos níveis estudados neste planejamento experimental para cada variável independente avaliada.

Verifica-se que a maior conversão em palmitato de 2-etilexila, com as duas enzimas estudadas, foi obtida nos maiores níveis de temperatura, razão molar e concentração de enzima, como é o caso do ensaio 8, que apresenta

conversão em palmitato de 2-etilexila de 86,8% e 85,6%, com as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM, respectivamente.

Tabela 11 - Matriz do primeiro planejamento experimental 2^3 realizado (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em palmitato de 2-etilexila.

Ensaio	Temperatura (°C)	R.M (A.P/E.H)	[E] (%)(p/p)	Conversão (%)	
				Novozym 435	Lipozyme RM IM
1	-1 (40)	-1 (1:1)	-1 (1)	28,51	22,37
2	+1 (70)	-1 (1:1)	-1 (1)	54,28	44,84
3	-1 (40)	+1 (1:3)	-1 (1)	50,55	46,62
4	+1 (70)	+1 (1:3)	-1 (1)	76,05	70,79
5	-1 (40)	-1 (1:1)	+1 (10)	56,85	67,36
6	+1 (70)	-1 (1:1)	+1 (10)	79,81	83,09
7	-1 (40)	+1 (1:3)	+1 (10)	77,31	75,94
8	+1 (70)	+1 (1:3)	+1 (10)	86,80	85,58
9	0 (55)	0 (1:2)	0 (5,5)	79,51	78,31
10	0 (55)	0 (1:2)	0 (5,5)	76,61	83,73
11	0 (55)	0 (1:2)	0 (5,5)	79,01	82,82

Os resultados obtidos no primeiro planejamento experimental foram estatisticamente analisados, onde foram estimados os coeficientes de regressão, erro padrão e valores de t e p, mostrados na Tabela 12. A partir desta tabela, um modelo empírico referente à conversão obtida em função das variáveis avaliadas foi obtido (Equações 3 e 4).

O modelo codificado para a produção enzimática de palmitato de 2-etilexila como função da temperatura, razão molar e concentração de enzima utilizando a enzima Novozym 435 e como função da temperatura, razão molar, concentração de enzima e interação entre razão molar e concentração de enzima utilizando a enzima Lipozyme RM IM, foi validado pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 13. O coeficiente de correlação R obtido foi de 0,81 para a Novozym 435, e o F calculado foi aproximadamente 3 vezes maior que o valor tabelado. Para a enzima Lipozyme RM IM, o R obtido

foi de 0,78 e o F calculado foi maior que o valor tabelado, sendo que estes validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,05$), e permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 7 e 8.

Tabela 12 – Coeficientes de regressão para a esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila – Primeiro planejamento experimental.

Parâmetro	Coeficientes de Regressão		Erro Padrão		t(2)		p	
	Novo	Lipo	Novo	Lipo	Novo	Lipo	Novo	Lipo
Média	67,75	67,40	0,467	0,875	144,95	77,02	0,00004	0,0002
(1) Temperatura	10,46	9,00	1,096	2,052	19,09	8,77	0,0027*	0,0127*
(2) Razão Molar	8,91	7,66	1,096	2,052	16,25	7,46	0,0038*	0,0175*
(3) Enzima	11,42	15,92	1,096	2,052	20,84	15,51	0,0023*	0,0041*
Interação 1 x 2	-1,72	-0,55	1,096	2,052	-3,13	-0,53	0,0885	0,6463
Interação 1 x 3	-2,35	-2,66	1,096	2,052	-4,29	-2,59	0,0502	0,1222
Interação 2 x 3	-2,04	-4,89	1,096	2,052	-3,73	-4,77	0,0649	0,0413*

* efeitos significativos a $p < 0,05$

$$\text{Conversão palmitato de 2-etilexila (\%)} \text{ (Novozym 435)} = 67,75 + 10,46.T + 8,91.RM + 11,42.E \quad (3)$$

$$\text{Conversão palmitato de 2-etilexila (\%)} \text{ (Lipozyme RM IM)} = 67,40 + 9,00.T + 7,66.RM + 15,92.E - 4,89.RM.E \quad (4)$$

Tabela 13 – Análise de variância para a produção de palmitato de 2-etilexila no primeiro planejamento experimental.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados		Graus de Liberdade		Média Quadrática		F calculado	
	Novo	Lipo	Novo	Lipo	Novo	Lipo	Novo	Lipo
Regressão	2554,66	3336,08	3	4	851,55	834,02	10,04	5,46
Residual	593,42	916,97	7	6	84,77	152,83		
Falta de Ajuste	588,61	900,12	5	4				
Erro Puro	4,81	16,85	2	2				
Total	3148,08	4253,05	10	10				

$R = 0,81$; $F_{0,05, 3,7} = 4,34$ (Novozym 435)

$R = 0,78$; $F_{0,05, 4,6} = 4,50$ (Lipozyme RM IM)

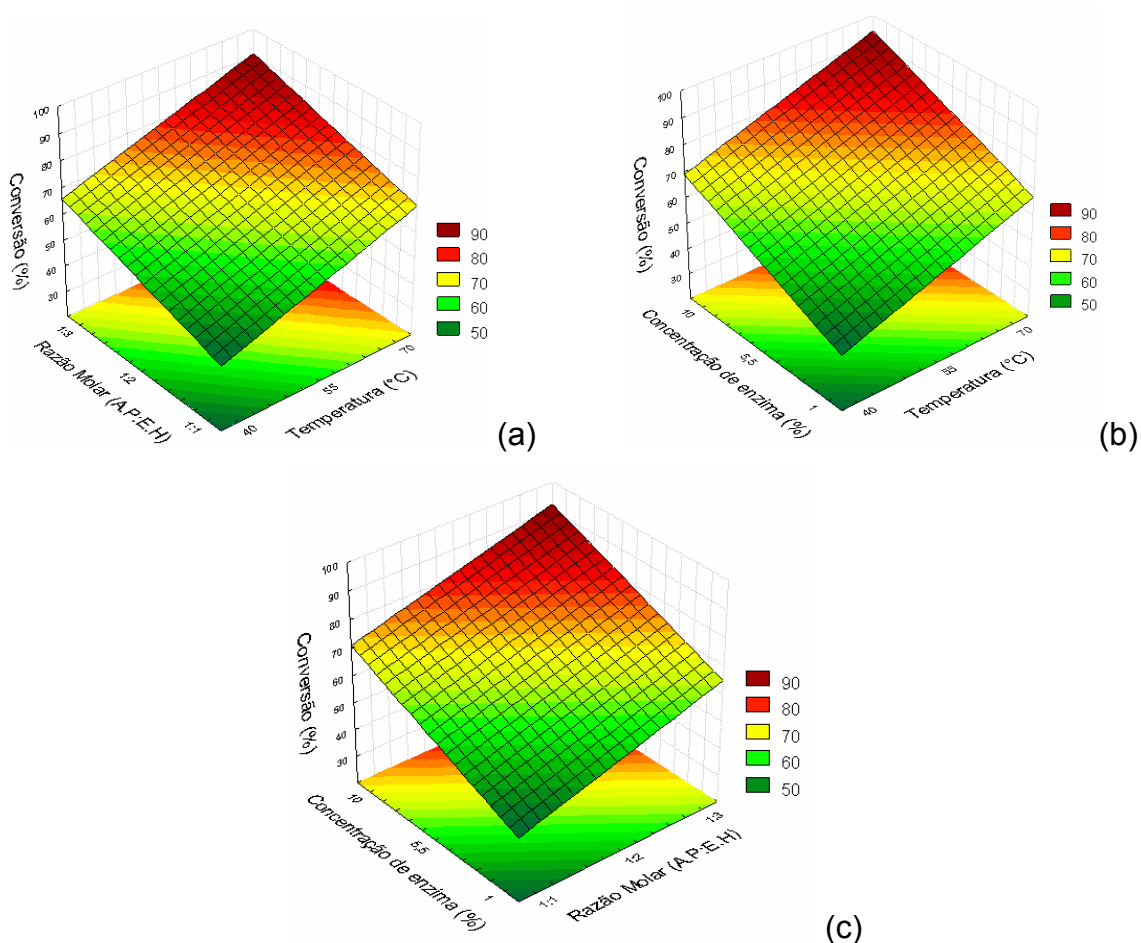


Figura 7 - Superfície de resposta para produção de palmitato de 2-etilexila utilizando Novozym 435 referentes ao primeiro planejamento experimental. Conversão em função da temperatura e razão molar (a), da temperatura e concentração da enzima (b) e da razão molar e concentração de enzima (c).

O efeito da temperatura na conversão de palmitato de 2-etilexila com as duas enzimas estudadas pode ser visualizado na Figura 7 (a) e (b) (Novozym 435) e Figura 8 (a) e (b) (Lipozyme RM IM), onde nas temperaturas mais elevadas maiores conversões foram obtidas.

A razão molar e concentração da enzima também influenciaram significativamente na conversão do produto com ambas as enzimas. Como pode ser notado na Figura 7 (c) (Novozym 435), nas mais altas concentrações de enzima e razão molar foram encontradas as maiores conversões. No caso da enzima Lipozyme RM IM (Figura 8 (c)), nota-se que na mais alta

concentração de enzima estudada a razão molar não influenciou na conversão do processo, porém concentrações de enzima mais baixas na faixa de razão molar avaliada conduziram a menores conversões.

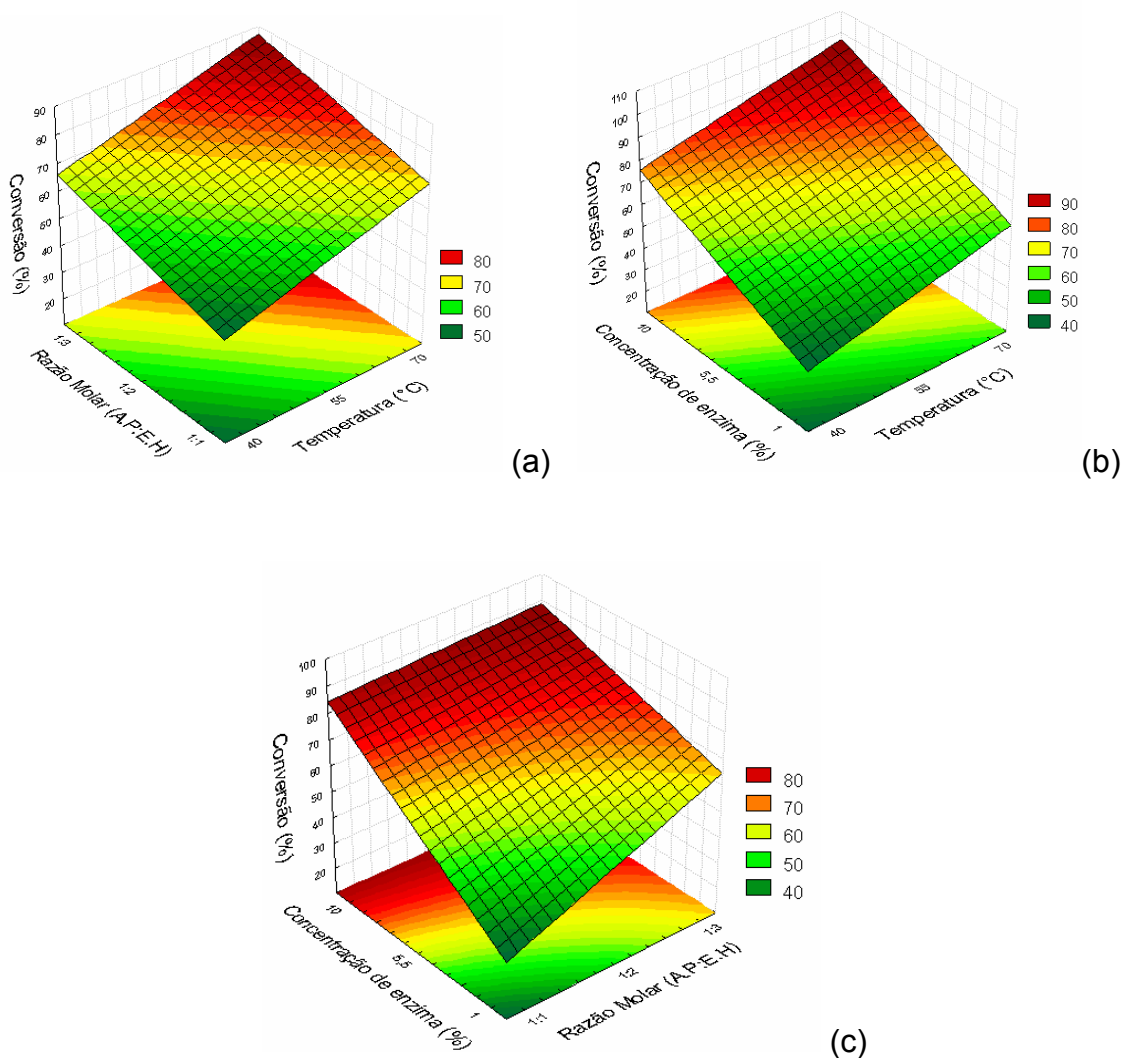


Figura 8 - Superfície de resposta para produção de palmitato de 2-etilexila utilizando Lipozyme RM IM referentes ao primeiro planejamento experimental. Conversão em função da temperatura e razão molar (a), da temperatura e concentração da enzima (b) e da razão molar e concentração de enzima (c).

A reação de esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente apresenta um sistema reacional simples envolvendo, no caso deste trabalho, somente os substratos ácido palmítico e 2-etil-hexanol. A reação ocorre na interface ácido palmítico/2-etil-hexanol, sendo, dessa forma a agitação de fundamental importância, no sentido de evitar limitações na

transferência de massa. Como nos testes preliminares a agitação testada (150rpm) conduziu à boa conversão, esta foi mantida constante em todos os experimentos. Outro importante parâmetro a ser avaliado é a temperatura da reação. As lipases utilizadas neste trabalho, Novozym 435 e Lipozyme RM IM, possuem temperatura ótima na faixa de 50 a 70°C. Nota-se que, nos ensaios onde a temperatura encontrava-se na faixa de 70°C, próxima a temperatura ótima das enzimas, maiores conversões foram encontradas.

De acordo com os resultados obtidos no primeiro planejamento experimental, um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizado com o objetivo de otimizar a produção de palmitato de 2-etilexila. Considerando que as melhores conversões foram obtidas à 70°C, na faixa estudada, com as duas enzimas utilizadas, seu valor foi fixado nesta temperatura, próxima à temperatura ótima de atuação para as lipases imobilizadas Novozym 435 e Lipozyme RM IM.

No primeiro planejamento experimental, nos maiores níveis de concentração de enzima, maiores conversões de palmitato de 2-etilexila foram obtidas. Entretanto, adição de concentrações de catalisador acima de 15% (p/p substratos) no sistema, pode tornar o processo inviável técnica e economicamente. Dessa forma, deslocou-se a faixa de concentração de enzima a ser utilizada no segundo planejamento experimental, que foi realizado empregando-se de 3% a 17% (p/p substratos).

Em maiores razões molares, maiores conversões também foram encontradas, fato que determinou o deslocamento dos níveis desta variável para valores superiores no segundo planejamento.

Neste contexto, foi definido um planejamento experimental 2². A Tabela 14 apresenta a matriz DCCR e as conversões em palmitato de 2-etilexila. Neste planejamento, assim como no primeiro planejamento experimental, a agitação foi mantida em 150rpm e o tempo das reações em 6 horas para todos os experimentos.

A partir da tabela 14, utilizando a enzima Lipozyme RM IM, pode ser observado que aumentando a razão molar, maiores conversões em palmitato de 2-etilexila foram encontradas. Porém, conversões similares foram

encontradas na razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol de 1:3. Nos ensaios 3 e 5, em menores razões entre os substratos menores conversões em palmitato de 2-etilexila puderam ser observadas. Nestes ensaios, a quantidade de 2-etil-hexanol em excesso pode ter sido inferior à necessária para deslocar o equilíbrio no sentido da formação do produto.

Tabela 14 – Matriz do segundo planejamento experimental (valores codificados e reais) com respostas em conversão em palmitato de 2-etilexila nas reações conduzidas em 70°C, agitação de 150rpm e tempo de reação de 6 horas.

Ensaio	R.M (A.P/E.H)	[E] (%)(p/p)	Conversão (%)	
			Novozym 435	Lipozyme RM IM
1	-1 (1:1,5)	-1 (5)	93,99	91,12
2	+1 (1:5)	-1 (5)	94,01	96,40
3	-1 (1:1,5)	+1 (15)	94,83	89,14
4	+1 (1:5)	+1 (15)	88,89	96,93
5	-1,41 (1:1)	0 (10)	71,38	84,51
6	+1,41 (1:6)	0 (10)	94,97	96,15
7	0 (1:3)	-1,41 (3)	89,09	93,11
8	0 (1:3)	+1,41 (17)	51,51	96,76
9	0 (1:3)	0 (10)	94,59	94,98
10	0 (1:3)	0 (10)	91,48	96,46
11	0 (1:3)	0 (10)	92,23	94,22

Os resultados apresentados no segundo planejamento experimental foram estatisticamente analisados. Os resultados apresentados na Tabela 14 referentes à enzima Lipozyme RM IM permitiram a obtenção de um modelo codificado otimizado para a conversão enzimática de palmitato de 2-etilexila em função da razão molar, o qual está apresentado na Equação 5. Para verificação da validade do modelo foi realizada a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 15. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,91) e o valor de F (F calculado maior que o F tabelado) validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,05$), e permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentados na Figura 9.

$$\text{Conversão palmitato de 2-etilexila (\%)} (\text{Lipozyme}) = 95,27 + 3,70.RM - 2,27.RM^2 \quad (5)$$

Tabela 15 – Análise de variância para a produção de palmitato de 2-etilexila no segundo planejamento experimental utilizando a enzima Lipozyme RM IM.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	140,73	2	70,37	40,04
Residual	14,06	8	1,76	
Falta de Ajuste	11,46	6		
Erro Puro	2,59	2		
Total	154,79	10		

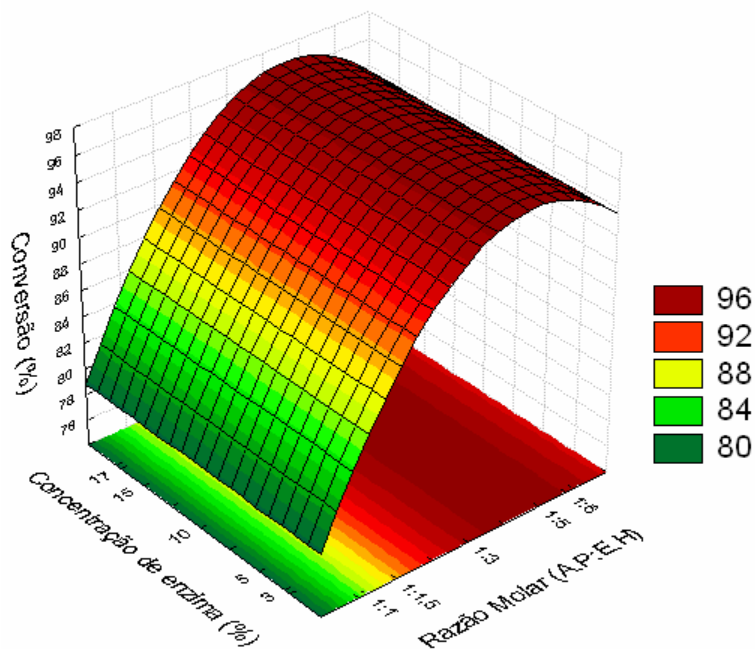
R = 0,91; $F_{0,05, 2,8} = 4,45$ (Lipozyme)

A Figura 9 apresenta a superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) mostrando a influência da adição de enzima e razão molar na conversão final de palmitato de 2-etilexila utilizando a enzima Lipozyme RM IM. Neste segundo planejamento experimental, a concentração de enzima e razão molar dos substratos que otimizaram a produção de palmitato de 2-etilexila foram obtidas nos experimentos 9, 10 e 11, os pontos centrais do planejamento, na seguinte condição: razão molar 1:3 (A.P:E.H) e 10% (p/p substratos) de enzima, alcançando os valores de 94,98, 96,46 e 94,22% de conversão em palmitato de 2-etilexila. Através da Figura 9 (a) e (b) pode ser verificado que a concentração de enzima não influenciou significativamente na faixa estudada de 3 a 17% (p/p substratos), desde que as razões molares ácido palmítico:2etil-hexanol estejam entre 1:3 -1:6.

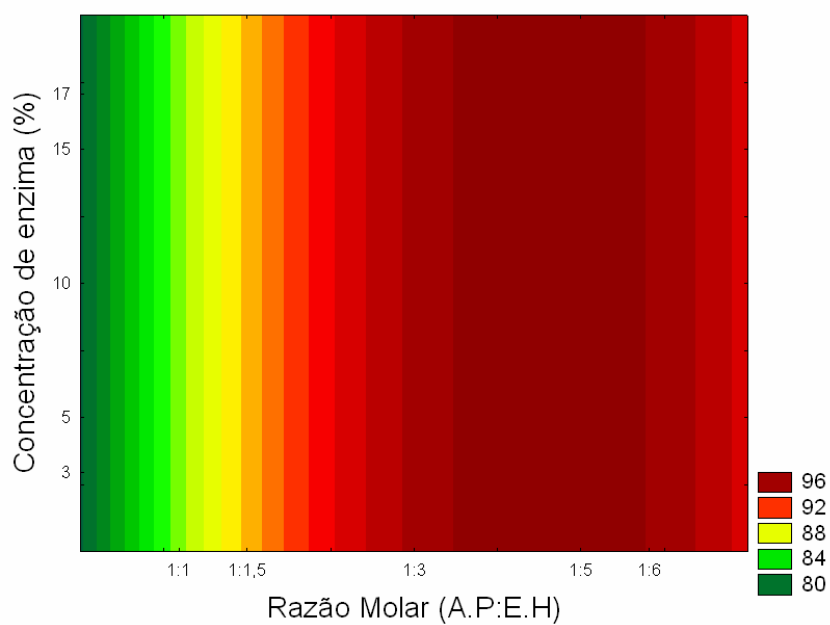
Para verificação da qualidade do modelo empírico otimizado obtido, os desvios relativos percentuais entre os valores observados experimentalmente e os preditos pelo modelo foram calculados e estão apresentados na Tabela 16. Observa-se que o desvio máximo obtido foi de 2%, confirmando a excelente capacidade preditiva do mesmo.

Após análise estatística do planejamento experimental realizado utilizando a enzima Novozym 435 (Tabela 14) não foi possível a validação de um modelo empírico que descrevesse a conversão de palmitato de 2-etilexila

em função das variáveis independentes estudadas. Construiu-se então o gráfico de Pareto apresentado na Figura 10.



(a)



(b)

Figura 9 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de palmitato de 2-etilexila utilizando a enzima Lipozyme RM IM em função da razão molar e concentração da enzima – Segundo planejamento experimental.

Tabela 16 – Conversão em palmitato de 2-etilexila utilizando a enzima Lipozyme RM IM: valores experimentais, preditos pelo modelo e desvios relativos.

Ensaio	Conversão (%)	Conversão (%)	Desvio relativo (%)
	Experimental	Predita	
1	91,12	89,26	2,04
2	96,40	96,65	-0,26
3	89,14	89,26	-0,13
4	96,93	96,65	0,29
5	84,51	85,51	-1,18
6	96,15	95,93	0,23
7	93,11	95,22	-2,26
8	96,76	95,22	1,59
9	94,98	95,22	-0,25
10	96,46	95,22	1,29
11	94,22	95,22	-1,06

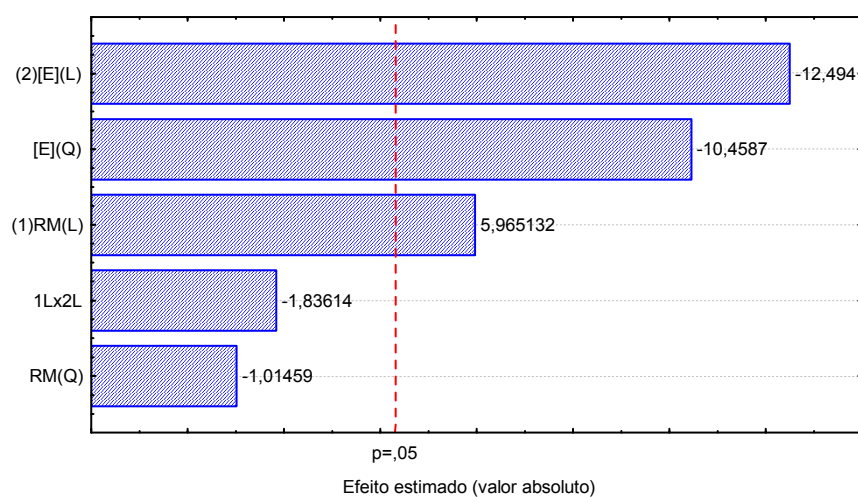


Figura 10 - Gráfico de Pareto da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila utilizando a enzima Novozym 435 em função das variáveis estudadas no segundo planejamento experimental.

Através da Figura 10 verifica-se que a concentração de enzima [E] apresentou efeito significativo negativo ($p < 0,05$), mostrando que quanto maior

a concentração de enzima, menor será a conversão em produto. A razão molar apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,05$), reforçando que uma maior razão molar poderia resultar em maior conversão.

A análise do planejamento experimental anteriormente realizado, indicou a necessidade da realização de um terceiro planejamento 2^2 , com o objetivo de otimizar a produção de palmitato de 2-etilexila utilizando a enzima Novozym 435. A Tabela 17 apresenta a matriz DCCR e as conversões em palmitato de 2-etilexila. Neste planejamento, assim como nos planejamentos experimentais anteriores, a agitação foi mantida em 150rpm e o tempo das reações em 6 horas.

Tabela 17 – Matriz do terceiro planejamento experimental (valores codificados e reais), com respostas em conversão em palmitato de 2-etilexila nas reações conduzidas a 70°C, agitação de 150rpm e tempo de reação de 6 horas, utilizando a enzima Novozym 435.

Ensaio	R.M (A.P/E.H)	[E] (%)(p/p)	Conversão (%) Novozym 435
1	-1 (1:2,3)	-1 (3,8)	85,12
2	+1 (1:8,7)	-1 (3,8)	89,27
3	-1 (1:2,3)	+1 (17,2)	82,70
4	+1 (1:8,7)	+1 (17,2)	83,93
5	-1,41 (1:1)	0 (10,5)	76,66
6	+1,41 (1:10)	0 (10,5)	87,34
7	0 (1:5,5)	-1,41 (1)	79,20
8	0 (1:5,5)	+1,41 (20)	78,91
9	0 (1:5,5)	0 (10,5)	94,59
10	0 (1:5,5)	0 (10,5)	91,67
11	0 (1:5,5)	0 (10,5)	94,97

A partir da tabela 17 pode ser observado que a concentração ótima de enzima já estava muito próxima de ser atingida no planejamento anterior e que um pequeno aumento na concentração da mesma foi essencial para alcançar maiores conversões em palmitato de 2-etilexila. Contudo, concentrações mais

elevadas (maiores que 10,5% p/p) de enzima levaram a menores conversões. Nos ensaios 7 e 8, onde a concentração de enzima encontra-se no menor e maior nível, respectivamente, menores conversões de palmitato de 2-etilexila puderam ser observadas. No ensaio 5 observa-se uma baixa conversão em função da baixa razão molar dos substratos.

Os resultados apresentados no terceiro planejamento experimental foram tratados estatisticamente. Os dados obtidos permitiram a obtenção de um modelo codificado otimizado para a conversão enzimática de palmitato de 2-etilexila em função da razão molar e concentração da enzima, o qual está apresentado na Equação 6. Para verificação da validade do modelo foi realizada a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 18. Verificase que o coeficiente de correlação obtido (0,90) e o teste F (F calculado maior que o F tabelado) validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,1$) e permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentados na Figura 11.

$$\text{Conversão palmitato de 2-etilexila (\%)} (\text{Novozym 435}) = 93,72 + 2,56.RM - 4,69.RM^2 - 1,02.E - 6,17.E^2 - 0,73.RM.E \quad (6)$$

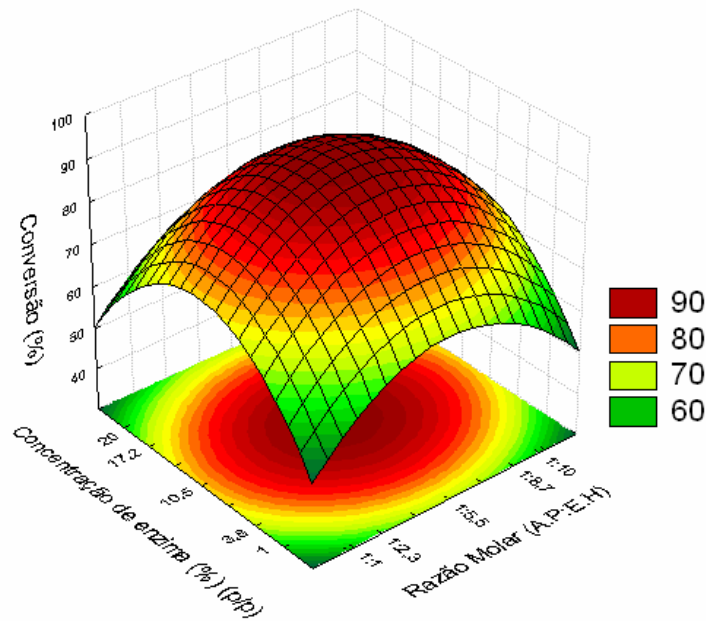
Tabela 18 – Análise de variância para a produção de palmitato de 2-etilexila no terceiro planejamento experimental utilizando a enzima Novozym 435.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	327,26	5	65,45	4,60
Residual	71,07	5	14,21	
Falta de Ajuste	64,55	3		
Erro Puro	6,52	2		
Total	398,33	10		

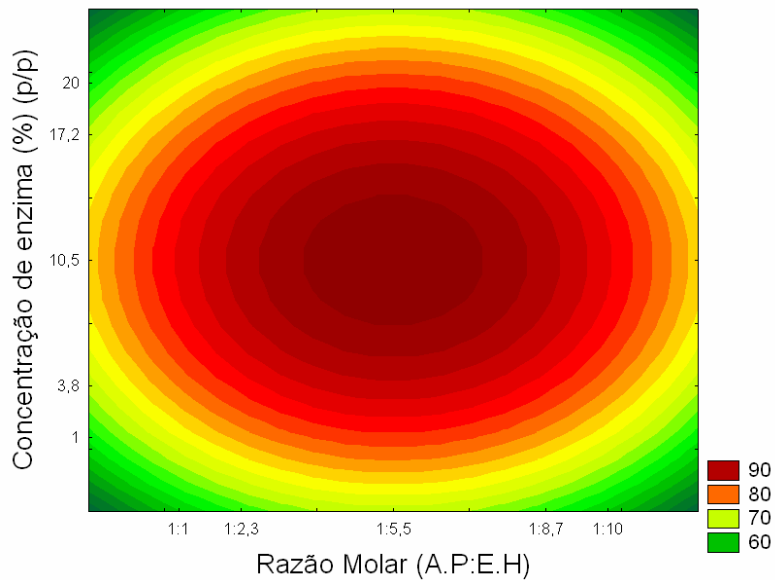
$$R = 0,90; F_{0,1, 5,5} = 3,45$$

A Figura 11 apresenta a superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) mostrando a influência da adição de enzima e razão molar dos substratos na conversão final de palmitato de 2-etilexila utilizando a enzima Novozym 435.

Neste terceiro planejamento experimental, as concentrações de enzima e razão molar que otimizaram a produção de palmitato de 2-etilexila foram obtidas nos experimentos 9, 10 e 11, os pontos centrais do planejamento, na seguinte condição: razão molar 1:5,5 (A.P:E.H) e 10,5% (p/p substratos) de enzima, alcançando valores de 94,59, 91,67 e 94,97% de produto.



(a)



(b)

Figura 11 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de 2-etihexil palmitato utilizando a enzima Novozym 435 em função da razão molar e concentração da enzima – Terceiro planejamento experimental.

Para verificação da qualidade do modelo empírico otimizado obtido, os desvios relativos percentuais entre os valores observados experimentalmente e os preditos pelo modelo foram calculados e estão apresentados na Tabela 19. Observa-se que o desvio máximo obtido foi de 5%, confirmando a excelente capacidade preditiva do mesmo.

Tabela 19 – Conversão em palmitato de 2-etilexila utilizando a enzima Novozym 435: valores experimentais, preditos pelo modelo e desvios relativos.

Ensaio	Conversão (%)		Desvio relativo (%)
	Experimental	Predita	
1	85,12	80,60	5,31
2	89,27	87,18	2,34
3	82,70	80,01	3,25
4	83,93	83,67	0,30
5	76,66	80,79	-5,39
6	87,34	88,02	-0,77
7	79,20	82,90	-4,67
8	78,91	80,01	-1,40
9	94,59	93,72	0,92
10	91,67	93,72	1,31
11	94,97	93,72	-2,24

Apenas um trabalho na literatura relata a esterificação enzimática palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente. He et al. (2002) estudaram a síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos de 2-etilhexil, especialmente palmitato de 2-etilexila, por lipase imobilizada de *Candida* sp. 99-125. Em sistema livre de solvente, com 10% (p/p substratos) de lipase imobilizada, razão molar 2-etil-hexanol/ácido palmítico 1:1 e 40°C obtiveram 84% de conversão.

Alguns estudos relatam a esterificação enzimática em sistema livre de solvente com diferentes ácidos graxos e álcoois. Kumar et al. (2004) investigaram a síntese de etil palmitato em sistema livre de solvente e obtiveram 97% de conversão. Güvenç et al. (2002) estudaram a produção

enzimática de isoamil acetato em sistema livre de solvente e obtiveram 80% de conversão utilizando 5% (p/p substratos) com Novozym 435, em 6 horas de reação, razão molar ácido/álcool de 1:2 na temperatura de 30°C e agitação de 150rpm. Utilizando a enzima comercial Novozym 435, Santos et al. (2007) avaliaram a síntese de butil ésteres em sistema livre de solvente, onde a mais alta proporção obtida correspondeu a 49% utilizando ácido butírico como doador do grupo acila. Chang et al. (2006) estudaram a formação de hexil laurato, utilizando a enzima Lipozyme IM 77 em sistema livre de solvente. As condições ótimas de síntese foram encontradas no tempo de reação de 40,6 minutos, 58,2°C, concentração da enzima de 25,4 mg/volume (0,196 BAUN) e um pH de 5,9, com 69,7% de conversão.

Na presença de solvente orgânico podem ser citados como forma de comparação os trabalhos de He et al. (2002), que estudaram a síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos de 2-etilhexil, especialmente palmitato de 2-etilexila, por lipase imobilizada de *Candida* sp. 99-125. Em um sistema contendo éter de petróleo, 10% (p/p substratos) de lipase imobilizada, razão molar 2-etil-hexanol/ ácido palmítico 1:1, a 40°C com sílica gel como adsorvente, obtiveram 91% de conversão. Com o objetivo de reutilizar as enzimas imobilizadas por várias bateladas, e tornar mais fácil a separação do biocatalisador do meio, Tan et al. (2006) estudaram um método para síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila por lipase imobilizada sobre membranas de fibra sintética em reator de batelada, onde obtiveram 95% de esterificação utilizando razão molar ácido palmítico/2-etil-hexanol 1:1,3 - 1:1,5, 40°C, lipase usada na imobilização 5000 - 6000 UI/g membrana, em sistema com éter de petróleo. Garcia et al. (1999) investigaram a cinética da esterificação de ácido palmítico catalisada por Novozym 435 para a síntese de isopropil palmitato, onde obtiveram 70% de esterificação, em 2 horas de reação, temperatura de 65-75°C e concentração do biocatalisador de 2,2-7,83 wt%.

5.3 Cinética da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente

A cinética da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente foi realizada a partir dos resultados obtidos na condução dos planejamentos experimentais e em testes preliminares.

5.3.1 Testes de amostragem

Testes de amostragem na condição de razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol de 1:6, concentração de enzima de 10% (p/p substratos), agitação de 150rpm, temperatura de 70°C e tempo de reação de 6 horas em sistema livre de solvente utilizando a enzima Novozym 435 foi realizado comparando com uma avaliação da cinética de forma destrutiva.

A Tabela 20 apresenta os tempos de amostragem para a cinética, as respostas em termos de conversão de palmitato de 2-etilexila e o desvio padrão entre elas.

Tabela 20 – Comparação entre amostra destrutiva e não-destrutiva no tempo de 8 horas de reação utilizando Novozym 435.

Conversão em palmitato de 2-etilexila (%)			
Tempo (h)	Destrutiva	Não destrutiva	Desvio Padrão
0,5	78,48	75,78	1,90
1	82,92	84,28	0,95
2	80,29	88,37	5,71
3	79,39	84,32	3,48
4	85,28	80,97	3,05
5	88,33	95,49	5,06
6	89,22	97,17	5,61
7	86,43	94,42	5,64
8	87,49	89,41	1,35

Como pode ser notado na Tabela 20, o elevado desvio padrão (obtido através dos cálculos entre os resultados na amostra destrutiva e não destrutiva) encontrado em algumas condições pode ter sido causado por vários fatores, tais como erro experimental e amostra não significativa. Entretanto, devido à facilidade de operação, economia de reagente e boa reprodutibilidade comparada à cinética destrutiva, o método de cinética por amostragem (não destrutiva) foi escolhido para a avaliação do efeito de algumas variáveis de processo na cinética da reação de esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila utilizando Novozym 435 e Lipozyme RM IM em sistema livre de solvente.

Nesta seção serão apresentados os resultados referentes às cinéticas avaliando os efeitos da razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol, concentração da enzima e temperatura, que em testes preliminares revelaram a boa conversão em palmitato de 2-etilexila com as duas enzimas utilizadas Novozym 435 e Lipozyme RM IM. Nas figuras desta seção os pontos experimentais foram unidos por uma linha contínua apenas como forma de melhor visualização do comportamento da reação, e nos gráficos menores foram plotados os tempos de reação entre 0 e 1 hora para visualização mais ampla neste curto intervalo, tendo em vista que as reações foram acompanhadas até o tempo de 8 horas. Em cada uma das etapas supracitadas foi também realizada a avaliação da velocidade inicial de reação para o estudo cinético realizado.

Na literatura, não existem resultados que podem ser comparados com este sistema em estudo, pois a esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente é citada apenas por um autor (He et al., 2002), o qual não aprofundou os estudos neste sistema.

5.3.2 Efeito da razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol na cinética de produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente

Os experimentos para o estudo do efeito da razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol foram realizados fixando a temperatura em 70°C,

concentração de enzima em 10% (p/p substratos) e agitação em 150rpm. As Figuras 12 (Novozym 435) e 13 (Lipozyme RM IM) apresentam as curvas obtidas de conversão em função do tempo, variando a razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol em 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 e 1:10.

A partir da Figura 12 (Novozym 435) pode-se verificar que nas razões molares de 1:5, 1:7 e 1:10, até o tempo de 15 minutos de reação, as conversões são próximas. No tempo de 2 horas há uma elevação nas conversões nas razões molares de 1:5 e 1:7, alcançando o máximo de 95,23 e 98,63%, respectivamente. Nas razões molares de 1:1 e 1:3 menores conversões foram encontradas.

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

A partir da Figura 13 (Lipozyme RM IM) pode-se notar que altas conversões foram encontradas nas razões molares de 1:3 a 1:10, onde o álcool (2-etil-hexanol) está em excesso. Dörmo et al. (2004) analisaram o efeito da razão molar de ácido:álcool na esterificação de isoamil oleato na temperatura de 40°C, 0,5% de enzima (Novozym 435), agitação de 150rpm e 7 horas de reação, sem a utilização de solvente. Avaliaram o efeito da razão molar em 1:1, 1:2, 1:5 e 2:1 de ácido:álcool e obtiveram mais altas conversões em 4 horas de reação (70-80%) com as razões molares de 1:2 e 1:5.

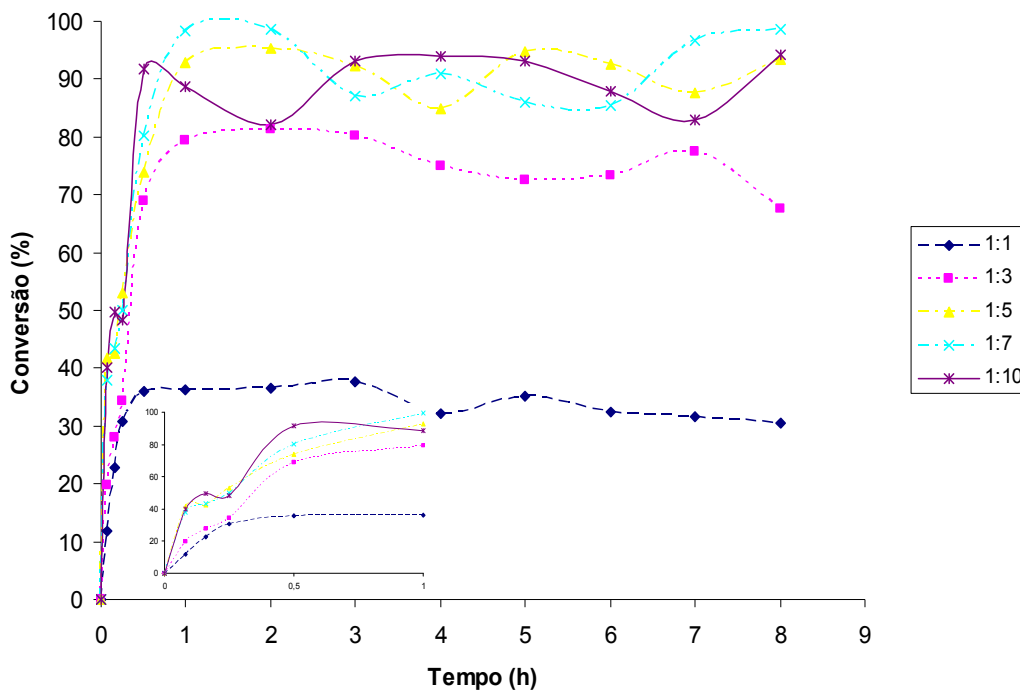


Figura 12 – Efeito da razão molar sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila à temperatura de 70°C, concentração de enzima de 10% (p/p substratos) e agitação em 150rpm em sistema livre de solvente utilizando a enzima Novozym 435.

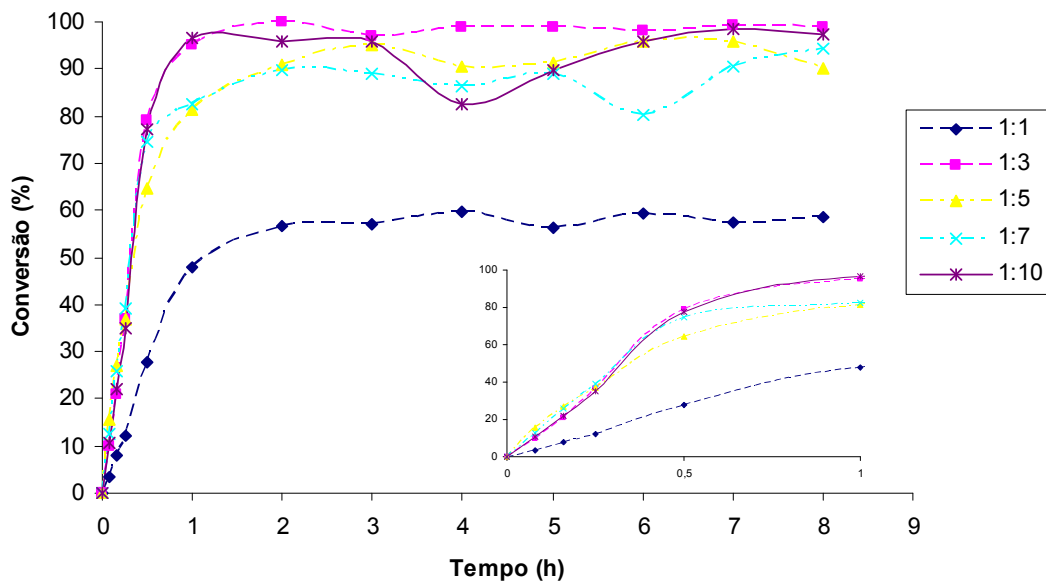


Figura 13 – Efeito da razão molar sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila à temperatura de 70°C, concentração de enzima de 10% (p/p substratos) e agitação em 150rpm em sistema livre de solvente utilizando a enzima Lipozyme RM IM.

Os cálculos da taxa inicial de reação foram efetuados segundo a Equação 7, e estão apresentados na Tabela 21. Pode-se notar que com as duas enzimas um aumento na concentração de álcool no meio aumenta a taxa inicial de reação, favorecendo a formação de produtos, como pode ser notado na cinética da razão molar ácido:álcool de 1:5, nas Figuras 12 (Novozym 435) e 13 (Lipozyme RM IM), que em 5 minutos apresentou a maior conversão entre as razões molares estudadas para as duas enzimas estudadas.

Tabela 21 – Taxa inicial de reação em função da razão molar na esterificação enzimática em sistema livre de solvente utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM.

Razão Molar (A.P:E.H)	r (min ⁻¹)	
	Novozym 435	Lipozyme RM IM
1:1	1,23	0,86
1:3	2,37	2,21
1:5	3,76	2,72
1:7	2,80	2,51
1:10	3,09	2,50

5.3.3 Efeito da concentração de enzima na cinética de produção enzimática de palmitato de 2-etilhexila em sistema livre de solvente

O efeito da concentração de enzima no sistema foi avaliado mantendo-se fixas as condições do sistema na temperatura de 70°C, razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol de 1:6 e agitação de 150rpm, possibilitando a obtenção das curvas cinéticas em função do tempo variando a concentração de enzima em 1, 5, 10, 15 e 20% (p/p substratos), utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM (Figuras 14 e 15).

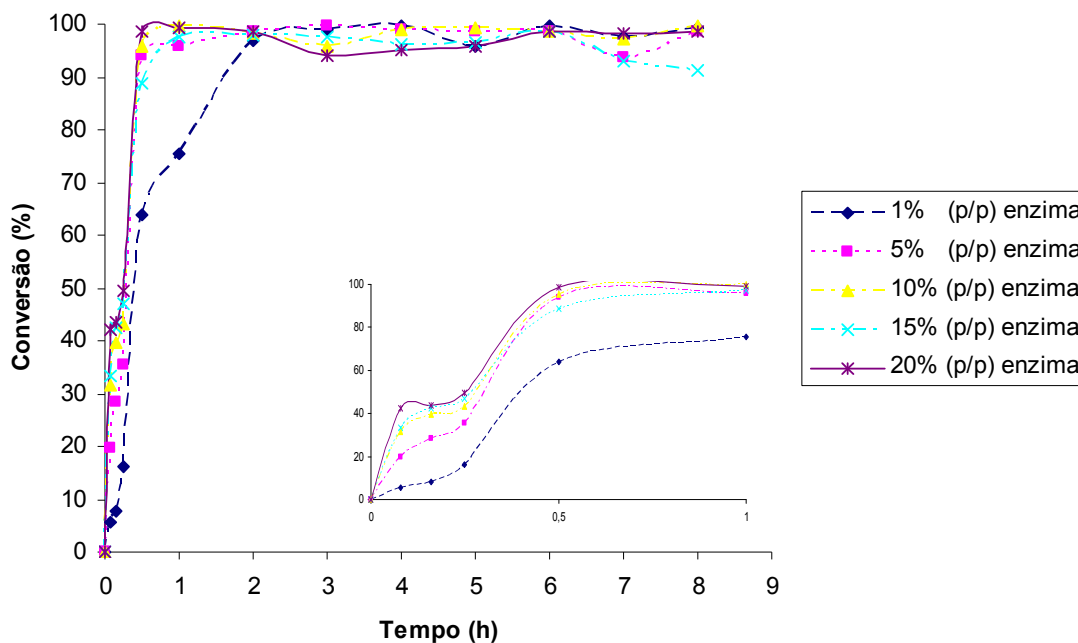


Figura 14 – Efeito da concentração de enzima sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila à razão molar ácido palmítico:etil-hexanol 1:6, temperatura de 70°C e agitação de 150rpm em sistema livre de solvente utilizando a enzima Novozym 435.

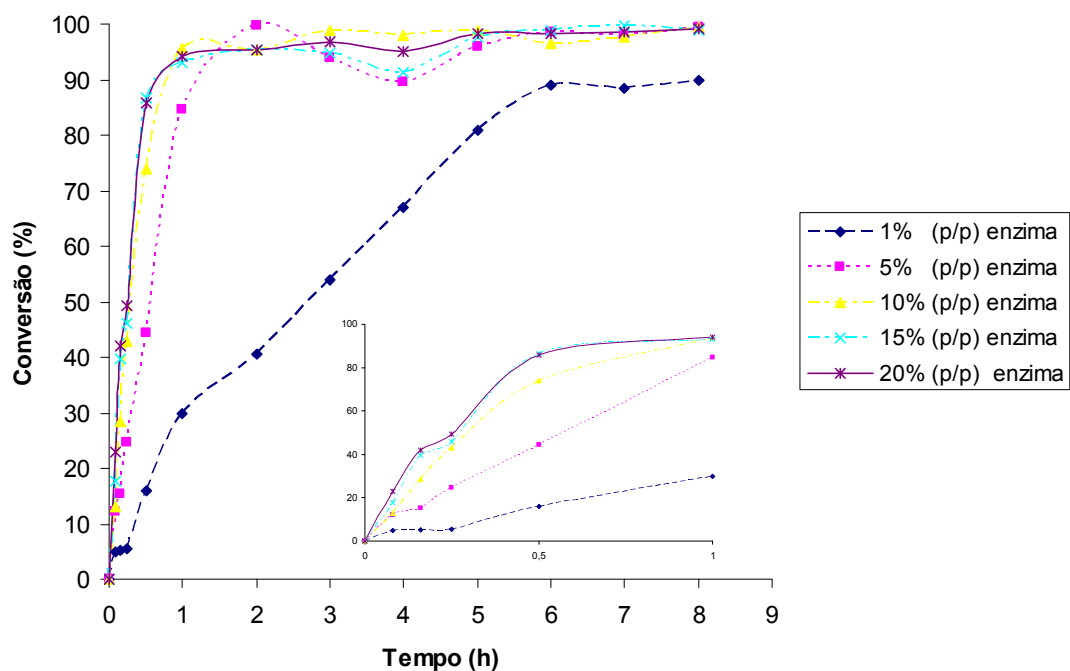


Figura 15 – Efeito da concentração de enzima sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila à razão molar ácido palmítico:etil-hexanol 1:6, temperatura de 70°C e agitação de 150rpm em sistema livre de solvente utilizando a enzima Lipozyme RM IM.

Com 5, 10, 15 e 20% de enzima (p/p substratos), pode-se observar que a reação ocorre rapidamente com as duas enzimas, apresentando conversões elevadas em baixos tempos de reação, em 30 minutos com a Novozym 435 e 1 hora com a Lipozyme RM IM.

Na condição com 1% (p/p substratos) de enzima Lipozyme RM IM no sistema, a conversão em palmitato de 2-etilexila foi inferior. A maior conversão na concentração de 1% (p/p substratos) de enzima Lipozyme RM IM foi de 89,71% alcançada em 8 horas de reação. No caso da Novozym 435, a maior conversão encontrada foi de 99,74% em 6 horas de reação.

Conforme visualizado nas Figuras 14 (Novozym 435) e 15 (Lipozyme RM IM) há uma tendência de estabilidade nas conversões na faixa de 5 a 20% de enzima (p/p) a partir de 30 minutos com a Novozym 435 e no tempo de 1 hora de reação com a Lipozyme RM IM. Uma possível explicação para este fato poderia ser a hipótese de que um excesso de enzima no meio pode não colaborar com o aumento da conversão, pois na presença de grande quantidade de lipase muitas moléculas da enzima podem agregar-se e o sítio ativo pode não ficar exposto aos substratos. Isto conduz à formação de agregados e uma distribuição não homogênea da enzima. As moléculas de enzima na superfície externa de tais partículas são expostas a altas concentrações de substrato, mas o transporte de massa dentro da partícula do biocatalisador pode drasticamente limitar a concentração de substrato no interior da partícula. Menores atividades de uma fração de biocatalisador reduzem a eficiência por unidade de massa do biocatalisador e não aumenta a conversão (Karra-Châabouni et al., 2006).

Pode-se observar nas Figuras 14 de 15 que adições de 15 e 20% (p/p) de enzima ao meio reacional não apresentou diferença significativa na conversão final de palmitato de 2-etilexila, indicando que a concentração ótima de enzima para este sistema estaria entre 5-10,5% (p/p substratos). He et al. (2002) estudaram a influência da concentração de lipase juntamente com a temperatura na esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila, com razão molar ácido/álcool 1:1 e éter de petróleo como solvente. Com 5% de enzima (wt% ácido), a conversão aumentou com o aumento da temperatura e com

10% (wt ácido) a conversão foi similar nas diferentes temperaturas estudadas de 40, 45, 48 e 50°C (~89%).

O mesmo procedimento foi adotado na determinação da taxa inicial da reação para as cinéticas envolvendo a variação da concentração de enzima no meio reacional e os dados estão apresentados na Tabela 22. Pode-se notar que tanto para a enzima Novozym 435 quanto para a Lipozyme RM IM a concentração de enzima de 1% (p/p substratos) mostrou a menor taxa inicial de reação. Verifica-se também que o aumento da concentração de enzima no meio não altera significativamente a taxa inicial da reação, entretanto uma concentração de enzima no meio reacional de 5 a 15% eleva as conversões de palmitato de 2-etilexila, como pode ser visto nas Figuras 14 (Novozym 435) e 15 (Lipozyme RM IM).

Tabela 22 – Taxa inicial de reação em função da concentração de enzima na esterificação enzimática em sistema livre de solvente utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM.

Enzima (%) (p/p substratos)	r (min ⁻¹)	
	Novozym 435	Lipozyme RM IM
1	0,99	0,54
5	2,99	1,53
10	3,19	2,57
15	3,09	3,02
20	3,37	2,98

5.3.4 Efeito da temperatura na cinética de produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente

A fim de avaliar o efeito da temperatura sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila, manteve-se fixa a razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol (1:6), concentração da enzima em 10% (p/p substratos) e agitação em 150rpm, o que possibilitou a obtenção das curvas de conversão em função do tempo, variando a temperatura em 30, 40, 50, 60 e 70°C, conforme apresentado nas Figuras 16 (Novozym 435) e 17 (Lipozyme RM IM).

A temperatura apresenta dois importantes papéis no sistema reacional. Primeiramente, altas temperaturas podem melhorar a difusão dos substratos ou sua solubilidade. Em segundo lugar, as enzimas possuem uma temperatura ótima de atuação, que no caso da Novozym 435 e Lipozyme RM IM está em torno de 40 a 70°C, como comentado anteriormente. Güvenç et al. (2002) estudaram a esterificação de isoamil acetato catalisada pelas enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM sem a adição de solvente, agitação de 150rpm e concentração de enzima de 5% (p/p substratos). Na razão molar de ácido/álcool 1:2, com a Novozym 435, obtiveram o equilíbrio da reação em 6 horas nas três temperaturas estudadas (30, 40 e 50°C) com 81% de conversão. Com a Lipozyme RM IM, na razão molar ácido/alcool 1:1, em 48 horas de reação obtiveram conversão de 20% a 50°C e 13% a 30°C.

A partir da Figuras 16 (Novozym 435) e 17 (Lipozyme RM IM) pode-se verificar que, para ambas as enzimas na temperatura de 70°C, em 30 minutos de reação com a Novozym 435 e 1 hora com a Lipozyme RM IM conduziram à conversões em palmitato de 2-etilexila de 95,71% e 95,66%, respectivamente, destacando-se esta entre as demais temperaturas para este tempo.

É possível também notar a partir das Figuras 16 (Novozym 435) e 17 (Lipozyme RM IM) que o rendimento da reação aumenta com o tempo, fato este não observado apenas na temperatura de 70°C, onde se verifica a ocorrência de um ponto máximo em 30 minutos com a Novozym 435 (95,71%) e em 1 hora com a Lipozyme RM IM (95,66%) posteriormente mantendo-se constante. He et al. (2002), utilizando a enzima de *Candida* sp. 99-125, em um sistema utilizando éter de petróleo como solvente, estudaram o efeito da temperatura na produção de palmitato de 2-etilexila. Observaram que quando a temperatura era controlada no intervalo de 40-50°C, a produção de palmitato de 2-etilexila aumentou com o aumento da temperatura. Em contraste, quando a temperatura foi elevada de 50 a 70°C, o rendimento diminuiu.

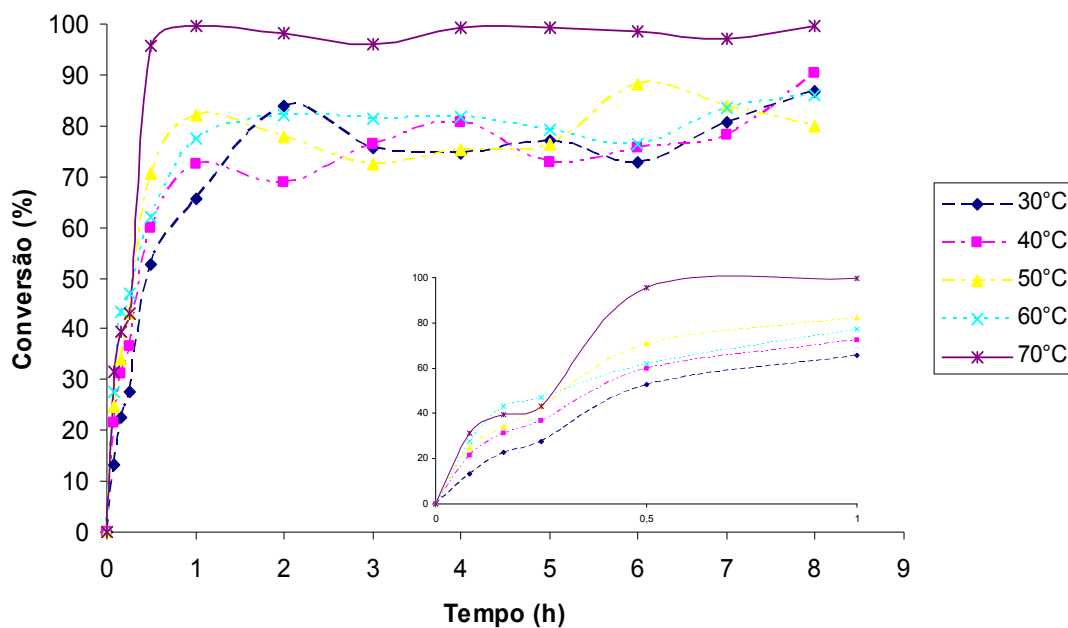


Figura 16 - Efeito da temperatura sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila à razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol de 1:6, concentração de enzima de 10% (p/p substratos) e agitação de 150rpm em sistema livre de solvente utilizando a enzima Novozym 435.

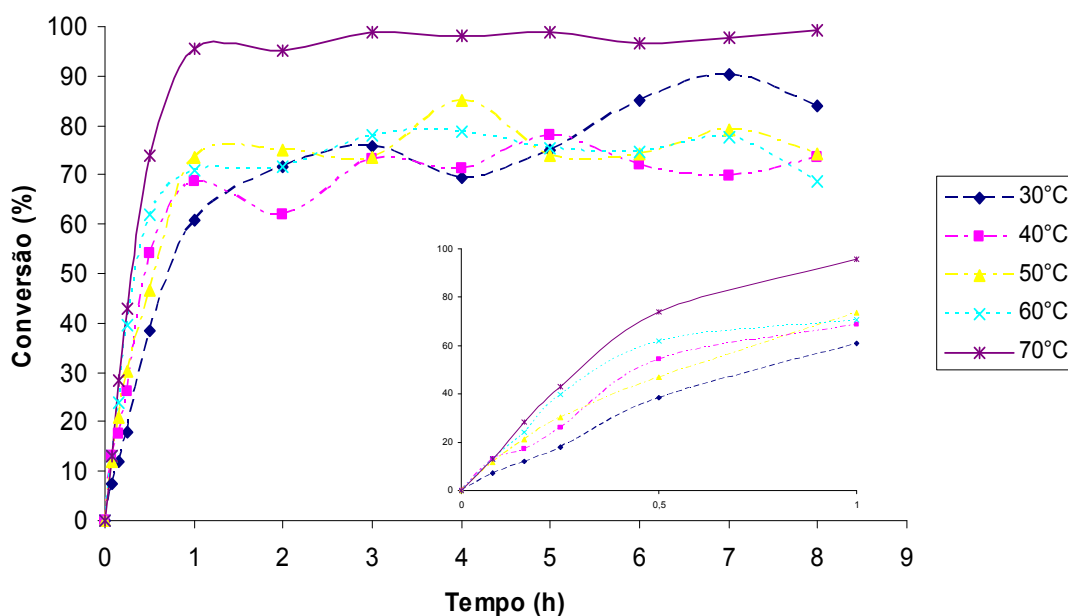


Figura 17 - Efeito da temperatura sobre a conversão de palmitato de 2-etilexila à razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol de 1:6, concentração de enzima de 10% (p/p substratos) e agitação de 150 rpm em sistema livre de solvente utilizando a enzima Lipozyme RM IM.

As taxas iniciais de reação para as cinéticas avaliando o efeito da temperatura utilizando as duas enzimas estão apresentadas na Tabela 23. Pode-se notar para a enzima Novozym 435 uma elevada taxa inicial da reação na temperatura de 60°C, onde apresentou a maior conversão no tempo de 5 minutos como pode ser visto na Figura 16. Para a Lipozyme RM IM a taxa inicial de reação não variou significativamente na faixa de temperatura de 40 a 70°C, como pode ser notado na Figura 17, onde até 5 minutos de reação as conversões foram próximas, porém a partir dos 10 minutos de reação maiores conversões foram obtidas na temperatura de 70°C.

Tabela 23 – Taxa inicial de reação em função da temperatura na esterificação enzimática em sistema livre de solvente utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM.

Temperatura (°C)	r (min ⁻¹)	
	Novozym 435	Lipozyme RM IM
30	1,83	1,26
40	2,08	1,81
50	2,53	2,07
60	4,56	2,20
70	3,19	2,57

Ao final da consecução de todos os experimentos cujos resultados foram apresentados e discutidos no decorrer deste capítulo, cumpre mencionar que a atividade enzimática manteve-se praticamente constante em todas as condições experimentais testadas, com uma perda média observada inferior a 10%. Os valores de atividade de esterificação e atividade residual são detalhados no Apêndice B.

5.4 Considerações finais

Os resultados apresentados neste capítulo visaram avaliar a influência das variáveis no processo e otimizar a produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente visando que os melhores resultados em

termos de conversão de palmitato de 2-etilhexila foram encontrados no ponto central do segundo planejamento experimental para a enzima Lipozyme RM IM, e no ponto central do terceiro planejamento experimental para a Novozym 435. Em relação ao estudo cinético realizado, o qual avaliou os efeitos da razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol, concentração de enzima (%) (p/p substratos) e temperatura, conversões na ordem de 80% em 30 minutos de reação puderam ser observadas com as duas enzimas.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 Conclusões

Neste trabalho foi estudada a produção enzimática de palmitato de 2-etilexila, bem como a influência das variáveis de processo e cinética da reação.

A metodologia analítica se mostrou eficaz na quantificação de palmitato de 2-etilexila produzido pela reação de esterificação utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM como catalisadores.

O presente trabalho permitiu avaliar a influência da razão molar ácido:álcool, concentração de enzima e temperatura na conversão do processo para as duas enzimas estudadas, podendo-se concluir que:

- A condição otimizada para produção de palmitato de 2-etilexila (93,74% em 6 horas) por Novozym 435 foi de 70°C, 150 rpm, razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol 1:5,5, 10,5% (p/p substratos) de enzima.

- A condição otimizada para produção de palmitato de 2-etilexila (95,22% em seis horas) por Lipozyme RM IM foi de 70°C, 150 rpm, razão molar ácido palmítico:2-etil-hexanol 1:3, 10% (p/p substratos) de enzima.

- Na avaliação do efeito da razão molar ácido:álcool com a enzima Novozym 435, altas conversões em palmitato de 2-etilexila foram alcançadas quando da condução da reação a razão molar (ácido:álcool) de 1:5 (92,72%) e 1:7 (98,22%), 70°C, 150rpm e 10% (p/p substratos) de enzima em 1 hora de reação.

- Na avaliação do efeito da razão molar ácido:álcool com a enzima Lipozyme RM IM, altas conversões em palmitato de 2-etilexila foram alcançadas (95,22%) quando da condução da reação a razão molar (ácido:álcool) de 1:3, 70°C, 150rpm e 10% (p/p substratos) de enzima em 1 hora de reação.

- Nas concentrações de enzima de 5, 10, 15 e 20% (p/p), utilizando a enzima Novozym 435, na condição de 70°C, agitação de 150rpm, razão molar ácido:álcool de 1:6, altas conversões foram encontradas em 1 hora de reação

(94,03, 95,71, 88,69 e 98,60%, respectivamente), tendo a conversão permanecido constante após esse tempo de reação.

- Nas concentrações de enzima de 5, 10, 15 e 20%, utilizando a enzima Lipozyme RM IM, na condição de 70°C, agitação de 150rpm, razão molar ácido:álcool de 1:6, altas conversões foram encontradas em 1 hora de reação (84,69, 95,66, 93,14, 94,20%, respectivamente), tendo a conversão permanecido constante após esse tempo de reação.

- Na avaliação da temperatura altas conversões de palmitato de 2-etilexila foram encontradas em 70°C e 30 minutos de reação com a Novozym 435 (95,71%) e 70°C e 1 hora de reação com a Lipozyme RM IM (95,66). A taxa de reação inicial mais elevada foi de 4,56 min⁻¹, na temperatura de 60°C com a Novozym 435.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

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

- Emprego de outras lipases como catalisadores, incluindo lipases não comerciais;
- Aprimoramento da análise quantitativa do produto da reação, bem como a utilização de outras técnicas para análise de palmitato de 2-etilexila; Tendo em vista que o 2-etilexanol usado no presente trabalho é um racemato e considerando que, cineticamente, a lipase deve consumir um enantiômero mais rapidamente que outro, sugere-se o acompanhamento da conversão via HPLC com colunas quirais e/ou uso de detetor polarimétrico a fim de se desenvolver um modelo cinético avançado;
- Avaliação do número de ciclos de utilização das lipases imobilizadas em modo batelada;
- Avaliação da produção enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente em modo contínuo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTILHO, L.R.; POLATO, C. M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA JR., G.L.; FREIRE, D.M.G. **Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state and submerged fermentations.** Biochemical Engineering Journal, v. 4, p. 239-247, 2000.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W.A. **Fine chemicals by biotransformation using lipase.** Química Nova, v. 18, p. 544 –554, 1995.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** Química Nova, v. 27, p. 146-156, 2004.

CHANG, S-W.; SHAW, J-F.; SHIEH, C-H.; SHIEH, C-J. **Optimal formation of hexyl laurate by Lipozyme IM-77 in solvent-free system.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.54, p.7125 - 7129, 2006.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. **Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros.** Química Nova, v. 27, p. 623-630, 2004.

DÖRMO, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U. GUBICZA, L. **Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system.** Biochemical Engineering Journal, v.21, p. 229-234, 2004.

FREIRE, M. G. D.; CASTILHO, R. L. **Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido.** Rev. Bras. Farm., Rio de Janeiro, v.81, p.48-56, 1999.

GANDHI N.N.; PATIL N.S.; SAWANT S.B.; JOSHI J.B.; WANGIKAR P.P.; MUKESH D. **Lipase-catalyzed esterification.** Catalysis reviews-science and engineering., v. 42, p.439-480, 2000.

GANDHI, N.N. **Applications of lipases**. J.Am. Oil Chem. Soc., v.74, p. 621-634, 1997.

GARCIA, T.; SANCHEZ, M.; MARTINEZ, M.J. **Optimization of lipase-catalyzed synthesis of 3-hexen-1-yl acetate by direct esterification in hexane and a solvent-free medium**. Enzyme Microb. Technol., v.25, p. 584, 1999.

GOTOR-FÉRNANDEZ V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. **Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic., v.40, p.111-120, 2006.

GUBICZA L.; KABIRI-BADR A.; KEOVES, E.; BELAFI-BAKO K.; **Large scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvents with continuous water removal**. Journal Biotechnol., v.84, p. 193-196, 2000.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOGLU, Ü. **The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system**. Process Biochemistry, v.38, p. 379-386, 2002.

HASAN, F.; SHAN, A.A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases**. Enzyme and Microbial Technology, v.39, p.235-251, 2006.

HE, X-L.; CHEN, B-Q.; TAN, T-W. **Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl esters of fatty acids by immobilized lipase from *Candida* sp.** 99-125. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.18, p. 333-339, 2002.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; GHAMGHI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI, Y. **Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system**. Process Biochemistry, v.41, p.1692-1698, 2006.

KAZLAUSKAS, R.J.; BORNSCHEUER, U.T. In: **A Multi-Volume Comprehensive Treatise Biotechnology**. Rehm, H. J.; Stader, P.; eds.; v. 8A, p.38, 1998.

KOBLITZ, M.G.B; **Purificação e caracterização de Lipase de *Rhizopus* sp. e sua aplicação na síntese de monoacilgliceróis**. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, SP, 2003.

KRISHNA, S.H.; MANOHARM B.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. **Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor miehei* by response surface methodology**. Enzyme Microb. Technology. v.26, p.131-136, 2000.

KUMAR, R.; MADRAS, G.; MODAK, J. **Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide**. Ind. Eng. Chem. Res. v.43, p.1568-1573, 2004.

LANGONE, M.A.P. **Síntese de triglicerídeos catalisada por lipase**. Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 1998.

LINKO, Y.Y.; LAMSA, M.; HUHTALA, A.; LINKO, P. **Lipase catalyzed transesterificação of rapeseed oil and 2-ethyl-1-hexanol**. J. Am. Oil Chem. Soc., v.71, p. 1411, 1994.

MADRAS, G.; KUMAR, R.; MODAK, J. **Synthesis of octyl palmitate in various supercritical fluids**. Ind. Eng. Chem. Res. v.43, p.7697-7701, 2004.

MALCATA, F.X.; REYES, H.R.;GARCIA, H.S.; HILL, C.G. Jr.; AMUNDSON, C.H. **Immobilized lipase reactors for modification of fat and oils: a review**. J. Am. Oil Chem. Soc. v. 67, p.890-910, 1990.

MALDONADO, Rafael Resende. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais.** Campinas: 2006. Dissertação de Mestrado. Departamento de engenharia de alimentos, Universidade Federal de Campinas, Faculdade de engenharia de alimentos.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; RUBIRA, A.F.; KUNITA, M.H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V. **Assesment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids.** Journal of Supercritical Fluids, v.38, n.3, p. 373-382, 2006.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. **Solid state fermentation for the production of industrial enzyme.** Current Science, v. 77, p. 149-162, 1999.

PAULA, A. V.; BARBOSA, C. S.; CASTRO. **Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares.** Química Nova, v. 28, p. 792-796, 2005.

PINTO, G.F.; ABARZÚA, E.G.O.; ANTUNES, O.A.C. **Catálise Assimétrica.** Cadernos Didáticos de Pós-Graduação. v. 2, 2001.

SALES, A.L.C. **Síntese, caracterização e análise térmica dos sais de Lítio, Sódio e Potássio do Ácido palmítico e do seu éster etílico.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2006.

SANTOS J.C.; BUENO T.; ROS P.C.M.; CASTRO H.F. **Lipase-catalyzed synthesis of butyl esters by direct esterification in solvent-free system.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 82, p. 956-961, 2007.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W.S. **Purifications strategies for microbial lipases.** Journal Microbiology Methodology, v.52, p.1-18, 2003.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. **Production, purification, characterization and applications of lipases**. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.

TAN, T.; CHEN, B-Q.; YE, H. **Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl palmitate by lipase immobilized on fabric membranes in the batch reactor**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 29, p. 41-45, 2006.

VIJA, H.; TELLING, A.; TOUGU, V.; **Lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide and hexane**. *Bioog. Med. Chem. Lett.*, v.7, p.259-262, 1997.

VIKLUND, F.; ALANDER, J.; HULT, K. **Antioxidative properties and enzymatic synthesis of ascorbyl fatty acid esters**. *JAOCS*, v. 80, p. 795-799, 2003.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.9, p. 113-148, 2000.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica**. Cap. 4, 2000.

VULFSON, E.N. In: **Lipases: Their structure, biochemistry and Application**: WOOLEY. P.; PETERSEN, S. B.; eds.; Cambridge University Press: Great Britain, 1994.

YAHYA, A.R.M.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. **Ester synthesis in lipase catalyzed reaction**. *Enzyme Microb. Technol.*, n. 23, p.438-450, 1998.

ZAIDI A.; GAINER, J.L.; CARTA, G. **Fatty acid esterification using nylon-immobilized lipase**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 48, p. 601-605, 1995.

<http://www.elekeiroz.com.br>. Acessado em 12/08/2008.

<http://www.jovii.com.br>. Acessado em 10/08/2008.

APÊNDICE A – ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

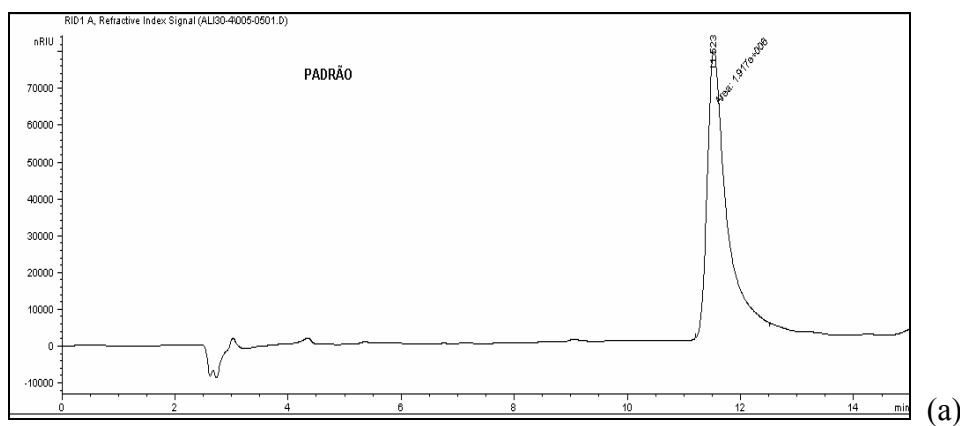
Neste capítulo serão apresentadas as curvas de calibração e a metodologia do cálculo realizado para a obtenção da conversão em palmitato de 2-etilexila. As curvas de calibração mostradas como exemplo com seus respectivos coeficientes de correlação referem-se aos dados obtidos para os cálculos de conversão do primeiro planejamento experimental, pois para cada nova análise uma nova curva de calibração foi obtida (utilizando as mesmas concentrações) com seus respectivos coeficientes de correlação.

Calibração do método cromatográfico

O padrão, palmitato de 2-etilexila, e os substratos utilizados, ácido palmítico e 2-etil-hexanol, foram injetados separadamente e seus tempos de retenção são apresentados na Tabela A.1. Os cromatogramas ilustrativos para os mesmos são apresentados na Figura A.1 (a), (b) e (c).

Tabela A.1 – Padrão e substratos analisados e seus tempos de retenção.

Componente	Tempo de Retenção (min)
palmitato de 2-etilexila	11,01
Ácido Palmítico	4,36
2-etil-hexanol	3,07



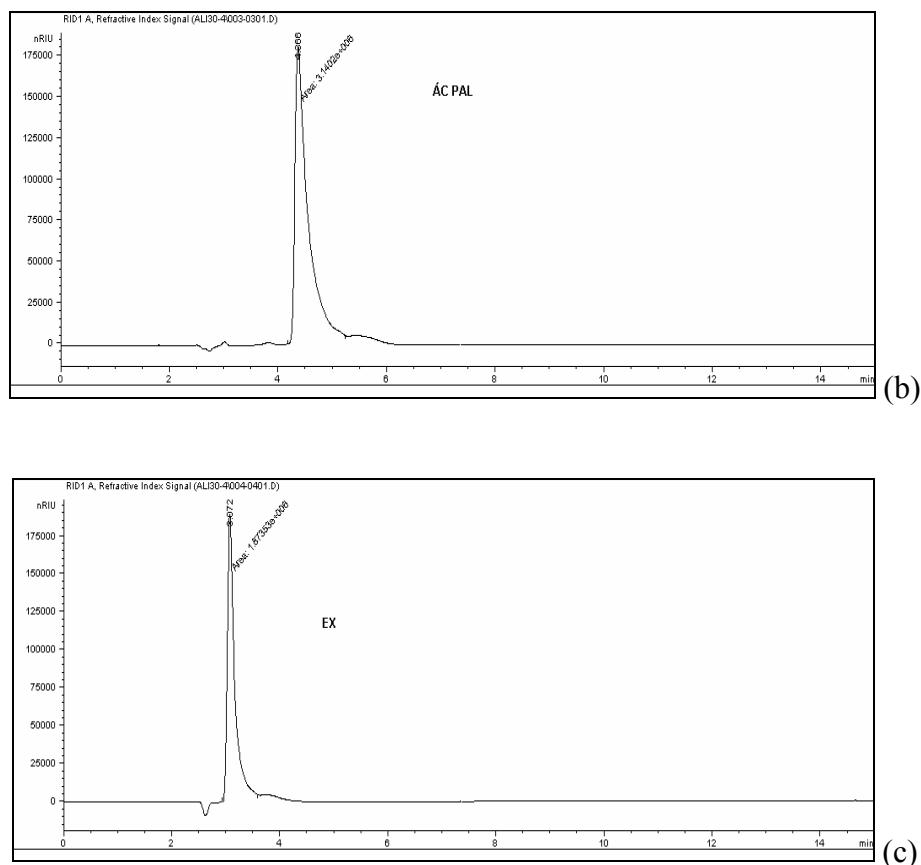


Figura A.1 – Cromatogramas do tempo de retenção do palmitato de 2-etilexila (a), ácido palmítico (b) e 2-etil-hexanol (c).

Para a quantificação do produto e de ácido palmítico convertido (substrato limitante no meio reacional), foram construídas as curvas de calibração para o produto palmitato de 2-etilexila e para o substrato ácido palmítico. Primeiramente, para cada componente, foram preparadas soluções estoques com a concentração de 50.000 mg/L. A partir da solução estoque foram preparadas soluções nas concentrações de 1.410, 2.820, 5.640, 11.280, 16.920, 22.560, 28.200 e 33.840 mg/L. Em um balão volumétrico de 10 mL, foram colocados as quantidades (mL) de solução estoque, apresentadas na Tabela A.2, e completou-se o balão com a fase móvel acetona/metanol/água (75:25:5).

Tabela A.2 – Quantidades de solução estoques utilizadas do produto de 2-etilhexil palmitato e do substrato ácido palmítico para preparo das soluções padrões em diferentes concentrações.

Concentração (mg/L)	Solução estoque (mL)
1.410	0,28
2.820	0,56
5.640	1,12
11.280	2,24
16.920	3,38
22.560	4,50
28.200	5,64
33.840	6,76

As soluções padrões em diferentes concentrações foram injetadas e as concentrações para cada composto foram construídas em função de suas áreas resultantes nos cromatogramas, obtendo-se as curvas de Calibração apresentadas na Figura A.2 (a) e (b).

As equações obtidas nas curvas de calibração para palmitato de 2-etilhexila e para o ácido palmítico e seus respectivos coeficientes de correlação são apresentados a seguir:

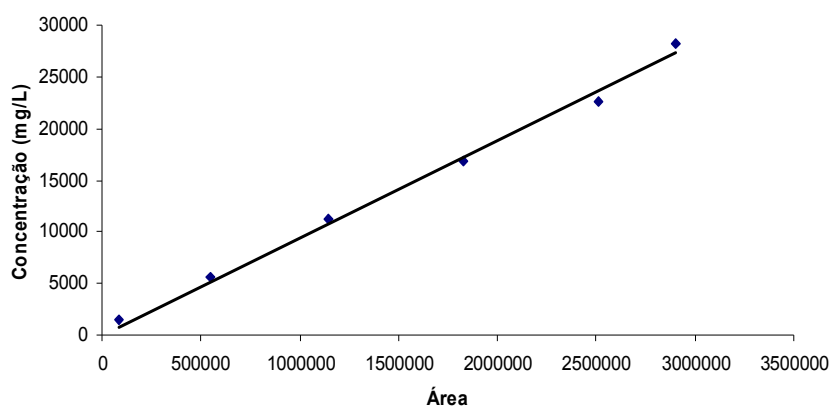
$$\text{Concentração de palmitato de 2-etilhexila} = 0,0094 \cdot \text{Área} \quad (\text{A.1})$$

$$R^2 = 0,9945$$

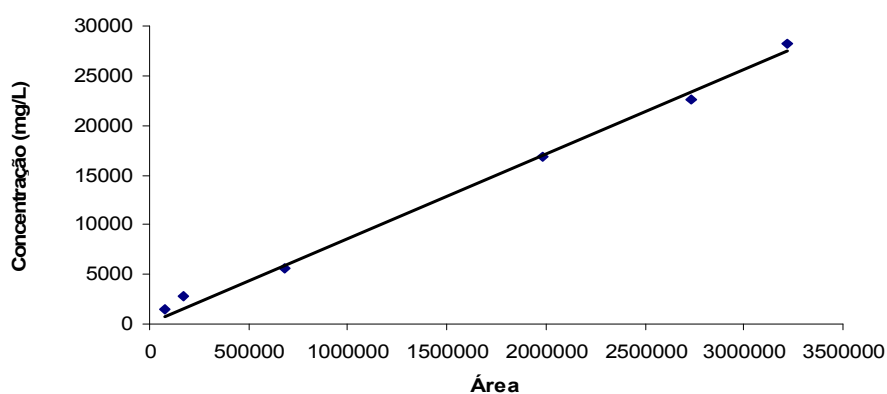
$$\text{Concentração de ácido palmítico} = 0,0086 \cdot \text{Área} \quad (\text{A.2})$$

$$R^2 = 0,9943$$

As amostras das reações foram diluídas em 50mL de fase móvel e injetadas em HPLC. Através da área obtida a concentração foi calculada pela curva de calibração (Equação A.1). Para quantificação do ácido palmítico convertido na reação o mesmo procedimento foi usado (Equação A.2). No estudo cinético, as alíquotas retiradas do meio reacional (50 μ L), foram diluídas



(a)



(b)

Figura A.2 – Curvas de calibração para palmitato de 2-etilexila (a) e para o ácido palmítico (b). Os pontos indicam os resultados experimentais e as linhas contínuas referem-se às curvas de calibração.

em 450 μ L de fase móvel e injetadas. O mesmo procedimento adotado anteriormente foi utilizado nesta etapa.

Após obtenção da concentração do substrato ácido palmítico (limitante da reação), a massa do mesmo foi obtida através do seguinte cálculo:

$$m = \text{Concentração (mg/L)} \cdot \text{diluição (0,05L)} / 1000 = m \text{ (g)}$$

A porcentagem de ácido palmítico presente no meio reacional foi calculada através da seguinte equação (A.3):

$$\begin{aligned}
 m_{AP(g)} &\longrightarrow 100\% \\
 m_{AP(g)} &\longrightarrow X
 \end{aligned}
 \tag{A.3}$$

onde:

$m_{AP(g)}$ = massa total de ácido palmítico utilizada (g)

$m_{AP(g)}$ = massa de ácido palmítico presente na amostra injetada (g)

X = porcentagem de ácido palmítico presente no meio reacional.

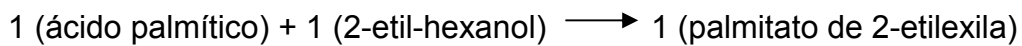
Calcula-se desta forma a conversão de ácido palmítico diminuindo-se o total da amostra (100%) da porcentagem presente no meio reacional (X).

O detalhamento das conversões obtidas está apresentado no Apêndice B.

Após obtenção da concentração do produto, a massa do produto foi obtida através do seguinte cálculo:

$$m = \text{Concentração (mg/L)} \cdot \text{diluição (0,05L)} / 1000 = m(\text{g})$$

A conversão de palmitato de 2-etilexila foi calculada em função da equação global:



Então:

$$\begin{aligned}
 m_{P(g)} &\longrightarrow 100\% \\
 m_{P(g)} &\longrightarrow X
 \end{aligned}
 \tag{A.4}$$

onde:

$m_{P(g)}$ = massa de produto teórica (g)

$m_{P(g)}$ = massa do produto presente na amostra injetada (g)

X = porcentagem de produto presente no meio reacional.

APÊNDICE B – DETALHAMENTO DOS RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados experimentais obtidos neste estudo, referente à conversão de palmitato de 2-etilexila.

Resultados Experimentais

Nas tabelas a seguir são apresentados os resultados obtidos nos testes, planejamentos experimentais, avaliação cinética e atividade enzimática da esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila.

Tabela B.1 – Concentração dos substratos ácido palmítico e 2-etil-hexanol (mmol) utilizados nos testes de avaliação de solubilidade em sistema livre de solvente e utilizando solventes orgânicos n-hexano, éter de petróleo e iso-octano.

Razão Molar (A.P:E.H)	Concentração A.P:E.H (mmol)
1:1	2/2
2:1	4/2
4:1	8/2
6:1	12/2

Tabela B.2 – Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila avaliando-se o biocatalisador a ser utilizado no meio reacional, razão molar A.P/E.H 1:1, 10% de enzima [E] (p/p substratos), (1:5 p/v) de éter de petróleo em relação ao ácido palmítico, 10 horas de reação adição de sílica gel (1g), 24 horas de reação e 40°C, utilizando as lipases imobilizadas Novozym 435 e Lipozyme RM IM.

	A.P convertido (%)	Produto (%)
Novozym 435	78,02	97,44
Lipozyme RM IM	89,16	89,55

Tabela B.3 – Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila na cinética da produção enzimática palmitato de 2-etilexila utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM em sistema livre de solvente e com a adição de solvente n-hexano (1:3,5 p/v) em relação ao ácido palmítico, na temperatura de 60°C, razão molar A.P:E.H 1:1, concentração da enzima de 10% [E] (p/p substratos).

Tempo (hrs)	Ácido palmítico convertido (%)				Produto (%)			
	S/ Solvente		C/ Hexano		S/ Solvente		C/ Hexano	
	Novo	Lipo	Novo	Lipo	Novo	Lipo	Novo	Lipo
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	92,67	93,74	70,51	90,08	77,57	63,84	52,42	75,20
6	90,92	90,81	90,43	95,44	79,41	79,43	78,74	82,88
12	89,25	90,69	98,21	94,14	67,93	71,16	77,50	80,35
18	94,33	89,86	95,62	96,63	75,77	76,14	76,31	77,74
24	91,48	83,00	96,74	98,29	75,47	68,28	78,37	71,64

Tabela B.4 – Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila (%) para o primeiro planejamento experimental utilizando Novozym 435.

Ensaio	T (°C)	Razão Molar	[E] (%) p/p substratos	A.P convertido (%)	Conversão produto (%)
1	-1 (40)	-1 (1:1)	-1 (1)	39,95	28,51
2	+1 (70)	-1 (1:1)	-1 (1)	71,98	54,28
3	-1 (40)	+1 (1:3)	-1 (1)	65,16	50,55
4	+1 (70)	+1 (1:3)	-1 (1)	89,61	76,05
5	-1 (40)	-1 (1:1)	+1 (10)	76,68	56,85
6	+1 (70)	-1 (1:1)	+1 (10)	93,38	79,81
7	-1 (40)	+1 (1:3)	+1 (10)	92,86	77,31
8	+1 (70)	+1 (1:3)	+1 (10)	96,53	86,80
9	0 (55)	0 (1:2)	0 (5,5)	91,62	79,51
10	0 (55)	0 (1:2)	0 (5,5)	90,54	76,61
11	0 (55)	0 (1:2)	0 (5,5)	90,34	79,01

Tabela B.5 – Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila (%) para o primeiro planejamento experimental utilizando Lipozyme RM IM.

Ensaio	T (°C)	Razão Molar	[E] (%) p/p substratos	A.P cConvertido (%)	Conversão produto (%)
1	-1 (40)	-1 (1:1)	-1 (1)	35,55	22,37
2	+1 (70)	-1 (1:1)	-1 (1)	54,19	44,84
3	-1 (40)	+1 (1:3)	-1 (1)	47,66	46,62
4	+1 (70)	+1 (1:3)	-1 (1)	79,13	70,79
5	-1 (40)	-1 (1:1)	+1 (10)	82,73	67,36
6	+1 (70)	-1 (1:1)	+1 (10)	97,45	83,09
7	-1 (40)	+1 (1:3)	+1 (10)	94,90	75,94
8	+1 (70)	+1 (1:3)	+1 (10)	96,45	85,58
9	0 (55)	0 (1:2)	0 (5,5)	91,95	78,31
10	0 (55)	0 (1:2)	0 (5,5)	93,79	83,73
11	0 (55)	0 (1:2)	0 (5,5)	94,70	82,82

Tabela B.6 – Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila (%) para o segundo planejamento experimental utilizando Novozym 435.

Ensaio	Razão Molar	[E] (%) p/p substratos	A.P convertido (%)	Conversão produto (%)
1	-1 (1:1,5)	-1 (5)	100,00	93,99
2	+1 (1:5)	-1 (5)	98,13	94,01
3	- 1 (1:1,5)	+1 (15)	99,28	94,83
4	+1 (1:5)	+1 (15)	99,05	88,89
5	-1,41 (1:1)	0 (10)	94,89	71,38
6	+1,41 (1:6)	0 (10)	98,97	94,97
7	0 (1:3)	-1,41 (3)	97,27	89,09
8	0 (1:3)	+1,41 (17)	99,53	51,51
9	0 (1:3)	0 (10)	99,74	94,59
10	0 (1:3)	0 (10)	99,37	91,48
11	0 (1:3)	0 (10)	95,09	92,23

Tabela B.7 – Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila (%) para o segundo planejamento experimental utilizando Lipozyme RM IM.

Ensaio	Razão Molar	[E] (%) p/p substratos	A.P convertido (%)	Conversão produto (%)
1	-1 (1:1,5)	-1 (5)	97,78	91,12
2	+1 (1:5)	-1 (5)	94,25	96,40
3	- 1 (1:1,5)	+1 (15)	97,72	89,14
4	+1 (1:5)	+1 (15)	95,30	96,93
5	-1,41 (1:1)	0 (10)	93,89	84,51
6	+1,41 (1:6)	0 (10)	93,83	96,15
7	0 (1:3)	-1,41 (3)	97,67	93,11
8	0 (1:3)	+1,41 (17)	95,06	96,76
9	0 (1:3)	0 (10)	96,34	94,98
10	0 (1:3)	0 (10)	93,05	96,46
11	0 (1:3)	0 (10)	92,77	94,22

Tabela B.8 – Resultados experimentais da conversão de ácido palmítico e palmitato de 2-etilexila (%) para o terceiro planejamento experimental utilizando Novozym 435.

Ensaio	Razão Molar	[E] (%) p/p substratos	A.P convertido (%)	Conversão produto (%)
1	-1 (1:2,3)	-1 (3,8)	98,88	85,12
2	+1 (1:8,7)	-1 (3,8)	92,36	89,27
3	- 1 (1:2,3)	+1 (17,2)	99,78	82,70
4	+1 (1:8,7)	+1 (17,2)	90,95	83,93
5	-1,41 (1:1)	0 (10,5)	97,45	76,66
6	+1,41 (1:10)	0 (10,5)	88,09	87,34
7	0 (1:5,5)	-1,41 (1)	97,86	79,20
8	0 (1:5,5)	+1,41 (20)	92,71	78,91
9	0 (1:5,5)	0 (10,5)	90,43	94,59
10	0 (1:5,5)	0 (10,5)	100,00	91,67
11	0 (1:5,5)	0 (10,5)	97,61	94,97

Tabela B.9 – Resultados experimentais da conversão de palmitato de 2-etilexila (%) para a cinética avaliando o efeito da razão molar com Novozym 435.

Conversão palmitato de 2-etilexila (%)					
Tempo (h)	Razão Molar (mol/mol)				
	(1:1)	(1:3)	(1:5)	(1:7)	(1:10)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,08	11,92	19,77	41,77	37,85	39,98
0,16	22,89	27,92	42,59	43,36	49,77
0,25	30,88	34,25	53,07	50,02	48,39
0,5	35,90	68,98	73,93	80,10	91,69
1	36,14	79,29	92,72	98,22	88,78
2	36,50	81,24	95,23	98,63	82,21
3	37,53	80,23	92,32	87,05	93,18
4	32,14	74,98	84,95	90,83	94,01
5	35,18	72,47	94,78	85,92	93,23
6	32,52	73,31	92,45	85,58	88,00
7	31,53	77,43	87,74	96,72	82,86
8	30,63	67,45	93,31	98,49	94,11

Tabela B.10 – Resultados experimentais da conversão de palmitato de 2-etilexila (%) para a cinética avaliando o efeito da razão molar com Lipozyme RM IM.

Conversão palmitato de 2-etilexila (%)					
Tempo (h)	Razão Molar (mol/mol)				
	(1:1)	(1:3)	(1:5)	(1:7)	(1:10)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,08	3,48	9,77	15,47	12,60	10,79
0,16	7,85	20,75	26,97	25,67	22,10
0,25	12,16	36,81	37,01	39,10	35,11
0,5	27,61	78,99	64,62	74,40	77,37
1	47,73	95,22	81,26	82,61	96,53
2	56,55	99,99	90,79	89,78	95,70
3	56,87	97,04	95,01	89,11	95,91
4	59,62	98,95	90,36	86,21	82,67
5	56,32	98,99	91,12	88,99	89,73
6	59,33	98,12	95,85	80,25	95,77
7	57,54	99,32	95,95	90,46	98,56
8	58,46	99,01	90,01	94,14	97,22

Tabela B.11 – Resultados experimentais da conversão de palmitato de 2-etilexila (%) para a cinética avaliando o efeito da concentração de enzima com Novozym 435.

Conversão palmitato de 2-etilexila (%)					
Concentração enzima (%) (p/p substratos)					
Tempo (h)	1	5	10	15	20
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,08	5,52	19,79	31,41	33,25	42,19
0,16	7,89	28,56	39,56	42,53	43,48
0,25	16,23	35,58	43,06	47,06	49,46
0,5	64,01	94,03	95,71	88,69	98,60
1	75,52	95,93	99,80	97,40	99,29
2	97,01	98,73	98,36	97,99	98,49
3	99,01	99,69	95,89	97,61	93,88
4	99,56	98,86	99,11	96,16	95,25
5	95,91	98,53	99,21	96,65	95,89
6	99,74	98,68	98,45	98,47	98,72
7	97,66	93,55	97,15	92,85	98,41
8	99,21	98,46	99,81	91,36	98,54

Tabela B.12 – Resultados experimentais da conversão de palmitato de 2-etilexila (%) para a cinética avaliando o efeito da concentração de enzima com Lipozyme RM IM.

Conversão palmitato de 2-etilexila (%)					
Tempo (h)	Concentração enzima (%) (p/p substratos)				
	1	5	10	15	20
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,08	4,83	12,18	13,01	17,61	22,93
0,16	5,30	15,31	28,32	39,74	41,89
0,25	5,63	24,70	42,95	46,00	49,20
0,5	15,92	44,28	74,04	86,53	85,86
1	29,95	84,69	95,66	93,14	94,20
2	40,65	99,63	95,22	95,38	95,31
3	53,93	93,90	98,86	94,86	96,71
4	66,84	89,63	98,04	91,17	95,15
5	80,87	95,85	98,81	97,77	98,18
6	89,12	98,63	96,47	98,85	98,19
7	88,36	97,99	97,66	99,65	98,48
8	89,71	99,37	99,34	98,96	99,02

Tabela B.13 – Resultados experimentais da conversão de palmitato de 2-etilexila (%) para a cinética avaliando o efeito da temperatura com Novozym 435.

Conversão palmitato de 2-etilexila (%)					
Tempo (h)	Temperatura (°C)				
	30	40	50	60	70
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,08	13,37	21,51	24,85	27,58	31,41
0,16	22,75	31,13	33,88	43,22	39,56
0,25	27,72	36,57	42,89	47,09	43,06
0,5	52,75	59,87	70,74	61,89	95,71
1	65,65	72,58	82,25	77,27	99,80
2	84,05	68,89	77,93	82,06	98,36
3	75,56	76,52	72,54	81,28	95,89
4	74,42	80,70	75,28	81,70	99,11
5	77,20	72,93	76,29	79,38	99,21
6	72,75	75,58	88,28	76,39	98,45
7	80,70	78,08	83,79	83,60	97,15
8	86,89	90,19	80,07	86,10	99,81

Tabela B.14 – Resultados experimentais da conversão de palmitato de 2-etilexila (%) para a cinética avaliando o efeito da temperatura com Lipozyme RM IM.

Conversão palmitato de 2-etilexila (%)					
Tempo (h)	Temperatura (°C)				
	30	40	50	60	70
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,08	7,32	12,88	11,84	13,18	13,01
0,16	11,99	17,40	21,05	23,98	28,32
0,25	17,86	26,19	30,29	39,72	42,95
0,5	38,53	54,26	46,75	61,85	74,04
1	60,90	68,71	73,53	70,77	95,66
2	71,60	61,98	75,00	71,56	95,22
3	75,66	73,29	73,37	77,85	98,86
4	69,52	71,09	85,15	78,57	98,04
5	74,93	78,13	73,83	75,56	98,81
6	85,05	72,01	74,21	74,46	96,47
7	90,21	69,81	79,21	77,73	97,66
8	84,11	73,67	74,22	68,59	99,34

Tabela B.15 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual nas reações de determinação da tempo reacional de síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente utilizando a enzima Novozym 435.

TEMPO DE REAÇÃO	ATIVIDADE ESTERIFICAÇÃO (U/g)	ATIVIDADE RESIDUAL (%)
Antes do início da reação	52,90	100
4 hrs	5,30	10,01
6 hrs	52,64	99,50
12 hrs	49,07	92,76
18 hrs	12,61	12,61
24 hrs	12,46	23,84

Tabela B.16 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual nas reações de determinação da tempo reacional de síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente utilizando a enzima Lipozyme RM IM.

TEMPO DE REAÇÃO	ATIVIDADE ESTERIFICAÇÃO (U/g)	ATIVIDADE RESIDUAL (%)
Antes do início da reação	63,3	100
4 hrs	12,38	19,56
6 hrs	30,23	47,76
12 hrs	34,04	53,77
18 hrs	25,54	40,35
24 hrs	7,20	11,37

Tabela B.17 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual nas reações de determinação da tempo reacional de síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila utilizando solvente n-hexano e a enzima Novozym 435.

TEMPO DE REAÇÃO	ATIVIDADE ESTERIFICAÇÃO (U/g)	ATIVIDADE RESIDUAL (%)
Antes do início da reação	52,90	100
4 hrs	48,76	92,17
6 hrs	18,15	34,31
12 hrs	40,90	77,31
18 hrs	24,30	45,93
24 hrs	42,15	79,68

Tabela B.18 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual nas reações de determinação da tempo reacional de síntese enzimática de palmitato de 2-etilexila utilizando solvente n-hexano e a enzima Lipozyme RM IM.

TEMPO DE REAÇÃO	ATIVIDADE ESTERIFICAÇÃO (U/g)	ATIVIDADE RESIDUAL (%)
Antes do início da reação	63,3	100
4 hrs	40,76	64,39
6 hrs	31,80	50,24
12 hrs	37,41	59,10
18 hrs	8,17	12,91
24 hrs	18,46	29,16

Tabela B.19 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual na produção de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente no 2º Planejamento Experimental utilizando a enzima Novozym 435.

Ensaio	ATIVIDADE ESTERIFICAÇÃO (U/g)	ATIVIDADE RESIDUAL (%)
Antes do início da reação	52,9	100
4	27,05	51,13
6	38,2	72,21
8	34,47	65,16
10	42,8	80,90

Tabela B.20 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual na produção de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente no 2º Planejamento Experimental utilizando a enzima Lipozyme RM IM.

Ensaio	ATIVIDADE ESTERIFICAÇÃO (U/g)	ATIVIDADE RESIDUAL (%)
Antes do início da reação	63,3	100
2	17,87	28,23
6	38,93	61,50
8	14,98	23,66
9	26,65	42,10

Tabela B.21 – Resultados experimentais da atividade de esterificação e atividade residual na produção de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente no 3º Planejamento Experimental utilizando a enzima Lipozyme RM IM.

Ensaio	ATIVIDADE ESTERIFICAÇÃO (U/g)	ATIVIDADE RESIDUAL (%)
Antes do início da reação	63,3	100
2	33,46	52,86
4	34,87	55,08
8	33,80	53,40
9	32,08	50,68