



Universidade do Algarve

Instituto Superior de Engenharia

Departamento de Engenharia Alimentar

**Produção de butirato
de etilo catalisada por lipases imobilizadas**

Carla Sofia da Palma Grosso

Mestrado em Tecnologia de Alimentos

**Faro
2011**



Universidade do Algarve

Instituto Superior de Engenharia

Departamento de Engenharia Alimentar

**Produção de butirato
de etilo catalisada por lipases imobilizadas**

Carla Sofia da Palma Grosso

Mestrado em Tecnologia de Alimentos

**Dissertação orientada por: Professora Doutora Paula Pires Cabral
Professora Doutora Suzana Ferreira Dias**

**Faro
2011**

Eu, Carla Sofia da Palma Grosso, aluna nº 24846 do curso de Mestrado em Tecnologia dos Alimentos, da Universidade do Algarve, declaro abaixo assinado, que o conteúdo da presente Dissertação é da minha inteira responsabilidade e que me comprometo a entregar um exemplar definitivo, após a discussão da dissertação, à Universidade do Algarve.

Faro, 27 de Julho de 2011

(Carla Sofia da Palma Grosso)

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Símbolos	viii
Capítulo 1	1
Introdução Geral	1
1.1.Introdução Geral e Objectivos	2
1.2.Organização da Dissertação	3
Capítulo 2	4
Revisão Bibliográfica	4
2.1 Biocatálise	5
2.1.1 Aspectos Gerais.....	5
2.1.2 Biocatálise em Meios Não-Convencionais.....	6
2.1.2.1 Biocatálise em Solventes Orgânicos.....	8
2.2 Lipases	10
2.2.1 Produção de Aromatizantes por Lipases.....	11
2.2.2 Estrutura e Propriedades das Lipases	12
2.2.3 Influência da Água na Actividade das Enzimas	15
2.2.4 Lipases de <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Aspergillus niger</i> e de <i>Rhizopus oryzae</i>	16
2.2.4.1 Lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i>	16
2.2.4.2 Lipases de <i>Aspergillus niger</i>	17
2.2.4.3 Lipases de <i>Rhizopus oryzae</i>	17
2.3 Imobilização de Enzimas	18
2.3.1 Modificações Conformacionais e Esterioquímicas	21
2.3.2 Fenómenos de partição e concentração de Substratos e Água no Microambiente	21
2.3.3 Efeitos de Transferência de Massa	22
2.4 Bioreactores	23
2.5 Cinética da Reacção de Esterificação Catalisada por Lipases	24
2.6 Metodologia das Superfícies de Resposta (RSM)	25
Capítulo 3	30
Materiais e Métodos	30
3.1 Materiais.....	31

3.1.1 Biocatalisadores.....	31
3.1.2 Reagentes.....	32
3.1.3 Matriz de Imobilização.....	32
3.2 Métodos.....	32
3.2.1 Imobilização da Lipase.....	32
3.2.2 Reacções de Esterificação.....	33
3.2.3 Análise da Composição do Meio Reaccional por Cromatografia Gasosa.....	34
3.2.4 Determinação do Teor de Água do Meio Reaccional.....	35
3.2.5 Delineamento Experimental para Modelação da Produção de Butirato de Etilo ...	35
3.2.6 Estimativa das Concentrações no Microambiente do Biocatalisador.....	37
3.2.7 Tratamento Estatístico dos Resultados Experimentais.....	37
3.2.8 Validação dos Modelos de Esterificação.....	37
Capítulo 4.....	39
Resultados e Discussão.....	39
4.1 Calibração do Cromatógrafo Gasoso.....	40
4.2 Selecção de Lipases.....	40
4.3 Modelação Optimização da Produção de Butirato de Etilo.....	45
4.4 Validação dos Modelos de Esterificação.....	54
4.5 Comparação com outros Estudos.....	56
Capítulo 5.....	57
Conclusões.....	57
Conclusões.....	58
Capítulo 6.....	60
Perspectivas de Trabalho Futuro.....	61
Capítulo VII.....	63
Bibliografia.....	63

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Paula Pires Cabral, não apenas toda a sua disponibilidade, elevada competência científica e mestria com que assistiu o meu trabalho, mas também a amizade e confiança demonstrada ao longo deste último ano.

Agradeço à minha co-orientadora, professora Doutora Suzana Ferreira Dias pela disponibilidade, pelas sugestões e correcções ao desenvolvimento e revisão desta dissertação.

Quero igualmente agradecer a todos os Professores que leccionaram o Mestrado e Tecnologia Alimentar do Departamento de Engenharia Alimentar do Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve e que tornaram possível a realização deste trabalho pelos conhecimentos que me transmitiram.

Agradeço aos meus colegas de Mestrado pelos momentos divertidos e pela força que me deram para continuar e chegar ao fim de mais uma etapa importante na minha vida.

Agradeço aos técnicos dos laboratórios de Química e de Processamento do Departamento de Engenharia Alimentar: Teresa Cavaco, Vera Gonçalves, Clarisse Ramalho e todos os outros que de alguma forma foram imprescindíveis à realização deste trabalho. Obrigada pelos momentos divertidos e ajuda que me proporcionaram.

Agradeço a todos os meus amigos que sempre me apoiaram durante esta etapa, em particular a Cecília Castro, Rosa Lameiras, Tucha, Teresa Major, Filipa Andrade, Rui Inglês, Inês Severino e Sofia Januário.

Não posso deixar de agradecer aos meus colegas de trabalho por toda a força que me deram nos últimos dois anos.

Agradeço aos meus pais por me apoiarem incondicionalmente e nunca duvidarem das minhas capacidades e pelo seu enorme amor.

Agradeço à minha tia Maria por toda a sua infinita paciência e por todo o apoio e carinho que me deu durante toda a minha vida.

Agradeço à minha irmã pela amizade, apoio, carinho que sempre tem demonstrado por mim.

E por fim, agradeço ao meu amor e lindo sobrinho Tiago que foi sem dúvida uma bênção na minha vida por todos os sorrisos que me deu e que me deram força para continuar.

Resumo

Este trabalho de dissertação, teve como objectivo seleccionar o biocatalisador que melhor se adaptasse às condições reaccionais pretendidas, a partir de um *screening* de lipases comerciais de *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae*, immobilizadas em espuma hidrofílica de poliuretano Hypol FHP 2002TM e de lipases não comerciais de *Yarrowia lipolytica* immobilizadas em diferentes suportes: Lewatit VP OC 1065, HPL, Amberlite 96, Lewatit K 2629, Lewatit VO OC 1026 e Lewatit MP TP 214 e de *Rhizopus oryzae* immobilizada em espuma de poliuretano Hypol FHP 2002TM, de modo a modelar e otimizar a reacção de esterificação de etanol com ácido butírico em *n*-hexano, para produção de butirato de etilo.

A lipase comercial de *Rhizopus oryzae* immobilizada em Hypol FHP 2002TM foi o biocatalisador que conduziu a valores mais elevados de produtividade volumétrica (2,12 $\mu\text{mol/mL.h}$), velocidade inicial de esterificação (148 $\mu\text{mol/min.gbiocatalisador}$), concentração (0,102 M) e conversão (31,9 %) em butirato de etilo, quando testada nas condições do ponto central do delineamento experimental realizado.

A Metodologia das Superfícies de Resposta foi utilizada para modelar a reacção de esterificação acima referida, como função da temperatura, T (21,6 °C - 38,4 °C), da concentração inicial de ácido butírico, A (0,031 M - 0,619 M) e da razão molar inicial etanol/ácido butírico, RM (0,257 M - 2,443 M). Os ensaios foram realizados de acordo com um delineamento experimental central rotativo compósito, tendo-se verificado que a produção e conversão em butirato de etilo podem ser descritas por equações polinomiais de segunda ordem. A concentração máxima de butirato de etilo (0,106 M) e a taxa conversão máxima em éster (32,6 %), previstas pelos modelos, verificam-se quando as condições reaccionais iniciais de T, A e RM são 31,5 °C, 0,225 M e 1,637 e 18,9 °C, 0,27M e 1,687, respectivamente.

Verificou-se que o aumento da concentração de ácido butírico, na presença de excesso de etanol provoca um aumento na concentração de etanol no microambiente do biocatalisador. A temperatura tem uma influência significativa no aumento da concentração de etanol no microambiente do biocatalisador.

Palavras-chave: Esterificação, *screening*, lipases de *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, poliuretano, butirato de etilo.

Abstract

The aim of this experimental work was to choose the best biocatalyst from a screening of commercial lipases of *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae* immobilized in hydrophilic polyurethane foams Hypol FHP 2002TM and non-commercial lipases of *Yarrowia lipolytica* immobilized in: Lewatit VP OC 1065, HPL, Amberlite 96, Lewatit K 2629, Lewatit VO OC 1026 and Lewatit MP TP 214, and *Rhizopus oryzae* immobilized in Hypol FHP 2002TM, to model and optimize the esterification reaction of ethanol (EtOH) with butyric acid (A) in *n*-hexane, for the production of ethyl butyrate (ESTER).

The commercial *Rhizopus oryzae* lipase immobilized in Hypol FHP 2002TM was the biocatalyst which showed higher values of volumetric productivity (2.12 $\mu\text{mol/mL.h}$), esterification rate (148 $\mu\text{mol/min.gbiocatalyst}$), ester concentration (0.102 M) and conversion into ester (31.9 %) when tested under the central point of the experimental design performed.

Response Surface Methodology was used for modeling the reaction, as function of the temperature, T (21.6 °C - 38.4 °C), initial butyric acid concentration, A (0.031 M - 0.619 M) and initial molar ratio EtOH/A, RM (0.257 - 2.443). Experiments were carried out following a central composite rotatable design. Production and conversion into ESTER could be fitted to surfaces described by second-order polynomials. A maximum concentration of ESTER (0.106 M) and a maximum conversion rate into ESTER (32.6 %) are expected at initial reaction conditions of T, A and RM of 31.5 °C, 0.225 M and 1.637 and 18.9 °C, 0.27 M and 1.687, respectively.

It was found that increasing of the concentration of butyric acid in the presence of excess of ethanol causes an increase in ethanol concentration in the microenvironment of biocatalyst. In addition, temperature has a significant influence in ethanol concentration in the microenvironment of the biocatalyst.

Keywords: esterification, screening, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Yarrowia lipolytica* lipases, polyurethane, ethyl butyrate.

Lista de Símbolos

A	Concentração inicial de ácido butírico.....(M)
A_q	Aquafilicidade
a_w	Actividade termodinâmica da água
BSNA	Biocatálise em solventes não aquosos
CCRD	Central composite rotatable design (Delineamento central compósito rotativo).
C_{micro}	Concentração de soluto no microambiente do biocatalisador, após equilíbrio de partição... (M)
C_{micro_A}	Concentração de ácido butírico no microambiente..... (M)
$C_{micro_{EtOH}}$	Concentração de etanol no microambiente.....(M)
CONV	Conversão em Éster%
ESTER	Concentração em Éster.....(M)
EtOH	Etanol
“FHP 2002”	Pré-polímero de poliuretano hidrofílico Hypol FHP 2002TMcedido pela DoW Chemical Company, UK.
ΔG	Varição da energia livre de Gibbs
K_M	Constante de Michäelis-Menten
MDI	Diisocianato de defenilmetano
RPM	Rotações por minuto
RM	Razão molar inicial de etanol/ácido butírico no meio orgânico
R^2	Coefficiente de determinação
R^2_{adj}	Coefficiente de determinação ajustado
ROL	Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>
RSM	Metodologia das Superfícies de Resposta (Response Surface Methodology)
T	Temperatura(°C)
TDI	Diisocianato de tolueno
Vinicial	Velocidade inicial da reacção de esterificação

Capítulo 1

Introdução Geral

1.1. Introdução Geral e Objectivos

Os ésteres derivados de ácidos carboxílicos de cadeia curta têm um papel muito importante na indústria alimentar no que diz respeito à sua utilização como aromatizantes.

O interesse por parte dos consumidores em relação a produtos naturais levou a um aumento considerável da produção destes aromatizantes, por processos de extracção, a partir das suas fontes naturais. A quantidade e qualidade dos compostos aromatizantes assim extraídos, dependem consideravelmente das variações climáticas e da quantidade de matéria-prima disponível, o que condiciona o processo. A maior parte destes ésteres aromatizantes é produzida por via química, a partir de uma reacção catalítica de condensação de um álcool e um ácido, que na sua maior parte consistem em processos ambientalmente pouco compatíveis e com elevada produção de produtos secundários indesejáveis. Assim, a consciência cada vez maior da necessidade de utilização de tecnologias ambientalmente sustentáveis (“verdes”) tem conduzido à adopção de metodologias catalíticas mais eficientes para a produção de compostos orgânicos.

Deste modo a pesquisa científica intensificou-se no sentido do desenvolvimento de outros processos de produção para satisfazer as necessidades dos consumidores.

A legislação sobre alimentos, existente em muitos países, reconhece que os produtos podem ser considerados naturais, desde que sejam produzidos a partir de fontes naturais ou a partir de processos de fermentação, tratamentos físicos ou reacções de síntese catalisadas por lipases em sistemas não aquosos (Melo *et al.*, 2005).

Também foi observado que os ésteres de ácidos gordos sintetizados a partir de reacções catalisadas por lipases, apresentam melhor odor e aroma comparados com os ésteres produzidos por meios convencionais (Nishio *et al.*, 1988). Neste contexto, nos últimos 20 anos, a bioprodução de aromatizantes recorrendo a reacções de esterificação, catalisadas por lipases livres e imobilizadas, em meios não aquosos tem sido amplamente estudada (Ferreira-Dias *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2005; Pires-Cabral *et al.*, 2005b, 2005c, 2007, 2009, 2010; Shih *et al.*, 2007).

O butirato de etilo, éster obtido a partir do ácido butírico e etanol, está presente em aromas frutados como o ananás e o morango e é amplamente utilizado na indústria alimentar.

O objectivo geral do estudo realizado e apresentado nesta dissertação consistiu na (i) selecção de um biocatalisador a partir de lipases comerciais e não comerciais, com vista à produção, por esterificação em meio orgânico, de butirato de etilo e, em seguida, na (ii) modelação e optimização da esterificação de etanol com ácido butírico em *n*-hexano, catalisada pela lipase seleccionada, utilizando uma Metodologia das Superfície de Resposta.

1.2. Organização da Dissertação

A presente dissertação é constituída por sete capítulos. O primeiro capítulo consiste numa introdução geral onde é abordado de um modo geral o enquadramento a nível científico e o objectivo do trabalho realizado. No segundo capítulo, faz-se uma revisão bibliográfica onde será abordado de uma forma sucinta a área de estudo – biocatálise em meios não-convencionais, por utilização de lipases, aplicada à produção de ésteres utilizados como aromatizantes na indústria alimentar. No terceiro capítulo, faz-se a descrição detalhada dos materiais e métodos utilizados no presente estudo. No quarto capítulo, são apresentados os resultados obtidos e a discussão dos mesmos, comparando-os a outros estudos já realizados. No quinto capítulo, apresentam-se as conclusões sobre o trabalho em geral. No sexto capítulo, perspectivam-se trabalhos futuros. Finalmente, no último capítulo estão reunidas as referências bibliográficas citadas ao longo desta dissertação.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Biocatálise

2.1.1 Aspectos Gerais

O termo biocatálise abrange processos nos quais um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato num número limitado de etapas enzimáticas. Para que estes bioprocessos sejam eficazes é necessário analisar de forma pormenorizada os factores que condicionam o desenvolvimento e optimização integrados de um processo biotecnológico. A selecção do biocatalisador, a bioconversão e o isolamento e purificação do produto, são as três etapas de que depende o desenvolvimento e optimização de um bioprocessos (Aires-Barros, 2002).

A selecção de um biocatalisador deve ter em conta a actividade catalítica, a selectividade e a estabilidade do mesmo, nas condições previamente estabelecidas de temperatura, força iónica, pH, natureza da solução tampão e composição do meio reaccional em que irá ser utilizado.

A bioconversão inclui a selecção do meio reaccional e o projecto do reactor. A escolha do meio reaccional pode ser feita entre um meio convencional (meio aquoso) ou um meio não convencional (meios em que a maior proporção da mistura reaccional pode ser um líquido orgânico, uma fase aquosa, um fluído supercrítico ou um líquido iónico). Quanto ao reactor, a sua selecção deve ter em conta a simplicidade de concepção, flexibilidade, segurança de operação e possibilidade de monitorização e controlo dos parâmetros operacionais (Aires-Barros, 2002).

Os processos de recuperação e purificação e a determinação da escala de produção do produto dependem das características do mesmo, ou seja: pontos de fusão e ebulição, solubilidade e estabilidade aos valores de temperatura e de pH de preparação.

As enzimas são catalisadores extremamente eficientes, uma vez que aumentam consideravelmente a velocidade da reacção, comparativamente com a da reacção não catalisada. As enzimas aceleram as reacções devido à diminuição da energia de activação, que provém da libertação de energia que ocorre durante a formação de interacções entre a enzima e o substrato, principalmente no estado de transição. Para que uma enzima possa acelerar uma reacção, a uma dada temperatura, é necessário que diminua a variação da energia livre padrão de activação, pela diminuição da entalpia de activação e/ou por aumento da entropia de activação. A entalpia de activação é reduzida na medida em que a enzima apresenta uma estrutura com grupos posicionados de modo

ideal à interação com o substrato. A entropia de activação é aumentada devido à ligação do substrato à superfície da enzima. A eficiência energética destes catalisadores (funcionamento em condições experimentais suaves) constitui uma das suas principais vantagens relativamente aos catalisadores ditos convencionais. Contudo, é sem dúvida a selectividade que está na base da procura crescente de enzimas para aplicações industriais, e em particular, a selectividade para o substrato (capacidade de discriminar substratos distintos mas estruturalmente semelhantes), a enantioselectividade (preferência por um ou outro enantiómero), a regioselectividade (preferência por um entre vários grupos funcionais idênticos na molécula de substrato) e a quimioselectividade (favorecimento de um determinado grupo funcional do substrato) (Foresti, *et al.*, 2007).

As lipases (triacilglicerolacil-hidrolases, EC3.1.1.3) são uma das classes de enzimas mais estudadas em biotransformações. Têm sido utilizadas na sua forma livre ou imobilizadas. Matrizes como espumas de poliuretano (Pires-Cabral *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c, 2007, 2009, 2010), celite (Melo *et al.*, 2005), sílica gel (Lee *et al.*, 2010) e alginato de cálcio (Ozyilmaz e Gezer, 2009) têm sido amplamente utilizadas para a imobilização de lipases.

2.1.2 Biocatálise em Meios Não-Convencionais

O conceito de biotransformação está associado ao uso de biocatalisadores, onde a água é o solvente preponderante, tendo sido utilizada em inúmeros estudos de cinética enzimática. Contudo, verificou-se que o uso exclusivo da água, limitava a gama de biotransformações, tal como limitava a produtividade de processos que envolviam substratos hidrofóbicos. Além disso, a constatação de que muitas enzimas operam *in vivo* em ambientes ricos em lípidos hidrofóbicos, permitiu concluir que os meios não-aquosos são, de igual modo, adequados à biocatálise (Aires-Barros, 2002; Halling e Kvittingen, 1999).

As razões pelas quais a biocatálise em meios não aquosos não se desenvolveu mais cedo podem ser explicadas principalmente pela inexistência de aplicações para a descoberta. Por outro lado, a convicção de que as enzimas não podiam funcionar na ausência de água, bem como a inexistência de estudos científicos sobre a estrutura e os mecanismos reaccionais das enzimas, contribuíram para que a biocatálise em meios não aquosos permanecesse na obscuridade até à década de 80 do século XX, e só nessa

altura surgisse como área de enorme expansão e interesse industrial (Halling e Kvittingen, 1999). Os meios designados por não-convencionais são caracterizados por possuírem uma quantidade de água disponível reduzida e compreendem solventes tão diversos como solventes orgânicos, fluidos supercríticos, fases gasosas ou sólidas e líquidos iónicos.

A evidência de que, na presença de uma quantidade de água disponível muito reduzida, uma enzima adquire uma estrutura rígida, que lhe permite obter a estabilidade necessária para realizar processos catalíticos, levou a grandes avanços nesta área de investigação. De acordo com Almarsson e Klivanov (1995) e Klivanov (2001) a enzima conserva a sua estrutura nativa em solventes orgânicos virtualmente secos.

O impacto que estes estudos tiveram na indústria foi enorme, tendo-se observado um elevado aumento na utilização de enzimas em solventes orgânicos (Jaeger e Eggert, 2002), pois muitas das reacções de interesse comercial envolviam compostos hidrofóbicos, a que correspondiam produtividades volumétricas reduzidas em sistemas aquosos (Schmid *et al.*, 2001).

Com efeito, há vantagens de utilização de meios não-convencionais em biotransformações, essencialmente pelos seguintes aspectos (Dordick, 1989; Dordick e Gorman, 1991; Cabral *et al.*, 2003):

- i) maior solubilidade de substratos e/ou produtos hidrofóbicos, facilitando o desenvolvimento de processos com produtividade volumétrica elevada;
- ii) facilidade na recuperação de produtos e de enzima do meio reaccional, devido ao baixo ponto de ebulição dos solventes;
- iii) possibilidade de realização de reacções termodinamicamente desfavoráveis na presença de água;
- iv) redução de possíveis efeitos inibitórios e/ou tóxicos por parte dos substratos e/ou produto. O solvente pode ser seleccionado de modo a funcionar como diluente, reduzindo a concentração interfacial e na fase aquosa (por partição) de substratos e/ou produtos;
- v) maior estabilidade da enzima; a estabilidade da enzima está directamente relacionada com a baixa actividade da água no meio, uma vez que a reacção de desnaturação requer água. Na desnaturação é necessário que as enzimas tenham alguma mobilidade, que é conferida pela água. Assim sendo, o processo de desnaturação é difícil em meios não aquosos;
- vi) estratégias de imobilização facilitadas; em meios não aquosos as enzimas não se

desagregam facilmente dos suportes (excepto no processo em contínuo);

vii) controlo da estereoespecificidade das enzimas, uma vez que a rigidez estrutural conferida às enzimas pelos meios não-aquosos pode afectar as interacções enzima-substrato;

viii) facilidade na recuperação do biocatalisador.

Contudo, também se conhecem algumas desvantagens da utilização de meios não-convencionais, nomeadamente de meios orgânicos, das quais se destacam (Dordick 1989; Lima e Angnes, 1999; Cabral *et al.*, 2003):

i) a toxicidade de alguns solventes;

ii) o aumento das limitações difusionais à transferência de massa de substratos e/ou produtos, uma vez que se introduz mais uma fase (orgânica) além da fase aquosa e da fase sólida, se o biocatalisador estiver imobilizado;

iii) a baixa actividade apresentada por algumas enzimas relativamente a meios aquosos.

2.1.2.1 Biocatálise em Solventes Orgânicos

A selecção do solvente é extremamente importante na implementação de um sistema biocatalítico em meio orgânico, uma vez que o solvente tem muita influência na eficácia das reacções mediadas por enzimas, afectando a actividade, estabilidade e selectividade da enzima. A selecção do solvente deve ter em conta vários critérios. Entre os critérios físico-químicos são de realçar a capacidade de solubilização e o coeficiente de partição dos substratos e do produto neste solvente. O solvente deve ser química e termicamente estável, para que não ocorra a formação de emulsões em meio aquoso e para que seja facilitada a separação de fases, a sua viscosidade também deve ser reduzida, uma vez que afecta a transferência de massa e, por último, não deve degradar o biocatalisador. Além disso, o solvente deve ser escolhido tendo em conta algumas normas de segurança, nomeadamente o facto de não apresentar toxicidade ambiental nem ser prejudicial para a saúde humana, além de que não deve ser inflamável. A nível de produção industrial deve-se ter em conta a disponibilidade do mesmo, a possibilidade de reutilização e o custo associado ao seu uso (Aires-Barros, 2002; Krishna e Karanth, 2002).

A natureza do solvente orgânico vai afectar a catálise enzimática a vários níveis, interagindo directa ou indirectamente com a enzima, com os substratos e produtos da

reacção catalítica.

A interacção indirecta do solvente verifica-se a nível da partição da água, substratos e produtos para o microambiente da enzima. Quanto à água, este efeito é devido à tendência que determinados solventes têm para remover água da enzima (“*water stripping*”) (Zaks e Klivanov, 1988), conduzindo a uma insuficiente hidratação da mesma e, conseqüentemente, a um decréscimo da actividade enzimática. A extensão deste fenómeno é maior nos solventes hidrofílicos, pelo que os solventes hidrofóbicos são normalmente preferidos (Foresti *et al.*, 2007).

A interacção indirecta do solvente ao nível dos substratos e dos produtos resulta, do seu poder de solvatação que afecta a disponibilidade daqueles no meio reaccional. O solvente interfere na partição dos substratos para o centro activo, e dos produtos do centro activo para o solvente. Mais especificamente, o solvente afecta a estabilização do substrato, normalmente traduzida pela variação de energias de Gibbs (ΔG) entre o complexo enzima-substrato e o substrato livre (Halling, 1994). Em muitos casos, o ΔG pode ser quantificada pela constante K_M de Michäelis (constante de dissociação) que é tanto mais elevada quanto maior afinidade os substratos tiverem para o solvente, e portanto quanto menor disponibilidade tiverem para o centro activo da enzima (Bell *et al.*, 1995).

Os efeitos directos do solvente estão associados à interacção entre este e o centro activo do biocatalisador, podendo causar alterações de polaridade no centro activo, modificando a afinidade deste para com a enzima. Por outro lado, pode ocorrer uma competição entre as moléculas de solvente e as de substrato para a ligação ao centro activo, levando a uma diminuição da actividade catalítica (Krishna e Karanth, 2002; Foresti *et al.*, 2007). Segundo Halling (1994), as espécies orgânicas menos polares apresentam uma maior tendência para este tipo de competição.

O logaritmo do coeficiente de partição do solvente num sistema padrão n-octano/água ($\log P_{o/w}$), conhecido como parâmetro de Hansch, é um indicador do grau de hidrofobia do solvente em causa. O valor de $\log P_{o/w}$ de um dado solvente pode ser determinado experimentalmente, ou calculado através do método das constantes hidrófobas fragmentadas de Rekker (Laane *et al.*, 1986). Em média, solventes com $\log P_{o/w}$ inferior a 2-3 são considerados tóxicos, enquanto aqueles com $\log P_{o/w}$ superiores a 4-5 são considerados biocompatíveis, muito embora estes intervalos dependam do biocatalisador considerado. A maior toxicidade dos solventes polares é justificada com base no facto de estes solventes terem a capacidade de dissolverem a água, tornando-a

indisponível para a hidratação das enzimas, ou seja, reduzem a actividade da água no sistema. Por outro lado, os solvente mais apolares não interagem com as moléculas de água, originando sistemas bifásicos, sem alterarem a actividade da água do sistema. Assim, a estabilidade de um biocatalisador num solvente orgânico pode ser melhorada usando um solvente imiscível em água. Deste modo, obtém-se um sistema bifásico com a enzima e os compostos hidrofílicos na fase aquosa, e com os substratos e produtos hidrofóbicos na fase orgânica (Laane *et al.*, 1986; Cabral *et al.*, 2003).

O *n*-hexano, solvente utilizado neste estudo, é considerado um solvente adequado para reacções de esterificação e tem sido largamente utilizado em biocatálise, apesar de apresentar um $\log P_{o/w}$ de 3,5 (Ghamgui *et al.*, 2004; Pires-Cabral *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c, 2007, 2009, 2010; Karra-Chaabouni *et al.*, 2008; Raghavendra *et al.*, 2009). Ganapati e Lathi (2003) referem, num estudo realizado sobre a influência de solventes na síntese de isobutirato de butilo, catalisada por diversas lipases, maiores taxas de conversão quando utilizaram hexano (47 %), sendo apenas ultrapassado este valor quando foi utilizado heptano como solvente, que apresenta um $\log P_{o/w}$ superior a 4. Estes autores referem ainda que o uso deste solvente não altera a conformação, estabilidade e actividade catalítica da enzima. Mais recentemente, Salah *et al.* (2007), testaram vários solventes orgânicos na produção de acetato de etilo catalizada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em celite 545 e verificaram que o *n*-hexano é um solvente adequado para reacções de esterificação, tendo obtido conversões na ordem dos 76 %.

2.2 Lipases

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3) são a família de enzimas com maior interesse do ponto vista prático pela sua elevada actividade e selectividade, por possuírem estabilidade relativamente elevada, por não necessitarem de cofactores dispendiosos e por operarem em condições de temperatura, pH e pressão relativamente moderadas. Das fontes produtoras de lipases, as microbianas são as de maior interesse industrial por vários motivos, entre eles, a grande variedade de microrganismos produtores deste tipo de enzimas e por serem em muitos casos facilmente obtidas comercialmente e com produtividade elevada, nomeadamente por fungos e bactérias (Jaeger e Eggert, 2002; Rajendran *et al.*, 2009). Deste modo, a sua aplicação é vasta.

A função natural das lipases é a a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos gordos e

glicerol (Fig. 2.1).

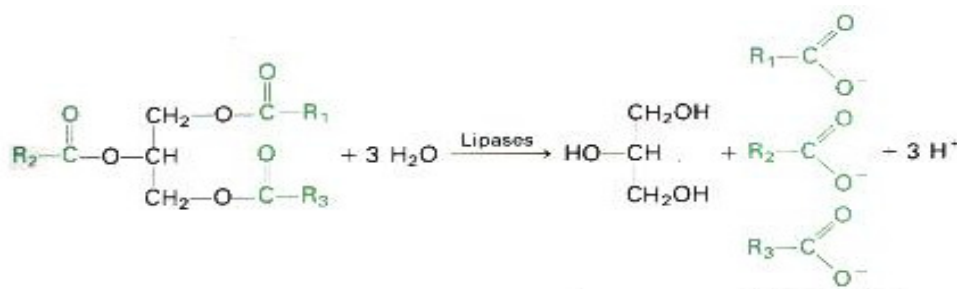
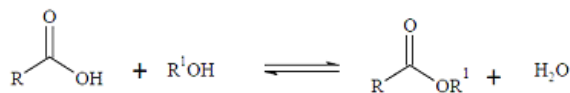


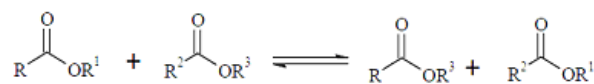
Figura 2.1 - Reacção de hidrólise de triacilglicerol, catalisada por lipases.

Em ambientes aquo-restritos, as lipases têm-se mostrado bastante activas em reacções de esterificação, transesterificação, inter-esterificação, alcoólise e aminólise (Foresti *et al.*, 2007). O uso de lipases tem inúmeras aplicações em processos biotecnológicos, onde se destacam as indústrias de detergentes, do papel, farmacêuticas, cosmética, agroquímica e alimentar. No que diz respeito à indústria alimentar, as reacções com maior interesse são as de interesterificação, transesterificação e esterificação em meios não convencionias, na modificação de óleos e gorduras e/ou na produção de ésteres aromatizantes (Rajendran *et al.*, 2009) (Fig. 2.2).

Esterificação



Interesterificação



Transesterificação

Alcoólise

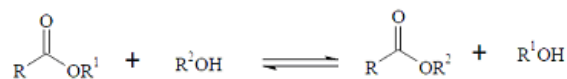


Figura 2.2 – Reacções de esterificação, inter e transesterificação (figura adaptada de Paques e Macedo, 2006).

2.2.1 Produção de Aromatizantes por Lipases

A obtenção de ésteres aromatizantes por via biocatalítica tem bastantes vantagens relativamente à sua obtenção por catálise química. As vantagens a destacar são a alta selectividade ou especificidade das enzimas, velocidades reaccionais elevadas mesmo para baixas razões molares de substratos, ambientalmente compatível e

possibilidade de utilização de condições reacionais suaves (Aravindan *et al.*, 2007). A produção de aromatizantes por via enzimática, utilizando lipases como biocatalisadores, é descrita em diversos sistemas reacionais. A síntese de ésteres como o butirato de citronelil (Melo *et al.*, 2005), o butirato de etilo (Dias *et al.*, 1991; Pires-Cabral *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c, 2007, 2009, 2010) e o valerato de etilo (Ozyilmaz e Gezer, 2009; Raghavendra *et al.*, 2009) foi realizada em meio orgânico utilizando diferentes solventes. O laurato de butilo e o butirato de butilo (Santos *et al.*, 2007) foram obtidos em sistema livre de solvente orgânico. Mais recentemente têm vindo a ser sugeridos os fluidos supercríticos e líquidos iônicos, como uma alternativa viável à utilização de meios não convencionais considerados ambientalmente compatíveis, para a síntese deste tipo de ésteres (Habulin *et al.*, 2007; de Diego *et al.*, 2009; Moniruzzaman *et al.*, 2009; Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010).

Vários estudos têm demonstrado a possibilidade de obtenção de ésteres com elevados rendimentos utilizando diversas lipases de origem microbiana (Melo *et al.*, 2005; Hasan *et al.*, 2006; Salah *et al.*, 2007; Mahapatra *et al.*, 2009; Pires-Cabral *et al.*, 2010). Os ésteres produzidos deste modo são predominantemente obtidos em meios orgânicos com baixo teor de água, de modo a manter a sua conformação e estabilidade (Rajendran *et al.*, 2009).

2.2.2 Estrutura e Propriedades das Lipases

As lipases microbianas são glicoproteínas de massa molecular variando entre 19 e 60 kDa, apresentando em torno de 258 e 544 resíduos de aminoácidos, dos quais um grande número são hidrofóbicos e responsáveis pela interacção entre a enzima e substratos insolúveis em água (Jaeger e Reetz, 1998).

As lipases exibem um padrão de dobramento característico, conhecido como dobra hidrolase α/β . O centro da lipase é composto por uma folha β central com até oito lâminas $\beta(\beta_1 - \beta_8)$ ligadas por até seis α hélices (A – F), como pode ser visto na figura 2.3.

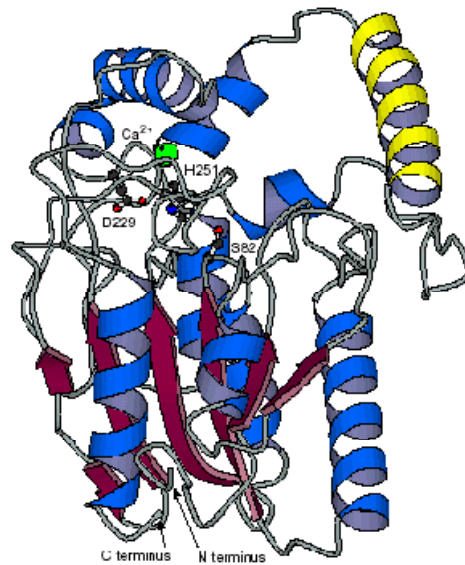


Figura 2.3 – Estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. As lâminas beta estão representadas por setas a vermelho e as hélices a azul e amarelo. Os resíduos do centro activo Ser82, Asp229 e His251 estão indicados (figura reproduzida de Jaeger e Reetz, 1998).

O centro activo das lipases é composto por uma tríade catalítica, geralmente serina, histidina e aspartato (Jaeger e Reetz, 1998). Actuam sobre substratos pouco solúveis em água, em interfaces de lípido/água hidrolisando acilgliceróis de cadeia longa (só com mais de 8 átomos de carbono), produzindo ácidos carboxílicos e álcoois, com um número menor e ligações éster, e, eventualmente glicerol. Na presença de quantidades vestigiais de água, as lipases catalisam a reacção inversa de esterificação (Rajendran *et al.*, 2009).

A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990) e da lipase pancreática humana (Winkler *et al.*, 1990) por difracção de raio-X, proporcionou uma explicação para o fenómeno designado por “activação interfacial”. Descobriu-se que o centro activo de algumas lipases é protegido estericamente por uma espécie de “tampa”, formada por resíduos hidrofóbicos, que são deslocados ao entrar em contacto com o substrato, expondo o centro activo (Jääskeläinen *et al.*, 1998). Quando essas lipases são submetidas a meios aquosos, o deslocamento dessa estrutura torna-se termodinamicamente desfavorável.

O movimento da estrutura que compõe a tampa confere às lipases pelo menos duas conformações distintas, sendo a primeira denominada “fechada” ou inactiva quando não se verifica o deslocamento da “tampa” e, a segunda denominada “aberta” ou activa, quando esse deslocamento se observa, na presença de substratos hidrofóbicos

(Fig. 2.4).

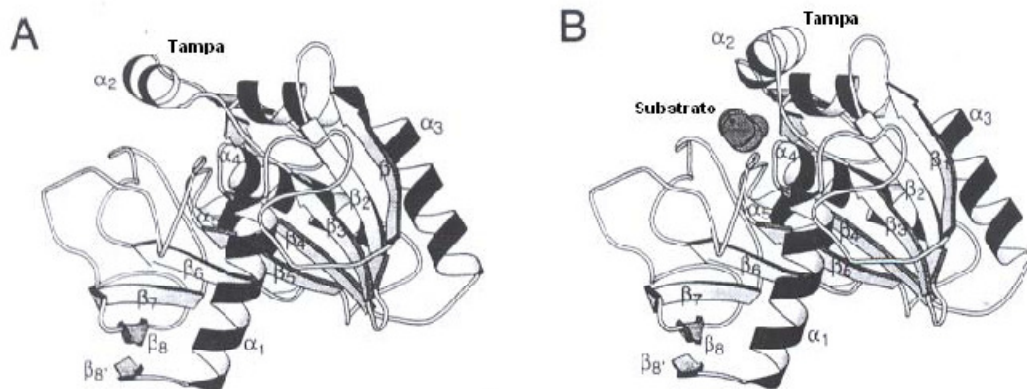


Figura 2.4 – Esquema representativo das conformações "fechada" (A) e "aberta" (B) da lipase de *Rhizomucor miehei* (figura reproduzida de Jääskeläinen *et al.*, 1998).

No que diz respeito às propriedades físico-químicas, verificou-se que a maior parte das lipases mantem estabilidade e actividade a um pH óptimo que se encontra normalmente entre 6,0 e 8,0 (Nawani e Kaur, 2007; Shu *et al.*, 2006; Rajendran *et al.*, 2009). Contudo, há exemplos referidos na literatura, de actividade catalítica a valores extremos de pH: a lipase de *Kluyveromyces lactis* apresenta actividade a pH óptimo de 2,0 (Oishi *et al.*, 1999) e a lipase de *Penicillium cyclopium* exhibe maior actividade e estabilidade a um pH de 10,0 (Ibrik *et al.*, 1998).

Relativamente à temperatura a que se verifica a actividade enzimática máxima, são observados valores muito distintos, como por exemplo: 5 °C para a lipase de *Pseudomonas fluorescens* B68 (Luo *et al.*, 2006) e 97 °C para a lipase de *Pyrococcus horikoshii* (Ando *et al.*, 2002).

Em processos alimentares, as lipases devem possuir uma elevada estabilidade num intervalo próximo da temperatura ambiente. Normalmente, a estabilidade térmica aumenta quando a reacção é levada a cabo num solvente orgânico hidrofóbico em vez de um meio aquoso. Quando as enzimas são expostas a temperaturas elevadas, em meio aquosos, sofrem um processo de desenrolamento que expõe os grupos reactivos e as áreas hidrofóbicas mais internas, o que se traduz em modificações químicas irreversíveis, desordenamento monomolecular e agregação. Os processos químicos que normalmente levam a inactivação (largamente acelerados a elevadas temperaturas) são a desaminação dos resíduos de aspargina e glutamina, hidrólise das ligações peptídicas nos resíduos de ácido aspártico, e outros processos químicos. Todos estes processos

exigem a participação de água e, portanto não ocorrem quando as reacções são levadas a cabo num solvente orgânico (Lima e Angnes, 1998).

2.2.3 Influência da Água na Actividade das Enzimas

Segundo Foresti *et al.* (2007), o teor de água é um parâmetro crucial para a biocatálise realizada em meio orgânico, sob dois aspectos: o primeiro refere-se ao equilíbrio termodinâmico da reacção, ou seja, numa reacção de síntese, o excesso de água pode deslocar o equilíbrio a favor da reacção de hidrólise; o segundo aspecto diz respeito à existência imprescindível de uma monocamada de água a envolver a enzima. Esta camada de água designa-se por camada de hidratação e é fundamental para a manutenção da estrutura terciária da enzima e da sua actividade catalítica. De acordo com Zacks e Klibanov (1988), a actividade catalítica depende apenas da quantidade de água ligada, que constitui esta camada, sendo indiferente a quantidade da mesma no solvente, o que é indicativo da capacidade das enzimas funcionarem neste tipo de solventes.

As moléculas de água, presentes na camada de hidratação, encontram-se fortemente ligadas a grupos ionizáveis por forças intermoleculares, tais como pontes de hidrogénio, interações iónicas, forças hidrofóbicas e forças de van der Waals, e a sua mobilidade é extremamente diminuta, o que permite à enzima manter a conformação que lhe confere maior actividade catalítica. As restantes moléculas de água rodeiam grupos polares carregados e regiões não polares (Zacks e Klibanov, 1988).

A quantidade de água mínima, que corresponde à situação em que cada molécula de enzima contacta directamente com uma só camada de água (meio orgânico anidro), que se denomina camada essencial, protege a enzima da desnaturação pelos solventes orgânicos, uma vez que funciona como “tampão” entre a superfície da enzima e o seio do meio reaccional (Dordick, 1989; Foresti *et al.*, 2007). Contudo, a desactivação da enzima pode ocorrer devido à interacção entre o solvente e a água ligada à enzima, pelo que é necessário escolher adequadamente o solvente tendo em conta o biocatalisador a utilizar.

2.2.4 Lipases de *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus niger* e de *Rhizopus orizae*

2.2.4.1 Lipase de *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um microrganismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos. Foi originalmente classificada como *Candida lipolytica* e depois reclassificada como *Endomycopsis lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica* (Barth e Gaillardin, 1997).

Esta levedura é bastante diferente dos modelos celulares mais estudados como a *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (consideradas leveduras “convencionais”) no que diz respeito à fisiologia, genética e biologia molecular. Pertence portanto ao grupo das leveduras “não-convencionais”, sendo a espécie mais estudada desse grupo (Barth e Gaillardin, 1997).

Como não é considerada patogénica, tem sido utilizada em aplicações industriais como na produção de proteínas de microrganismos unicelulares, *flavour* de pêssego e ácido cítrico, em processos considerados pela *American Food and Drug Administration*, (FDA), como *Generally Regarded As Safe*, (GRAS) (Tsugawa *et al.*, 1969). Além disso, segrega várias enzimas como proteases, lipases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (Aloulou *et al.*, 2007).

Uma vez que *Y. lipolytica* pode usar ácidos gordos como fontes de carbono, o interesse sobre as lipases produzidas por este microrganismo intensificou-se. A lipase de *Y. lipolytica* (YLip2) é considerada uma lipase com elevada actividade quando utilizada em reacções de hidrólise, esterificação, transesterificação e na presença de ácidos gordos de cadeias carbonadas longas (C12-C16), sendo classificada como uma lipase (1,3) específica (Ghamgui *et al.*, 2004; Guieysse *et al.*, 2004; Fickers *et al.*, 2005; Aloulou *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007a, 2007b).

As lipases de *Y. lipolytica* têm sido utilizadas na catálise de reacções em meios pobres em água, quer na sua forma livre, quer immobilizada (Wen *et al.*, 2008; Tecelão *et al.*, 2010).

2.2.4.2 Lipases de *Aspergillus niger*

Aspergillus niger é um dos mais importantes microrganismos usados em biotecnologia e que produz muitas lipases extracelulares reconhecidas como GRAS pela FDA (Mhetras *et al.*, 2009).

As lipases de *A. niger* têm sido utilizadas com sucesso em áreas como a farmacêutica e alimentar, quer livres quer imobilizadas (Carvalho *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2008, 2009; Nunes *et al.*, 2010). Kwon *et al.* (2000) estudaram a utilização de lipases de *A. niger* em reacções de síntese enantiomérica selectiva do ácido (S)-2-metilbutanóico (presente em aromas frutados de maçã ou morango) tendo obtido bons resultados. Mais recentemente, em reacções de transterificação e de esterificação de 2-feniletil ésteres esta lipase de *Aspergillus niger* foi utilizada na sua forma livre (Tan *et al.*, 2011).

As lipases de *A. niger* hidrolisam ligações éster dos triacilgliceróis nas posições *sn*-1 e *sn*-3, sendo deste modo muito utilizadas em reacções de transesterificação (Weete, 1998).

2.2.4.3 Lipases de *Rhizopus oryzae*

Lipases de *Rhizopus oryzae* têm sido produzidas directamente a partir do fungo filamentoso com o mesmo nome ou a partir de outros microrganismos por manipulação genética, uma vez que a quantidade de lipase produzida pelo organismo original é diminuta e a enzima é heterogénea. Exemplo disso é a produção de lipases de *R. oryzae* pelas leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia Pastoris* (Takahashi *et al.*, 1998 e Surribas *et al.*, 2007).

A lipase de *R. oryzae*, ao contrário de muitas lipases, hidrolisa ligações éster dos triacilgliceróis nas posições *sn*-1 e *sn*-3, mas nunca na posição *sn*-2, sendo classificada como uma lipase (1,3) específica. Tal como as anteriormente referidas, tem sido utilizada como biocatalisador em reacções catalíticas com sucesso na indústria petrolífera e alimentar, imobilizadas e/ou livres, em solventes orgânicos ou sem solvente (Molinari *et al.*, 1995; Gandolfi *et al.*, 2001; Ghamgui *et al.*, 2004, Karra-Chaabouni *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010). Exemplo desta utilização, no que diz respeito à área alimentar, é a produção do éster acetato de butilo em *n*-hexano e em meio livre de solvente, catalisada pela lipase de *R. oryzae*, imobilizada em celite 545 e livre (Salah *et al.*, 2007).

2.3 Imobilização de Enzimas

A imobilização de enzimas pode ser definida como uma técnica para fixar enzimas, por meios físicos ou químicos a suportes inertes insolúveis ou a confiná-las num espaço restrito do reactor. A imobilização consiste na restrição do biocatalisador a uma região do reactor, com o objectivo de favorecer a biotransformação.

As vantagens de utilização de enzimas imobilizadas são vastas, podendo-se destacar a possibilidade de reutilização, a realização de processos contínuos, a facilidade na separação dos produtos da biotransformação, e o aumento da actividade e da estabilidade do biocatalisador (Salis *et al.*, 2008).

Por outro lado a imobilização proporciona uma maior homogeneidade das enzimas no meio reaccional, evitando a aglomeração de partículas de enzima. A área acessível aos substratos é superior, uma vez que a enzima encontra-se espalhada sobre a superfície do suporte, o que faz com que a quantidade de centros activos disponíveis seja bastante superior, facilitando também a transferência de massa de substratos e produtos, promovendo deste modo a reacção e consequentemente a produtividade. Persson *et al.* (2002) referem que a lipase de *Humicola lanuginosa* imobilizada em Accurel EP-100 apresentava uma actividade 400 vezes maior do que a da enzima livre, atribuindo o resultado ao espalhamento da enzima pela ampla área superficial do suporte, prevenindo a agregação das moléculas e facilitando o acesso aos substratos. Foresti *et al.* (2005) observou que a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em polipropileno mantinha a sua actividade após 2 horas a 75°C, enquanto a lipase livre apresentava uma actividade de apenas 50 % nestas condições. Salah *et al.* (2007) observaram que a conversão em acetato de butilo pela lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em celite 545 como biocatalisador, foi promovida de forma considerável relativamente à mesma reacção realizada com a lipase livre, tendo obtido conversões de 25 % e 3 %, respectivamente.

No que diz respeito à biocatálise em meios orgânicos, uma das principais vantagens em utilizar um suporte de imobilização é a manutenção de um microambiente aquoso em redor do biocatalisador. Sendo, o controlo da quantidade de água imobilizada de extrema importância (Pires-Cabral *et al.*, 2005a).

A aquafilicidade (A_q), é definida como sendo a razão entre a quantidade de água no suporte e a quantidade de água no solvente, sob condições padrão (Reslow *et al.*,

1988). A aquafilicidade indica-nos, portanto, a capacidade de adsorção de água por um material de suporte. Assim, um suporte com elevada A_q diz-se hidrofílico e, com baixa A_q , hidrofóbico. As enzimas imobilizadas em suportes com elevada aquafilicidade apresentam sempre menor actividade do que as imobilizadas em suportes de baixa aquafilicidade, mesmo após adição de água à preparação enzimática (Adlercreutz, 1991). A quantidade de água também está estritamente relacionada com a estabilidade térmica do biocatalisador. Assim, o suporte ideal deve ter a capacidade de reter a quantidade de água necessária à actividade catalítica reduzindo deste modo os riscos de desnaturação da enzima (Krishna e Karanth, 2002).

Existem vários métodos de imobilização de biocatalisadores. Estes métodos podem ser divididos em quatro grandes grupos: i) a auto-agregação, ii) a ligação a superfícies, iii) a contenção por barreiras e iv) o aprisionamento/ligação a uma matriz porosa.

O método e o tipo de suporte a ser usado num determinado processo deve ter em consideração as características do biocatalisador e as condições de biotransformação. O método de imobilização mais adequado, quando se pretende manter a actividade do biocatalisador, num meio reaccional agressivo, é o aprisionamento do biocatalisador numa matriz porosa (Cabral *et al.*, 2003).

No decorrer do trabalho experimental aqui apresentado, procedeu-se à imobilização da lipase comercial de *Aspergillus niger* e das lipases de *Rhizopus oryzae* comercial e não comercial em espumas de poliuretano. Os pré-polímeros de uretano, desenvolvidos pelo grupo japonês Fukui (Fukui e Tanaka, 1982), têm grupos isocianato em ambos os terminais da cadeia linear como mostra a Figura 2.5. O carácter mais ou menos hidrofílico dos pré-polímeros pode ser obtido modificando a razão entre a fracção polietilenoglicol (partes a e c da Figura 2.5) e a fracção do polipropilenoglicol, que está identificado com b na cadeia de poliéter.

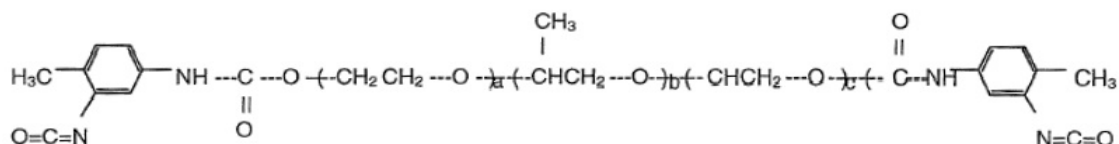


Figura 2.5 – Fórmula de estrutura do pré-polímero de poliuretano (Pires-Cabral, 2005).

Este método de imobilização por aprisionamento/ligação numa matriz porosa

tem sido amplamente utilizado (Dias *et al.*, 1991; Ferreira-Dias *et al.*, 1999, 2003; Bakker *et al.*, 2000; Pires-Cabral *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c, 2007, 2009, 2010). Segundo estes autores, a preparação e manuseamento do biocatalisador é simples e pode ser utilizado de várias formas em diversos tipos de reactores. Após preparação, o biocatalisador pode ser cortado em cuboides e imerso no meio reaccional, onde se mantém em suspensão, num reactor descontínuo ou contínuo de mistura total ou pode constituir o leito fixo de um reactor tubular contínuo com escoamento tipo pistão. Além disso, estes biocatalisadores possuem um elevado potencial de aplicação industrial uma vez que apresentam elevada estabilidade operacional (Ferreira-Dias *et al.*, 2003; Pires-Cabral *et al.*, 2010).

A imobilização é realizada misturando o pré-polímero de isocianato com uma solução de enzima. A reacção polimérica entre as moléculas de pré-polímero dá-se com a formação de ligações de ureia. A água, que é introduzida através da solução enzimática, ao reagir com os grupos diisocianato, produz dióxido de carbono, que ao libertar-se forma um labirinto poroso na estrutura matricial da espuma. Deste modo, as moléculas de enzima ficam aprisionadas dentro desta malha. Juntamente com a oclusão, são formadas ligações covalentes entre os grupos isocianato do pré-polímero e os grupo amina e carboxilo das moléculas proteicas da enzima (Pires-Cabral, 2005a). Após a polimerização é razoável considerar que existam moléculas de enzima não imobilizadas na matriz. Existem diversos pré-polímeros de uretano, entre eles destaca-se o Hypol FHP 2002TM que é um poliéter de poliisocianato derivado de tolueno de diisocianato (TDI) e que tem sido utilizado por diversas vezes na preparação de espumas hidrofílicas para imobilização de lipases (Dias *et al.*, 1991, Ferreira-Dias *et al.*, 1999, Pires-Cabral *et al.*, 2005a, 2005b, 2007, 2009, 2010). A espuma Hypol FHP 2002TM não tem TDI disponível, o que lhe confere um grau de aceitação desta espuma no mercado de produção de aromatizantes, em que um dos critérios mais procurado é o elevado grau de pureza dos materiais e a ausência de toxicidade.

A imobilização enzimática tem tido uma enorme utilidade em biocatálise a nível industrial. Contudo, o processo pode causar alterações, quer na cinética reaccional, quer nas propriedades da enzima, o que resulta numa diminuição da actividade catalítica da mesma. Dentro dos vários efeitos que a imobilização pode causar, destacam-se modificações conformacionais e estereoquímicas, efeitos de partição e limitações difusionais.

2.3.1 Modificações Conformacionais e Esterioquímicas

Quando a enzima é imobilizada no suporte, pode sofrer alterações na sua estrutura tridimensional, com alteração da sua actividade específica, pelo envolvimento de centros activos da enzima em ligações com o suporte. Além disso, o processo de interacção enzima-suporte é quase sempre aleatório, o que pode tornar o acesso dos substratos ao centro activo da enzima menos facilitado (impedimento estereoquímico) (Doran, 1995).

2.3.2 Fenómenos de Partição e Concentração de Substratos e Água no Microambiente

A partição de substratos e produtos entre a fase aquosa e o microambiente do biocatalisador imobilizado dá-se devido a interacções electrostáticas e hidrofóbicas e depende, tanto da carga do biocatalisador, como da carga das espécies em solução. A partição pode levar a alterações de pH óptimo, para valores de pH mais alcalinos ou mais ácidos, consoante o suporte apresente carga negativa ou positiva e, como resultado a alterações na actividade enzimática. As interacções hidrofóbicas também influenciam a actividade enzimática no sentido em que um aumento da hidrofobicidade do suporte aumenta a partição de substratos hidrofóbicos, contudo este tipo de suportes são pouco compatíveis com enzimas hidrofílicas (Va, 2006). Segundo Laane (1987) as enzimas imobilizadas apresentam actividade catalítica óptima quando:

i) a diferença entre as polaridades do microambiente e do substrato é mínima, uma vez que deste modo asseguram-se elevadas concentrações de substrato no microambiente, sendo que para reacções em que ocorre inibição pelo substrato, esta diferença de polaridade deve ser optimizada;

ii) a diferença de polaridade entre o macroambiente e do substrato é elevada, o que força as moléculas de substrato a migrarem para o microambiente;

iii) a diferença de polaridade entre o macroambiente e o produto é mínima, de modo a permitir a sua saída do microambiente do biocatalisador, evitando deste modo, se for o caso, a inibição pelo produto e promovendo a deslocação do equilíbrio no sentido da produção;

iv) a diferença de polaridade entre o microambiente e o produto é máxima, pelas mesmas razões apresentadas anteriormente.

Os suportes hidrofílicos tendem a competir com a enzima pela água disponível

durante a reacção. Quando a lipase e o suporte estão completamente hidratados, os suportes hidrofílicos conduzem a uma elevada concentração no microambiente da enzima favorecendo a reacção hidrolítica. Podem também reduzir a disponibilidade dos substratos hidrofóbicos, em regiões hidrofílicas, reduzindo, deste modo, a disponibilidade dos substratos para a reacção nos centros activos do biocatalisador. Além disso, o suporte de imobilização também pode conduzir a impedimentos estereoquímicos, deixando a enzima menos acessível aos substratos (Gonçalves *et al.*, 1997; Vileneuve *et al.*, 2000).

Neste contexto, os estudos realizados em biocatálise em meio orgânico têm tido em conta os efeitos de partição, avaliados pelos coeficientes de partição dos substratos e produtos entre a fase orgânica e a fase aquosa (Ferreira-Dias 1995; Ferreira-Dias *et al.*, 1999; Pires-Cabral *et al.*, 2005b). Estes estudos são úteis de forma a investigar as interacções entre o suporte de imobilização, a enzima, e os componentes do meio reaccional. Pires-Cabral *et al.*, (2005a, 2005b, 2005c) verificou que a natureza hidrofílica do suporte condiciona os fenómenos de partição dos substratos, da água inicialmente presente no sistema reaccional e, dos produtos da reacção, favorecendo a migração dos compostos hidrofílicos do meio orgânico para o microambiente do biocatalisador e dos hidrofóbicos do microambiente para o meio reaccional. Também verificou que a hidroflicidade da espuma Hypol FHP 2002TM utilizada na imobilização da lipase de *Candida rugosa*, para a catálise das reacções de esterificação do etanol com o ácido butírico, conduz à presença de etanol em largo excesso no microambiente do biocatalisador, concluindo que nesta reacção o etanol funciona como inibidor.

Relativamente à água produzida no decorrer da reacção, esta pode acumular-se no microambiente do biocatalisador, reduzindo a actividade catalítica de esterificação e o grau de conversão em éster, bem como afectar a sua estabilidade operacional (Krishna e Karanth, 2002).

2.3.3 Efeitos de Transferência de Massa

A carga de enzima é um factor preponderante na actividade específica das preparações imobilizadas. Quando a enzima é imobilizada num suporte, os substratos vão difundir-se do seio da solução até ao centro activo da enzima. Assim, quando a velocidade do substrato é menor que a velocidade de transformação pela enzima, a velocidade da reacção catalítica observada é menor do que a esperada para uma dada

concentração de enzima em solução, uma vez que nem todas as moléculas de enzima estão em contacto com o substrato. Existem dois tipos de resistências difusionais: as externas e as internas, consoante os gradientes de concentração ocorram na superfície do biocatalisador, ou no interior do meio catalítico poroso. Assim, quanto maior for a velocidade de circulação do meio reaccional, menos espessa será a camada de fluido em torno das partículas de suporte (camada limite ou filme de Nernst) e, menores serão as limitações externas de transferência de massa (Adlercreutz, 1993; Barros, *et al.*, 1998; Bakker *et al.*, 2000; Krishna e Karanth, 2002; Salis *et al.*, 2008).

Cada suporte tem uma carga enzimática óptima à qual a actividade específica é máxima. Verifica-se que para cargas enzimáticas menores, a actividade catalítica também é menor, devido à inibição da enzima pelo suporte de imobilização, resultante de alterações conformacionais causadas pelo processo de imobilização e à inactivação causada pelo meio reaccional. Este efeito diminui com o aumento da carga enzimática. Por outro lado, quando a carga enzimática é alta, as limitações de transferência de massa não permitem que a enzima exerça a sua actividade a maior velocidade (Wehtje *et al.*, 1993; Barros *et al.*, 1998).

2.4 Bioreactores

Segundo Aires-Barros (2002), a selecção do reactor para um determinado bioprocessos depende das características da bioconversão e de constrangimentos reaccionais, cinéticos e do biocatalisador, que determinam o modo de operação e as características do fluxo.

Entre as características da bioconversão que influenciam a selecção do reactor, estão incluídas as propriedades dos substratos e dos produtos, ou seja, pontos de fusão/ebulição, solubilidade em água, estabilidade ao pH e temperatura, as características reaccionais, nomeadamente o pH, a temperatura, o controlo da actividade da água e as características do biocatalisador, ou seja, se é utilizado livre ou imobilizado, a sua estabilidade e a quantidade de água necessária para manter a sua actividade catalítica. A interacção entre o biocatalisador e os substratos é um factor também a ter em conta.

Relativamente aos constrangimentos reaccionais deve-se ter em conta o sistema biocatalítico, ou seja o tipo de mistura reaccional que se vai utilizar (mistura bifásica orgânico-aquosa, sistema micro-heterogéneo, sistema com teor vestigiário de água ou

mistura homogénea de meio aquoso e solvente orgânico miscível com água), a razão de fases aquosa-orgânica que condiciona a produtividade volumétrica no reactor e a área interfacial disponível para a transferência de massa de substratos e produtos, assim como os efeitos de partição substratos/produtos. A inibição pelos substratos ou produtos fazem parte dos constrangimentos cinéticos.

Os constrangimentos associados ao biocatalisador incluem a concentração máxima de biocatalisador permitida no bioreactor, a influência da agitação realizada e a baixa estabilidade do biocatalisador, devido a efeitos de temperatura, pH, presença de compostos tóxicos, necessidades de co-factores e toxicidade do solvente orgânico.

Entre os reactores usados em sistemas biocatalíticos, destacam-se os reactores descontínuos de mistura total e os reactores contínuos tubulares de leito fixo com escoamento tipo pistão como os mais utilizados.

2.5 Cinética da Reacção de Esterificação Catalisada por Lipases

A maior parte dos estudos cinéticos de reacções catalisadas enzimaticamente em meio orgânico é baseada na aplicação do modelo de Michæelis-Menten. Porém, este modelo é válido apenas para reacções simples. As reacções de esterificação catalisadas por lipases imobilizadas seguem, regra geral, o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi (Fig. 2.6) que consiste na adição ordenada de um primeiro substrato e a libertação de um produto, seguida de uma nova ligação ao segundo substrato e libertação de outro produto. Neste mecanismo de dois passos, a acilação, que constitui o primeiro passo, inicia-se com a ligação do ácido à enzima, com formação de um complexo não covalente ácido-enzima que prossegue com a libertação do primeiro produto, a água, e formação de um intermediário estável denominado acil-enzima. No segundo passo, a desacilação, o álcool liga-se ao intermediário anteriormente referido, formando um segundo complexo não covalente enzima-éster e finalmente ocorre a libertação do éster (Janssen *et al.*, 1996; Paiva *et al.*, 2000; Krishna e Karanth, 2002).

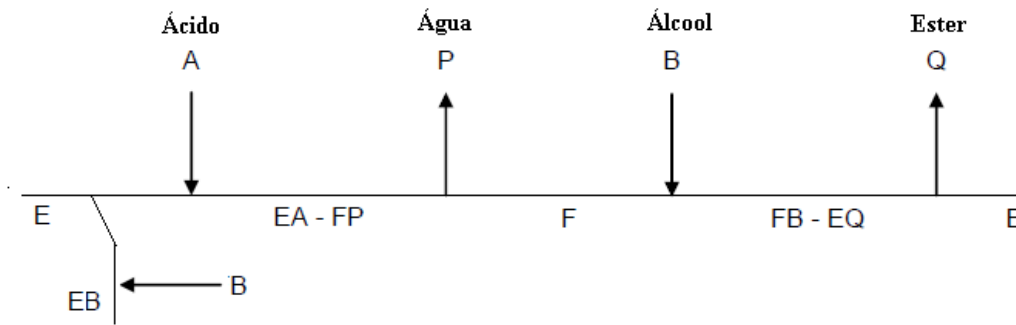


Figura 2.6 – Representação do mecanismo ping-pong. E e F são as diferentes configurações da enzima livre, EA-FP e FB-EQ representam os complexos de transição (Adaptado de Pires-cabral, 2005a).

Acima de determinadas concentrações, tanto o álcool como o ácido podem exercer um efeito inibitório sobre a reacção catalítica. Além disso, quando a água atinge um teor considerável, pode actuar como inibidor competitivo, quer relativamente ao álcool, quer ao ácido, introduzindo alterações no mecanismo reaccional e modificando o modelo, numa cinética de Ping-Pong com inibição competitiva pelo substrato e pela água (Mukherjee, 1990; Chulalaksananukul *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1991; Marty *et al.*, 1992; Dumont *et al.*, 1992; van Tol *et al.*, 1995a, 1995b; Janssen *et al.*, 1996; Bovara *et al.*, 1993b; Valivety *et al.*, 1993; Briand *et al.*, 1995; Dias *et al.*, 1990; Rizzi *et al.*, 1992; Halling, 1994; Pires-Cabral *et al.*, 2009).

2.6 Metodologia das Superfícies de Resposta (RSM)

Em qualquer processo industrial é extremamente importante melhorar o desempenho dos sistemas e aumentar o rendimento do processo sem aumentar os custos. O método utilizado para alcançar este propósito designa-se optimização. Um dos métodos mais usados e mais populares na optimização de processos é a Metodologia das Superfícies de Resposta (*Response Surface Methodology*, RSM). O número de estudos na área dos processos bioquímicos que utilizam este método é enorme (Gaucula and Singh, 1984; Ferreira-Dias *et al.*, 2003; Rodriguez-Nogales *et al.*, 2005; Shih *et al.*, 2007; Pires-Cabral *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c, 2007, 2009, 2010).

Esta metodologia, consiste num conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas, utilizadas na modelação e análise de problemas em que as respostas de interesse são influenciadas por várias variáveis explicativas em simultâneo. Este procedimento determina as condições operatórias óptimas para o sistema, sem respostas ambíguas,

com redução do número de experiências necessárias. Responde a questões específicas e evita repetir ensaios, o que se traduz em economia de tempo e dinheiro.

Através da metodologia das superfícies de resposta, obtêm-se equações polinomiais, em função das variáveis explicativas definidas como significativas para as respostas, que correspondem graficamente a superfícies, denominadas por Superfícies de Resposta (Montgomery, 1991).

Na RSM podemos usar quatro tipos de matrizes de delineamento experimental: factorial completa, factorial fraccionada, matriz central compósita (“*Central Composite Design*”, CCD) e matriz central compósita rotativa (“*Central Composite Rotatable Design*”, CCRD).

Como exemplo, apresenta-se no Quadro II.1 a matriz central compósita rotativa (CCRD) codificada para dois factores X_1 e X_2 .

Quadro II.1 - Matriz central compósita rotativa codificada para 2 factores X_1 e X_2

Ensaio	X_1	X_2	
1	-1	-1	Matriz factorial 2^k
2	1	-1	
3	-1	1	
4	1	1	
5	$-\alpha$	0	Pontos axiais $\alpha = \pm \sqrt{2}$
6	α	0	
7	0	$-\alpha$	
8	0	α	
9	0	0	Repetições do ponto central
10	0	0	
11	0	0	

A matriz CCRD é constituída por uma matriz factorial, por um conjunto de pontos estrela e um conjunto de repetições do ponto central. A matriz factorial com 2^k ensaios (k é o número de factores) corresponde aos pontos que vão definir a zona de interesse. São os vértices de um quadrado (quando $k=2$) cujo centro é a origem (0, 0), e os extremos inferior e superior são (-1, +1) (Montgomery, 1991) (Fig. 2.7). Os pontos exteriores à matriz factorial, mas dentro do domínio experimental, representados por ($-\alpha$, α), são os pontos axiais. São dois para cada variável e estão situados nos eixos de referência a uma distância de $2^{k/4}$ e permitem testar a aplicabilidade do modelo (Montgomery, 1991).

Várias repetições do ponto central (0, 0) situado na origem dos eixos, permite estimar o erro experimental, que se considera constante ao longo de todo o domínio experimental (Montgomery, 1991).

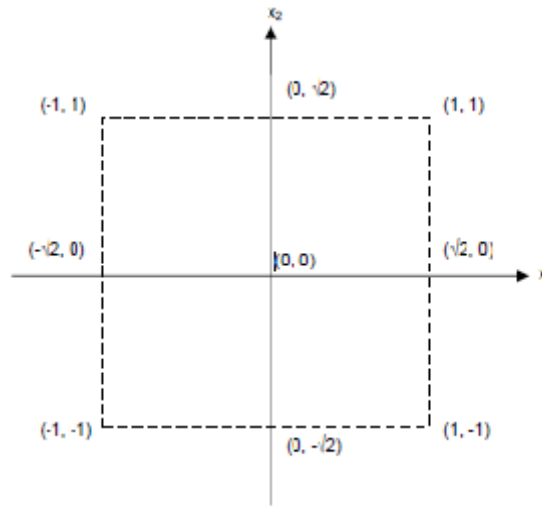


Figura 2.7 – Matriz central compósita rotativa para dois factores X_1 e X_2 .

Para a elaboração de um delineamento experimental eficaz, temos de fazer estudos preliminares, que nos permitam: (i) identificar as variáveis que actuam no processo; (ii) identificar correctamente a região de interesse no espaço em que o processo actua; (iii) definir os níveis em que os factores que influenciam o processo irão variar e (iv) determinar o ponto central.

As equações polinomiais que se obtêm através deste método, traduzem a resposta, Y , em função das variáveis explicativas, X_i , dando origem a uma superfície de resposta com $(m+1)$ dimensões, sendo m o número de variáveis X_i . A equação da Superfície de Resposta para duas variáveis é:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{12} X_1 X_2 \quad (\text{eq. 2.1})$$

Y - Variável dependente

X_1, X_2 - Variáveis independentes (factores)

b_0 - Constante

b_1, b_2 - Coeficientes lineares

b_{11}, b_{22} - Coeficientes quadráticos

b_{12} - Coeficiente linear da interacção $X_1 X_2$

É possível, recorrendo à equação da superfície de resposta, estimar o ponto óptimo da resposta o que equivale ao cálculo dos extremos da função polinomial, máximo ou mínimo, usando as suas respectivas derivadas parciais.

O ajuste do modelo aos resultados experimentais pode ser avaliado pelo coeficiente de determinação R^2 . R^2 varia entre 0 e 1, e quanto mais próximo estiver de 1, mais o modelo se ajusta aos dados experimentais. A partir de R^2 pode-se calcular o coeficiente de determinação ajustado, R^2_{ajust} , a partir da seguinte equação (Wiesberg, 1985):

$$R^2_{\text{ajust.}} = 1 - \left(\frac{n-1}{n-p} \right) (1 - R^2) \quad (\text{eq. 2.2})$$

n = número de observações

p = número de coeficientes da equação de regressão

O coeficiente R^2_{ajust} deve ser sempre apresentado em conjunto com o R^2 quando se avalia a aplicabilidade do modelo. O R^2_{ajust} também varia entre 0 e 1 e é sempre inferior a R^2 , mas quanto mais próximo estiver da unidade, mais o modelo se ajusta à realidade. Os valores preditos pelo modelo devem ser confrontados com os valores observados experimentalmente. Estes últimos podem ser expressos graficamente e a sua informação deve ser complementada com os valores de R^2 e R^2_{ajust} . O coeficiente R^2 , mostra-nos como a variabilidade nos valores da resposta observada, pode ser explicada pelos factores experimentais e as suas interacções. Contudo um grande valor de R^2 não implica necessariamente que o modelo seja um bom ajustamento, uma vez que a adição de uma variável aumenta sempre o valor deste coeficiente (a adição de uma variável ao modelo faz sempre com que a soma de quadrados da regressão aumente), sem ter em conta se a variável que se adiciona é, ou não, estatisticamente significativa. Assim, modelos com um elevado valor de R^2 podem produzir predições pouco fiáveis de novas observações ou estimativas pouco fiáveis do valor esperado de Y . Por este motivo R^2 não será um bom indicador do grau de ajustamento do modelo e, alguns investigadores preferem utilizar o coeficiente de determinação ajustado. Este coeficiente dá uma melhor ideia da proporção de variação de Y explicada pelo modelo de regressão uma vez que tem em conta o número de regressores. Ao contrário do que acontecia com o

coeficiente de determinação múltiplo, o R^2_{ajust} não aumenta sempre, quando uma nova variável é adicionada ao modelo. Este só aumenta se a adição da variável produz uma redução suficientemente grande na soma de quadrados do erro de maneira a que compense a perda de um grau de liberdade (resultante da adição da variável) (Haaland, 1989).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Biocatalisadores

Os biocatalisadores não comerciais utilizados foram a lipase de *Yarrowia lipolytica* (Ylip2) imobilizada em diferentes suportes: Lewatit VP OC 1065 (lip1); HPL (lip2); Amberlite 96 (lip3); Lewatit K 2629 (lip4); Lewatit VO OC 1026 (lip5) e Lewatit MP TP 214 (lip6), e a lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* (lip9) (lipase *r*-ROL). As lipases de *Y. lipolytica* imobilizadas foram preparadas e gentilmente cedidas pela Doutora Georgina Sandoval, CIATEJ, Guadalajara, México. A lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* foi produzida por uma estirpe mutante de *Pichia pastoris* numa cultura semi-contínua (fed-batch), usando sorbitol como co-substrato e metanol como indutor, pelo grupo do Prof. Francisco Valero, Universidade Autónoma de Barcelona, Espanha. Utilizaram-se também os seguintes biocatalisadores comerciais: lipases liofilizadas de *Aspergillus niger* (lip7) e *Rhizopus oryzae* (lip8) (lipase *n*-ROL) (lipase A 12 e lipase DF 15-K, respectivamente) cedidas pela Amano Enzyme Europe Ltd. (Fig. 3.1).

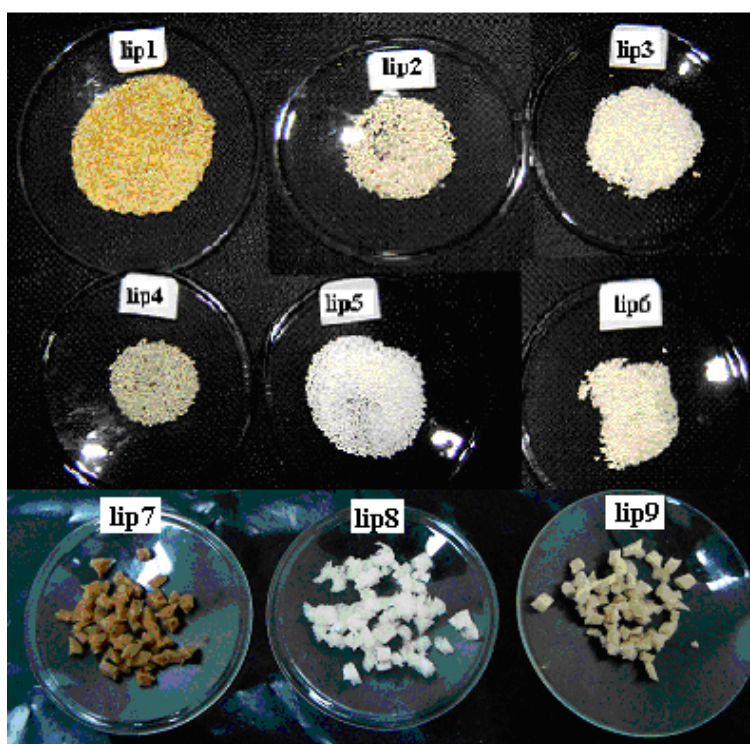


Figura 3.1 – Biocatalisadores testados nas reacções de esterificação de etanol com o ácido butírico.

3.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados de grau de pureza *pro analysis* foram obtidos das seguintes fontes comerciais: etanol da Merck, *n*-hexano e ácido butírico da Riedel-de-Häen, butirato de etilo da Fluka Chemica, 4-metil-2-pentanol (padrão interno) da Merck Schuchardt e HYDRANAL®- Coulomat AG-H da Riedel-de-Häen.

3.1.3 Matriz de Imobilização

O pré-polímero hidrofílico de poliuretano Hypol FHP 2002TM (diisocianato de tolueno), foi cedido pela Dow Chemical Company Limited U.K.

3.2 Métodos

3.2.1 Imobilização da Lipase

As lipases de *A. niger* e de *R. oryzae* comercial nativa (n-ROL) e r-ROL, foram imobilizadas em espuma de poliuretano Hypol FHP 2002TM, um pré-polímero de diisocianato de tolueno (TDI) com uma aquafilicidade de 3,2 (Reslow *et al.*, 1988, Pires-Cabral *et al.*, 2007).

A imobilização da lipase ocorre simultaneamente com a polimerização da espuma de poliuretano. Para a sua preparação, misturou-se 0,60 g de Hypol FHP 2002TM com igual massa de solução tampão fosfato (0,020 M KH₂PO₄ + 0,027 M Na₂HPO₄; pH 7,0) e 0,350 g de lipase (Ferreira-Dias *et al.*, 1999). A massa de lipase utilizada corresponde à carga máxima por forma a maximizar a velocidade da reacção de esterificação sem que ocorram consideráveis limitações internas à transferência de massa (Ferreira-Dias *et al.*, 1999).

Durante a polimerização, a água, proveniente da solução tampão, reage com os radicais livres do pré-polímero libertando dióxido de carbono e conferindo ao suporte de imobilização uma estrutura porosa. A porosidade da espuma de poliuretano Hypol FHP 2002TM estimada pela razão entre o volume de vazios e o volume aparente da espuma é de 0,635 (Ferreira-Dias *et al.*, 1999) e o volume real desta espuma (V_r em mL) pode ser estimado em função da massa de pré-polímero utilizada (M_{pp} em g) de acordo com a relação previamente estabelecida por Pires-Cabral *et al.* (2005a):

$$Vr = 2,617Mpp + 0,013 \quad (R^2 = 0,995) \quad (\text{eq. 3.1})$$

Após imobilização, as lipases preparadas foram cortadas em pequenos cubos de aproximadamente $0,03 \text{ cm}^3$ e imersas a 14 cm^3 de solução de substratos (etanol e ácido butírico) em *n*-hexano.

3.2.2 Reacções de Esterificação

As reacções de esterificação foram realizadas à temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação magnética a 1400 rpm, em reactores cilíndricos de vidro, munidos de camisa de aquecimento e devidamente tapados (Fig. 3.2). Os volumes de meio reaccional, 14 mL (soluções de etanol e ácido butírico em *n*-hexano) e a velocidade de agitação foram seleccionados de modo a que o biocatalisador se encontrasse totalmente imerso e disperso no meio reaccional em todos os pontos do reactor. As lipases imobilizadas foram testadas em reacções de esterificação de etanol com ácido butírico em *n*-hexano, realizadas nas condições estabelecidas em trabalhos anteriores com a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Hypol FHP 2002TM (Pires-Cabral *et al.*, 2005b, 2005c, 2007, 2009, 2010.). Assim, usaram-se as concentrações de 0,325 M de ácido butírico e 0,439 M de etanol, que corresponde à composição do ponto central do delineamento estatístico experimental central rotativo compósito, em função da concentração inicial de ácido butírico, A, da razão molar etanol/ácido butírico, RM e da temperatura, T (Pires-Cabral *et al.*, 2005b, 2005c, 2007, 2009, 2010).

As reacções de esterificação com os biocatalisadores lip1, lip2, lip3, lip4, lip5 e lip6 foram realizadas na presença de 3 % (m/v) e 12 % (m/v) de massa de biocatalisador em relação ao volume de meio reaccional. Relativamente aos biocatalisadores lip7, lip8 e lip 9, a quantidade utilizada foi de 12 % (m/v). Com estes biocatalisadores, utilizou-se também meio reaccional com a composição do ponto central.

A composição do meio reaccional foi analisada por cromatografia gasosa a amostras recolhidas às 0, 1, 3, 4,5, 6, 24 e 48 horas de reacção.

As velocidades iniciais de esterificação foram calculadas por regressão linear de 5 pontos a partir das relações entre concentração de butirato de etilo e tempo de reacção e expressas em μmol de butirato de etilo produzido por minuto e por grama de biocatalisador.

As produtividades volumétricas de cada biocatalisador foram calculadas pela razão entre a quantidade de butirato de etilo produzido, por unidade de volume e por unidade de tempo de reacção e expressas em $\mu\text{mol/mL.h}$.



Figura 3.2 – Reactor descontínuo utilizado para as reacções de esterificação do etanol com o ácido butírico.

3.2.3 Análise da Composição do Meio Reaccional por Cromatografia Gasosa

A alíquotas de 500 μL de meio reaccional, adicionaram-se iguais volumes de uma solução de 0,4 M de padrão interno (4-metil-2-pentanol) em *n*-hexano. A determinação das concentrações de substratos residuais e de éster produzido realizou-se num cromatógrafo gasoso (Hewlett Packard HP5890 série II), equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna capilar (DB WAX) (30 m x 0,25 mm i.d., d.f. = 0,25 μm). As temperaturas do injector e do detector foram reguladas para 250 °C e 270 °C respectivamente. A programação de temperatura do forno foi: 60 °C durante 6 min, seguido de um aumento de 30 °C/min e, por fim, um patamar de 3 min a 180 °C. Como gás de arraste foi utilizado o hélio, à pressão de 60 kPa na coluna e um fluxo de 2,6 mL/min.

A análise quantitativa foi realizada pelo método do padrão interno. Este método permite a normalização dos resultados obtidos, ou seja, permite eliminar potenciais variações no volume das amostras. Nos cromatogramas obtidos, a área de cada pico é directamente proporcional à quantidade de composto que passa pelo detector e o quociente entre as áreas dos picos do composto e do padrão interno é directamente proporcional ao quociente de concentrações respectivo. Deste modo, preparando-se várias soluções com diferentes concentrações de composto e igual concentração de padrão

interno obtêm-se as curvas de calibração.

O traçado das curvas de calibração a utilizar na análise quantitativa dos resultados foi realizado preparando, em *n*-hexano, várias soluções padrão com concentração constante de padrão interno (0,4 M) e concentrações crescentes (0,005 M a 0,1 M) de ácido butírico, etanol e butirato de etilo, representativas das condições experimentais esperadas nos estudos a realizar.

3.2.4 Determinação do Teor de Água do Meio Reaccional

O teor de água do meio reaccional foi determinado utilizando um coulômetro de Karl Fischer (Metrohm 684). As amostras de 1 mL de meio foram recolhidas às 0, 1, 5, 24 e 48 horas de reacção, com o auxílio de uma seringa de cromatografia de igual capacidade, previamente lavada com acetona e seca, e imediatamente injectadas no coulômetro.

3.2.5 Delineamento Experimental para Modelação da Produção de Butirato de Etilo

A Metodologia das Superfícies de Resposta (Gacula and Singh, 1984; Haaland, 1989; Montgomery, 1991) foi utilizada para modelar e otimizar a esterificação do etanol com o ácido butírico (Pires-Cabral *et al.*, 2007), catalisada pela lipase nativa de *Rhizopus oryzae* (lip8) imobilizada em poliuretano.

Para modelar a produção de butirato de etilo e otimizar as condições reaccionais foram realizados 17 ensaios experimentais, de acordo com o delineamento estatístico central rotativo compósito (CCRD) em função de três factores: a concentração inicial de ácido butírico, A, a razão molar etanol/ácido butírico, RM, e a temperatura, T.

Os níveis do CCRD considerados apresentam-se no Quadro III.1, a que correspondem as concentrações para os vários ensaios experimentais presentes no Quadro III.2. Neste caso, o CCRD é composto por 8 pontos factoriais, codificados como +1 e -1, 6 pontos estrela codificados como $+\alpha$ e $-\alpha$ e 3 pontos centrais codificados como 0.

Quadro III.1 - Níveis codificados e descodificados dos factores experimentais testados nos ensaios de esterificação segundo uma matriz CCR.

Níveis codificados	A (M)	RM	T (°C)
(-1)	0,150	0,700	25,0
(+1)	0,500	2,000	35,0
(- α)	0,031	0,257	21,6
(+ α)	0,619	2,443	38,4
0	0,325	1,350	30,0

Quadro III.2 - Matriz de delineamento experimental (CCDR) em função da temperatura (T), da concentração inicial de ácido butírico (A), e da razão molar etanol/ácido butírico (RM).

Nº Ensaio	A (M)	RM	T (°C)
1	0,150	0,700	25
2	0,150	2,000	25
3	0,500	0,700	25
4	0,500	2,000	25
5	0,150	0,700	35
6	0,150	2,000	35
7	0,500	0,700	35
8	0,500	2,000	35
9	0,325	1,350	21,59
10	0,325	1,350	38,41
11	0,031	1,350	30
12	0,619	1,350	30
13	0,325	0,257	30
14	0,325	2,443	30
15	0,325	1,350	30
16	0,325	1,350	30
17	0,325	1,350	30

3.2.6 Estimativa das Concentrações no Microambiente do Biocatalisador

Para cada ensaio de esterificação do CCRD (cf. 3.2.5), foram estimadas as concentrações de substrato no microambiente do biocatalisador utilizado (lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em Hypol FHP 2002TM) (n-rol), usando as equações polinomiais do modelo de 2ª ordem previamente estabelecidas para um sistema semelhante de uma lipase de *Candida rugosa* imobilizada nas mesmas espumas de poliuretano (Pires-Cabral *et al.*, 2005).

3.2.7 Tratamento Estatístico dos Resultados Experimentais

Os valores de concentração de butirato de etilo produzido (ESTER) e da respectiva conversão (CONV) determinados para todos os ensaios experimentais, foram analisados usando o *software* StatisticaTM, versão 5, da Statsoft, USA. A conversão em butirato de etilo foi definida como a razão entre a concentração do butirato de etilo e a concentração inicial do substrato limitante no meio reaccional.

Foram calculados os efeitos linear e quadrático dos factores A, RM e T, assim como das interacções lineares A x RM, A x T e RM x T sobre a concentração de butirato de etilo produzido (ESTER) e a conversão em éster (CONV). A significância dos seus valores foi avaliada por análise de variância (ANOVA). Interpretando as probabilidades de significância ou valores de *p*.

Foram ajustadas superfícies a quatro dimensões, descritas por equações polinomiais de 1ª ou 2ª ordem, aos valores de concentração de butirato de etilo e de conversão em éster. Os coeficientes de 1ª e 2ª ordem foram obtidos por análise de variância.

O ajuste dos modelos foi avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2) e pelo coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajust}) (Weisberg, 1985).

3.2.8 Validação dos Modelos de Esterificação

A validação dos modelos estabelecidos pela RSM para descrever a produção e a conversão em butirato de etilo foi realizada através de ensaios experimentais de esterificação nas condições previstas pelo modelo que maximizam a produção de butirato

de etilo (ESTER) e a conversão em butirato de etilo (CONV). Assim, as reacções decorreram nas condições operacionais previamente referidas (cf. 3.2.2) sendo 0,225 M de A; 1,637 de RM a 31,5 °C para validação de ESTER e 0,270 M de A; 1,687 de RM a 18,9 °C para validação de CONV. Foram recolhidas amostras de meio reaccional após 0, 1, 6, 18, 24 e 48 horas de reacção e a concentração dos diferentes substratos e do éster sintetizado foram determinadas por cromatografia gasosa, tal como descrito anteriormente (cf. 3.2.3). Os resultados obtidos foram comparados com os valores teóricos preditos pelo modelo.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Calibração do Cromatógrafo Gasoso

Para a calibração do cromatógrafo gasoso, uma vez que a gama de concentrações utilizada era vasta, foi necessário realizar duas curvas de calibração de modo a obter equações com o melhor ajuste aos resultados experimentais. Assim, a primeira parte do trabalho experimental realizado consistiu na obtenção de curvas de calibração a partir de soluções para as gamas de concentração de 0,01 a 0,06M e 0,1 M a 1,0M. As equações das curvas de calibração e respectivos coeficientes de determinação (R^2) estão apresentados no quadro IV.1.

Quadro IV.1- Equações das curvas de calibração das razões das áreas entre etanol (AEtOH), ácido butírico (A) e Butirato de etilo (ESTER) e a área do padrão interno (Apint) em função da concentração de butirato de etilo (ESTER), obtidas com as soluções de calibração, para as gamas de concentração de 0,01 a 0,06M e 0,1 a 1,0M de EtOH, A e ESTER e respectivos coeficientes de determinação R^2 .

Composto	Modelo	Concentração (M)	R^2
Etanol (EtOH)	$AEtOH/A_{pint} = 0,8178(ESTER)+0,004$	(0,01; 0,06)	0,9755
	$AEtOH/A_{pint} = 1,3257(ESTER)-0,01$	(0,1; 1,0)	0,9862
Ácido Butírico (A)	$AA/A_{pint} = 2,386(A)-0,0117$	(0,01; 0,06)	0,9863
	$AA/A_{pint} = 2,64(A)-0,0459$	(0,1; 1,0)	0,9974
Butirato de Etilo (ESTER)	$AESTER/A_{pint} = 4,2685(ESTER)+0,0012$	(0,01; 0,06)	0,9997
	$AESTER/A_{pint} = 4,2987(ESTER)-0,0157$	(0,1; 1,0)	0,9991

4.2 Selecção de Lipases

O *screening* das enzimas é fundamental para a selecção do biocatalizador que melhor se adapte às condições reaccionais pretendidas. Deste modo, foi realizado um *screening* de um conjunto de biocatalisadores disponíveis, comerciais e não comerciais.

As preparações imobilizadas de *Yarrowia lipolytica* (lip3, lip4, lip5 e lip6) foram testadas em duas quantidades diferentes 3 % (m/v) e 12 % (m/v).

A título de exemplo apresentam-se os resultados de esterificação catalisada pelo biocatalizador lip 4, nas concentrações de 3 % (m/v) e 12 % (m/v), encontram-se na Fig. 4.1.

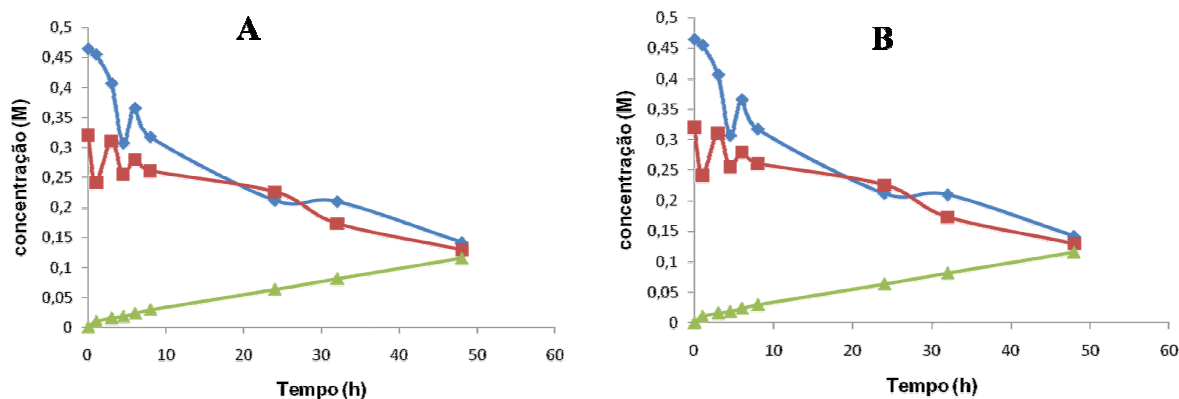


Figura 4.1 - Curvas cinética de produção de ESTER (▲) por esterificação de EtOH (◆) com A (■), catalisada pelo biocatalisador lip3 a 3% (m/v) (A) e a 12% (m/v) (B). (T=30 °C, A=0,325M; RM=1,35).

Da análise da Fig. 4.1, verifica-se que os resultados obtidos são muito semelhantes, não se observando aumento considerável na produção de éster quando se quadruplicou a concentração de biocatalisador. Deste modo, optou-se por realizar as reacções de esterificação com 3% (m/v) de biocatalisador, continuando deste modo a ser legítima a comparação com os restantes biocatalisadores utilizados (12% (m/v)).

As concentrações e percentagens de conversão em butirato de etilo estimadas ao longo da reacção de esterificação, catalisada pelas lip1, lip3, lip4, lip7, lip8 e lip9 em reactores descontínuos, utilizando as condições previamente estabelecidas para o ponto central do delineamento estatístico experimental (cf. 3.2.5) estão representadas nas Figuras 4.2 e 4.3, respectivamente. Quanto se utilizaram as lip2 e lip6 não se detectou produção de butirato de etilo, apesar da concentração de etanol e ácido butírico diminuírem no meio reaccional, ao longo de 24 horas de operação. Tal indica que a lipase de *Yarrowia lipolytica* imobilizada nos suportes HPL e Lewatit MP TP 214, respectivamente não apresenta actividade nestas condições, sugerindo que o tipo de suporte e as interacções que se estabelecem com as lipases condicionam a sua actividade catalítica.

O biocatalisador lip5 degradou-se assim que se iniciou a reacção de esterificação. O suporte de imobilização Lewatit VO OC 1026, no qual se encontrava imobilizada a lipase de *Yarrowia lipolytica*, perdeu integridade na presença do meio reaccional. A temperatura, a presença de solvente e/ou velocidade de agitação são factores que podem ser apontados como responsáveis pela degradação observada.

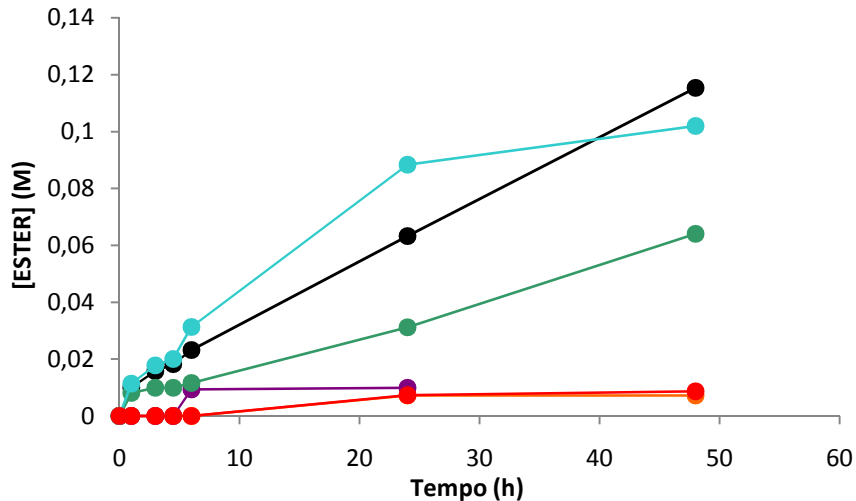


Figura 4.2 - Produção de butirato de etilo (ESTER) ao longo da reacção de esterificação ($T=30^{\circ}\text{C}$, $A=0,325\text{M}$; $\text{RM}=1,35$), em reactor descontínuo, utilizando os biocatalisadores lip1(●), lip 3(●), lip4(●), lip7(●), lip8(●), lip9(●).

A produção de butirato de etilo atingiu um valor máximo de 0,01 M às 6h quando a reacção foi catalisada pelos biocatalisadores lip3, lip9 e, e às 24 h quando se utilizou o lip1, respectivamente. Após este período, o equilíbrio manteve-se sem alteração na concentração de butirato de etilo. Na presença de lip4, lip7 e lip8 a concentração máxima de butirato de etilo obtida é consideravelmente mais elevada, sendo os valores registados às 48h de reacção 0,115 M, 0,064 M e 0,102 M, respectivamente. As reacções foram interrompidas às 48 horas, apesar de não se ter atingido o equilíbrio da reacção (Fig. 4.2).

Após 48h de reacção, foram estimadas as conversões em butirato de butilo. Relativamente aos biocatalisadores contendo lipase de *Yarrowia lipolytica*, o melhor resultado foi obtido com o biocatalisador lip4, com cerca de 34 % de conversão em éster. Na presença de lip1 e lip3 as conversões obtidas foram menores que 3 %.

No que diz respeito às lipases imobilizadas em espumas de poliuretano, os valores de conversão em butirato de etilo obtidos às 48h de reacção foram, 21 %, 32 % e 3 % com a lip7, lip8 e lip9 respectivamente (Fig. 4.3).

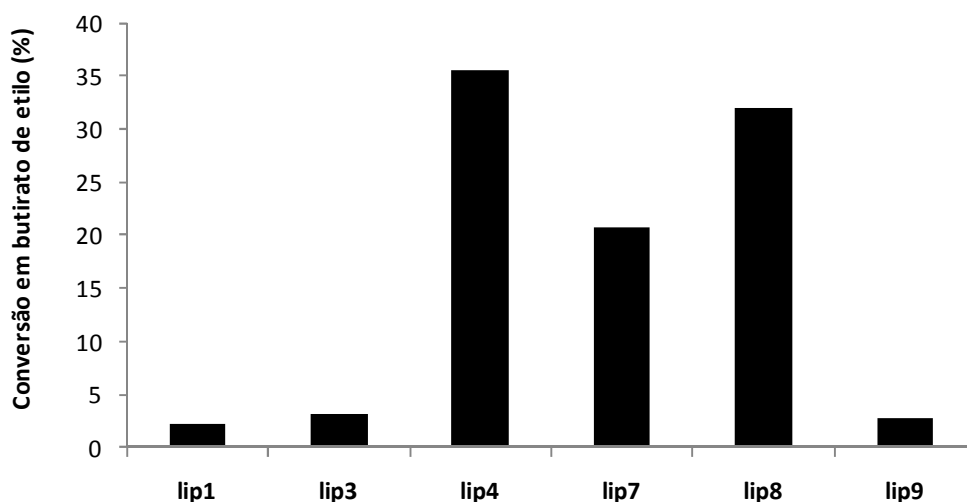


Figura 4.3 - Conversão em butirato de etilo (%) obtida após 48h de reacção de esterificação catalisada pelos biocatalisadores lip1, lip 3, lip4, lip7, lip8, lip9.

Durante as reacções de esterificação conduzidas em reactores descontínuos, a água produzida é sujeita a fenómenos de partição entre o suporte enzimático e o solvente. A elevada hidrofobicidade do solvente *n*-hexano tem como efeito a adsorção e acumulação da água no microambiente do biocatalisador que pode conduzir a uma diminuição da conversão em éster. À medida que a reacção progride, a água produzida continua a acumular-se no microambiente do biocatalisador até à sua saturação. A elevadas concentrações de água no microambiente, o limite de solubilidade da água poderá ser excedido com formação de uma fase aquosa distinta (Pires-Cabral *et al.*, 2005c). A água posteriormente produzida durante a reacção pode integrar a fase aquosa constituída ou migrar para o solvente aumentando a polaridade do meio reaccional, tendo como efeito uma diminuição da conversão em éster, uma vez que a afinidade dos substratos para com o meio reaccional aumenta.

A Figura 4.4 mostra o perfil do teor em água no meio reaccional durante as reacções de esterificação catalisadas pelos biocatalisadores testados. Verificou-se em todos os casos um aumento do teor em água no meio reaccional na primeira hora de reacção. Durante as horas seguintes a concentração de água permaneceu praticamente constante, à excepção da reacção na presença do biocatalisadore lip3, onde se verificou um aumento do teor da água até às 24 horas de reacção. A concentração em água no meio reaccional não corresponde à concentração de éster obtida para cada caso. Nos sistemas onde se utilizaram os biocatalisadores lip1 e lip3 a concentração de água no meio

reaccional às 48 h (0,043 M e 0,060 M, respectivamente) é superior à de butirato de etilo observada: 0,0072 M e 0,01 M. Tal facto, leva a supor que no decorrer da reacção ocorra desactivação da enzima, resultando na perda de capacidade de retenção da água pelo suporte de imobilização. Quando se utilizaram os restantes biocatalisadores (lip4, lip7, lip8 e lip9), a concentração em água é inferior à concentração de éster, o que significa que parte da água produzida pela reacção de esterificação deve acumular-se na matriz de imobilização. Nos biocatalisadores lip7, lip8 e lip9, a natureza hidrofílica do suporte de imobilização e o tipo de ligação que estabelecem com a enzima aprisionada, condicionam os fenómenos de partição da água e justificam o comportamento observado (Pires-Cabral *et al.*, 2005b).

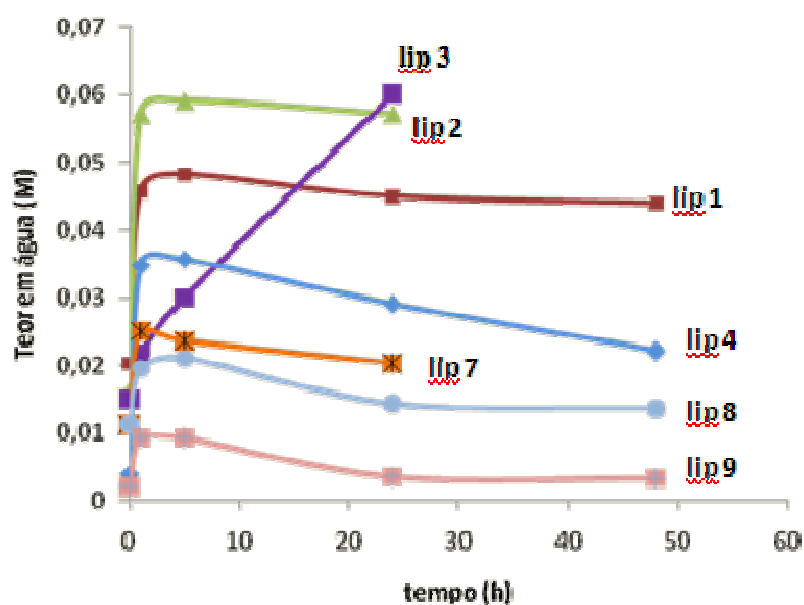


Figura 4.5 - Teor em água no meio reaccional nas reacções de esterificação do etanol com o ácido butírico catalisadas pelos biocatalisadores lip1, lip2, lip3, lip4, lip7, lip8 e lip9.

Os biocatalisadores que apresentaram maiores velocidades iniciais de esterificação e produtividade volumétrica em butirato de etilo foram os lip4, lip7 e lip8 (Quadro IV.2).

Quadro IV.2 - Velocidades iniciais de esterificação e produtividades volumétricas obtidas para os biocatalisadores lip1, lip3, lip4, lip7, lip8 e lip9.

Biocatalisador	Velocidade inicial ($\mu\text{mol}/\text{min g}$ biocatalisador)	Produtividade ($\mu\text{mol}/\text{mL.h}$)
<i>Y. lipolitica</i> (lip1)	0,003	0,29
<i>Y. lipolitica</i> (lip3)	0,21	0,42
<i>Y. lipolitica</i> (lip4)	83,3	2,40
<i>A. niger</i> (lip7)	31,8	1,33
n-ROL (lip8)	148	2,12
r-ROL (lip9)	2,78	0,18

Neste sistema, a r-ROL revelou menor a actividade catalítica do que a sua forma nativa. Assim, entre os biocatalisadores utilizados na esterificação do etanol com o ácido butírico em *n*-hexano, seleccionou-se a lipase nativa de *Rhizopus oryzae* imobilizada em poliuretano (lip8) para realização dos estudos posteriores, porque apresentou valores elevados de produtividade volumétrica (2,12 $\mu\text{mol}/\text{mL.h}$), velocidade inicial de esterificação (148 $\mu\text{mol}/\text{min g}$ biocatalisador), concentração (0,1 M) e conversão (31,9 %) em butirato de etilo.

4.3 Modelação e Optimização da Produção de Butirato de Etilo

Procedeu-se à modelação e optimização das condições reaccionais (A, RM e T) relativas à produção de butirato de etilo catalisada pela lipase nativa de *R. oryzae* imobilizada em espuma de poliuretano Hypol FHP 2002TM (lip8). Os ensaios foram realizados segundo uma matriz CCR (cf. 3.2.5), tendo como factores a temperatura, T (21,6 °C - 38,4 °C), a concentração inicial de ácido butírico, A (0,031 M - 0,619 M) e a razão molar etanol/ácido butírico, RM (0,257 - 2,443). Os resultados obtidos após 48h de reacção de esterificação foram tratados utilizando o modelo das superfícies de resposta RSM (Quadro IV.3).

Quadro IV.3 - Matriz do delineamento experimental (CCRD), em função da temperatura (T), da concentração inicial de ácido butírico (A) e da razão molar etanol/ácido butírico (RM) e resultados experimentais: concentração de butirato de etilo (ESTER), percentagem de conversão em butirato de etilo (CONV), e concentrações (*C_{micro}*) de etanol (EtOH) e ácido butírico (A) no microambiente do biocatalisador, após 48h de reacção de esterificação catalisada pela lipase nativa de *R. oryzae* imobilizada em poliuretano.

Nº Ensaio	T (°C)	A (M)	RM	ESTER (M)	CONV (%)	<i>C_{micro}</i> (M)	
						EtOH	A
1	25	0,150	0,700	0,031	30,6	0,2475	0,4733
2	25	0,150	2,000	0,112	73,6	0,8148	0,6165
3	25	0,500	0,700	0,136	36,8	0,8247	1,1022
4	25	0,500	2,000	0,010	1,9	3,0195	1,2455
5	35	0,150	0,700	0,080	72,3	0,2475	0,4733
6	35	0,150	2,000	0,115	75,5	0,8148	0,6165
7	35	0,500	0,700	0,026	8,0	0,8247	1,1022
8	35	0,500	2,000	0,009	1,8	3,0195	1,2455
9	21,59	0,325	1,350	0,164	50,1	1,3720	0,7730
10	38,41	0,325	1,350	0,016	4,8	1,3720	0,7730
11	30	0,031	1,350	0,013	40,1	n.a.	1,4964
12	30	0,619	1,350	0,009	1,4	2,3042	1,4964
13	30	0,325	0,257	0,071	78,4	0,0354	0,7013
14	30	0,325	2,443	0,008	2,5	2,3587	0,9422
15	30	0,325	1,350	0,097	31,9	1,3720	0,7730
16	30	0,325	1,350	0,095	29,1	1,3720	0,7730
17	30	0,325	1,350	0,097	29,7	1,3720	0,7730

n.a. – não aplicável

Na modelação e optimização da produção e conversão em butirato de etilo, a composição e condições iniciais do meio reaccional, efeitos lineares e quadráticos de T, A e RM, e as respectivas interacções lineares foram calculados (Quadro IV.4). Valores positivos destes efeitos sobre a produção e conversão em butirato de etilo indicam que, um aumento naquele factor implica um aumento na resposta. Valores negativos indicam que um aumento no factor é acompanhado de uma diminuição da resposta.

Os resultados experimentais obtidos para a produção e conversão em éster no sistema reaccional utilizado podem ser ajustados a equações polinomiais de 2ª ordem (Quadro IV.5) que descrevem superfícies de resposta a 4 dimensões, em função das 3 variáveis consideradas. Uma vez que não é possível a representação de superfícies de 4 dimensões, tem que se representar duas superfícies que correspondem respectivamente à resposta obtida (concentração em éster e conversão em éster) em função de 2 variáveis, mantendo a terceira variável constante e igual ao valor do ponto central. Nas figuras 4.6 e 4.7, estão representadas, para cada resposta, as superfícies de resposta em função da temperatura e da concentração inicial de ácido butírico e também em função da concentração inicial de ácido butírico e da razão molar etanol/ácido butírico.

Nas equações dos modelos, os efeitos cujo valor $p < 0,05$ e todos aqueles que não tinham probabilidade suficientemente baixa para serem desprezados, foram incluídos nas equações dos modelos (Haaland, 1989). Apesar de estes últimos efeitos terem uma probabilidade baixa, não é o suficiente para serem desprezados. Os valores de R^2 não são muito elevados, principalmente para a conversão em éster, mas avaliando-os conjuntamente com os valores de R^2_{ajust} , constituem uma boa aproximação dos resultados experimentais (Quadro IV.5). As superfícies de resposta ajustadas à concentração de éster (ESTER) apresentam em ambos os casos uma curvatura convexa, com um máximo no domínio experimental (Figs. 4.6 A, 4.6.B, Quadro IV.5). Relativamente às superfícies ajustadas à conversão em éster (CONV), o perfil modifica-se apresentando-se segundo uma superfície com uma curvatura ligeiramente convexa (Fig. 4.7 A, Quadro IV.5) e uma superfície côncava (Fig. 4.7 B, Quadro IV.5).

No que diz respeito à produção de éster, verificou-se que o factor T a nível linear e os factores A e RM a ambos os níveis e interacções lineares TxA e AxRM, têm efeitos negativos neste parâmetro. Relativamente à conversão em éster, os efeitos dos vários factores e respectivas interacções são consideráveis, nomeadamente o efeito da concentração de ácido butírico, verificando-se uma diminuição da conversão com o aumento dos três factores a nível linear e das interacções TxA e AxRM, e, um aumento

da conversão em éster com o RM a nível quadrático (Quadro IV.5, Figs. 4.6 e 4.7).

Por diferenciação parcial das equações polimoniais estabelecidas para a produção e conversão em butirato de etilo (Quadro IV.5), determinou-se a temperatura, a concentração inicial de ácido butírico e a razão molar inicial etanol/ácido butírico que conduzia à concentração máxima de butirato de etilo e à conversão máxima em butirato de etilo, previstas pelo modelo. Calculou-se também a $C_{micro_{EtOH}}$, C_{micro_A} e a produtividade molar para ambos as respostas (Quadro IV.6).

Quadro IV.4 - Efeitos da temperatura (T), da concentração inicial de ácido butírico (A), da razão molar etanol/ácido butírico (RM) e das interações (TxA), (TxRM) e (AxRM) sobre a concentração e conversão em butirato de etilo. Os níveis-*p* correspondentes estão entre parênteses.

Factor	ESTER (M)	CONV (%)
T (Termo linear)	-0,0521 (0,071369)	-6,62698(0,67344)
T (Termo quadrático)	0,003142 (0,895555)	0,572523 (0,968917)
A (Termo linear)	-0,02442 (0,310556)	-37,1632 (0,030279)
A (Termo quadrático)	-0,04848 (0,075387)	-4,02224 (0,786255)
RM (Termo linear)	-0,03174 (0,177212)	-19,5225 (0,176718)
RM (Termo quadrático)	-0,02822 (0,263255)	9,914765 (0,509035)
T x A	-0,04871 (0,209274)	-22,173 (0,33968)
T x RM	0,050542(0,173233)	10,76274 (0,615382)
A x RM	-0,06261(0,06151)	-19,1343 (0,305127)

Quadro IV.5 - Equações do modelo de superfície de resposta ajustado à produção de butirato de etilo (ESTER) e à conversão em butirato de etilo (CONV), após 48h de reacção de esterificação, catalisada pela lip8, como função da temperatura (T), concentração inicial de ácido butírico (A) e da razão molar etanol/ácido butírico (RM) e respectivos R^2 e R^2_{ajust} .

Equações do Modelo	R^2	R^2_{ajust}
ESTER = $0,0786 - 0,0064T + 1,681A - 0,8096A^2 - 0,0745RM - 0,0347RM^2 - 0,0284 T*A + 0,0078 T*RM - 0,2752 A*RM$	0,802	0,604
ROL comercial imobilizada em Hypol FHP 2002TM		
CONV = $-38,756 + 3,371T + 397,575A - 16,809RM + 12,660RM^2 - 12,474 T*A - 95,934 A*RM$	0,684	0,494

Quadro IV. 6 - Condições estimadas por ajuste dos modelos aos resultados experimentais, que maximizam a produção (ESTER) e conversão (CONV) em butirato de etilo e respectivos máximos, bem como as concentrações no microambiente do biocatalisador e as produtividades volumétricas.

	ESTER	CONV
Temperatura (°C)	31,5	18,9
(Etanol)_{inicial} (M)	0,368	0,455
(Ácido butírico)_{inicial} (M)	0,225	0,270
Razão Molar_(EtOH/A)	1,637	1,687
(Butirato de etilo)_{max} (M)	0,106	0,088
Conversão_{max} (%)	47,1	32,6
<i>C</i>_{micro_{EtOH}} (M)	1,920	1,420
<i>C</i>_{micro_A} (M)	0,644	0,732
Produtividade volumétrica (μmol/mL.h)	2,21	1,83

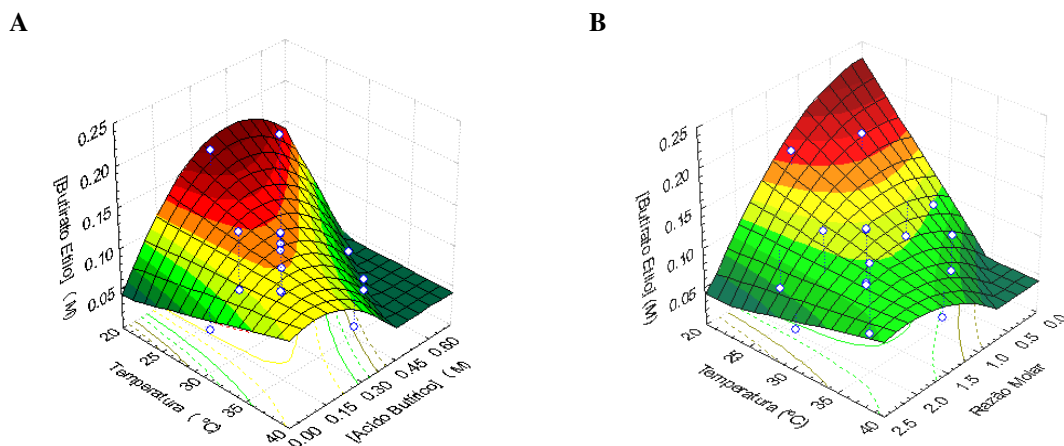


Figura 4.6 – Superfícies de resposta ajustadas à concentração de butirato de etilo no meio orgânico após 48h de reacção de esterificação, catalisada pela lipase *n*-ROL de immobilizada em espuma de poliuretano Hypol FHP 2002™, como função da temperatura e da concentração inicial de ácido butírico (A) e como função da temperatura e razão molar etanol/ácido butírico (B).

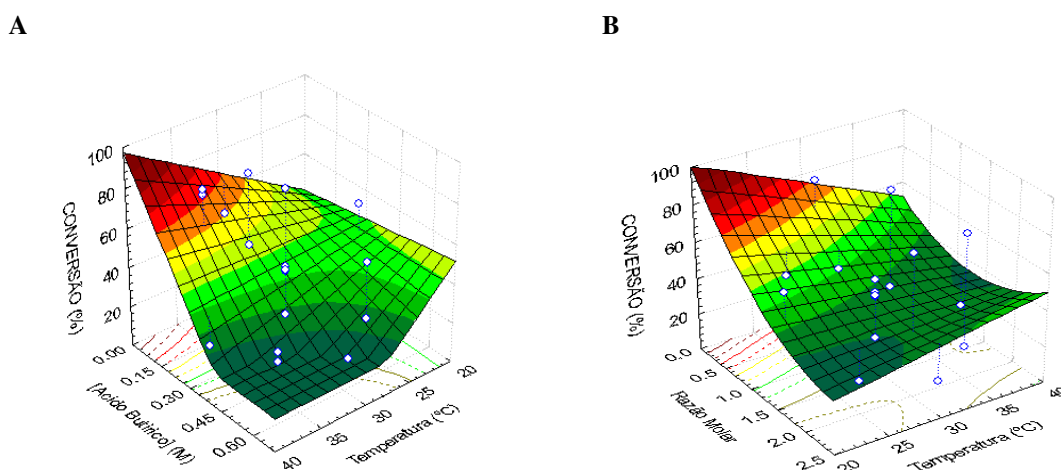


Figura 4.7 – Superfícies de resposta ajustadas à percentagem de conversão em butirato de etilo no meio orgânico após 48h de reacção de esterificação, catalisada pela lipase *n*-ROL immobilizada em espuma de poliuretano Hypol FHP 2002™, como função concentração inicial de ácido butírico e da temperatura (A) e como função da razão molar etanol/ácido butírico e da temperatura (B).

As equações dos modelos das superfícies de resposta ajustados às concentrações de etanol e de ácido butírico no microambiente, obtidas por Pires-Cabral, *et al.* (2005b), foram utilizadas para o cálculo das concentrações dos substratos no microambiente do biocatalisador no trabalho aqui apresentado (Quadro IV.2), uma vez que em ambos os casos se trata da mesma reacção de esterificação, catalisada por lipases de origem

diferente mas, imobilizadas na mesma espuma de poliuretano, com a qual se supõe ocorrerem interações semelhantes.

Relativamente aos valores obtidos para as concentrações de etanol e de ácido butírico no microambiente do catalisador demonstram que os modelos utilizados são robustos, uma vez que podem ser utilizados para estimar os valores da concentração dos substratos no microambiente de outros biocatalisadores com a mesma fiabilidade. Os resultados apenas mostram que os modelos em questão não se aplicam ao ensaio realizado a baixas concentrações de substratos ($A = 0,031 \text{ M}$ e $\text{EtOH} = 0,042 \text{ M}$), correspondente ao ponto 11 do delineamento experimental. Com efeito, estes modelos tinham sido ajustados numa gama de concentrações iniciais de ácido butírico e de etanol compreendidas entre $0,078 \text{ M}$ a $0,572 \text{ M}$ e $0,105 \text{ M}$ a $1,0 \text{ M}$, respectivamente (Pires-Cabral, *et al.*, 2005b), pelo que as concentrações iniciais de ácido e de etanol previstas nos ensaios 12 e 11 ou 13 do CCRD definido (cf. 3.2.5) encontram-se fora do alcance do modelo. Para todas as situações experimentais testadas as concentrações de substratos no microambiente são tanto maiores quanto maiores forem as concentrações iniciais de ácido butírico, A , e as razões molares, RM , o que indica que elevadas concentrações iniciais de ácido butírico, juntamente com o largo excesso de etanol, promove a migração dos substratos para o microambiente. A única excepção a esta observação resume-se à concentração de etanol no microambiente, calculada para o ensaio 13 do delineamento experimental.

A presença de elevadas concentrações de substratos no microambiente, nomeadamente de etanol, patente nos ensaios 4, 8, 12 e 14 do delineamento experimental (Quadro IV.3) conduziu a baixos valores de produção e conversão em éster, sugerindo que este substrato tem um efeito inibitório sobre a actividade da lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em espuma de poliuretano. Com efeito, Pires-Cabral *et al.* (2005b, 2007 e 2010) referem perda de actividade do biocatalisador na presença de elevadas concentrações de etanol no microambiente, a qual segundo os autores, pode estar associada ao efeito de desidratação das moléculas de proteína, ou à modificação do estado de protonação das espécies básicas e ácidas no microambiente.

De acordo com Pires-Cabral *et al.*, (2010) a lipase de *Candida rugosa* imobilizada na espuma de poliuretano, apresenta actividade de esterificação máxima quando a concentração de etanol no microambiente é $0,324 \text{ M}$, verificando-se efeitos inibitórios para valores superiores. A lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada na mesma matriz apresenta uma maior tolerância à presença de etanol, verificando-se conversões

em éster de aproximadamente 30% para $C_{microEtOH}$ de 1,4 M.

O aumento considerável da temperatura parece potenciar o efeito das elevadas concentrações no microambiente, conduzindo a baixos valores de produção e conversão em butirato de etilo. Contudo, a baixas concentrações de substratos o aumento da temperatura favorece a produção e conversão em éster.

4.4 Validação dos Modelos de Esterificação

Para investigar a aplicabilidade dos modelos que descrevem a produção e conversão em éster, foram realizadas reacções de esterificação nas condições iniciais previstas pelos modelos que maximizavam estas respostas (Quadro IV.6). As concentrações de etanol, ácido butírico e butirato de etilo, estimadas ao longo da reacção de esterificação, catalisada pela lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em espuma de poliuretano Hypol FHP 2002TM são apresentadas nas Figuras 4.8 e 4.9.

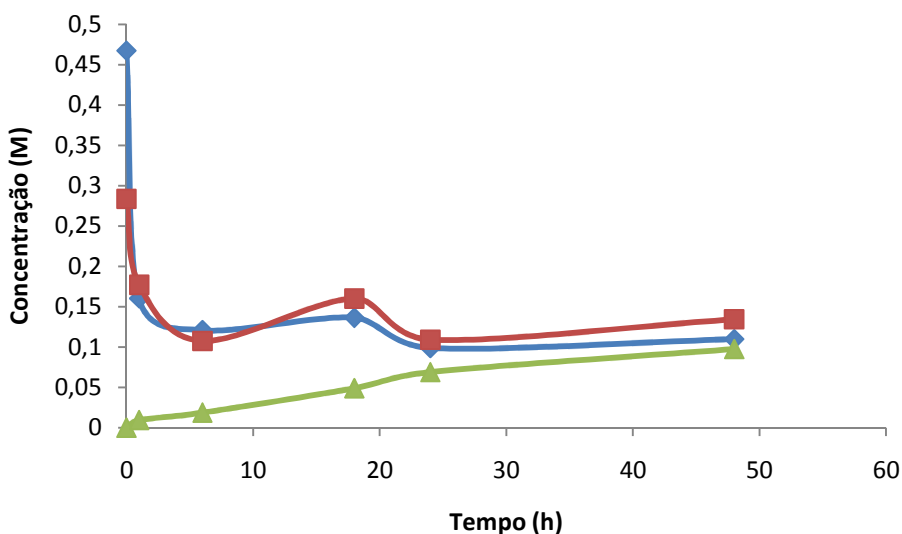


Figura 4.8 – Cinética de produção de ÉSTER (▲) por esterificação de EtOH (◆) com A (■), catalisada pela lipase de *n*-ROL imobilizada em espuma Hypol FHP 2002TM nas condições iniciais previstas para a maximização de produção em éster ($T = 31,5$ °C, $(A) = 0,225$ M, $RM = 1,637$).

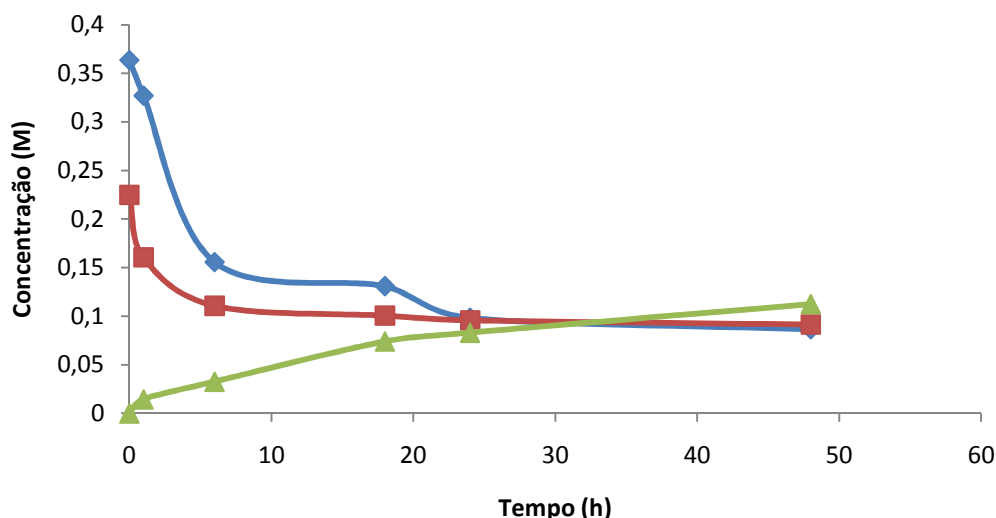


Figura 4.9 – Cinética de produção ESTER (▲) por esterificação de EtOH (◆) com A (■), catalisada pela lipase de *n*-ROL imobilizada em Hypol FHP 2002™ nas condições iniciais previstas para a maximização da conversão em éster ($T = 18,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, $(A) = 0,270\text{ M}$, $RM = 1,687$).

Os valores de concentração e conversão em butirato de etilo obtidos experimentalmente (Quadro IV.7) são semelhantes aos valores previstos pelos modelos (Quadro IV.6), o que confirma a qualidade do ajuste dos modelos aos dados experimentais, validando-os. As concentrações de etanol e ácido butírico no microambiente e a produtividade volumétrica também foram calculados, aproximando-se dos valores determinados com base nos modelos de previsão, apresentados no Quadro IV.6.

Quadro IV.7 - Valores obtidos nas reações de validação dos modelos que descrevem a produção (ESTER) e conversão em éster (CONV) após 48 h de reação de esterificação.

	ESTER	CONV
(Butirato de etilo)_{max} (M)	0,112	0,097
Conversão (%)	50	34,3
<i>C</i>_{micro-EtOH} (M)	1,131	1,146
<i>C</i>_{micro-A} (M)	0,648	0,739
Produtividade volumétrica (μmol/mL.h)	2,33	2,02

4.5 Comparação com outros Estudos

A produção de butirato de etilo por esterificação de etanol com ácido butírico catalisada por lipases imobilizadas (Dias *et al.*, 1991; Chen, 1996; Rodriguez-Nogales *et al.*, 2005; Thakar *et al.*, 2005; Pires-Cabral *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c, 2007, 2009, 2010) tem sido alvo de inúmeros estudos. A maioria destes estudos usa quantidades equimolares de etanol e de ácido butírico em solventes orgânicos, tais como *n*-hexano (Dias *et al.*, 1991; Rodriguez-Nogales *et al.*, 2005) e *n*-heptano (Dias *et al.*, 1991).

Um exemplo destes estudos foi o realizado com lipase de *Candida rugosa* imobilizada em espuma de poliuretano Hypol FHP 2002TM, testada como biocatalisador na esterificação de 0,3 M de etanol com 0,3 M de ácido butírico, em *n*-hexano ou *n*-heptano. As concentrações de éster obtidas foram de 0,21 M e 0,23 M, com produtividades volumétricas de 8,58 e 9,63 $\mu\text{mol/mL.h}$, respectivamente (Dias *et al.*, 1991). Pires-Cabral *et al.* (2007) referem que na presença de excesso de etanol (A = 0,35 M e EtOH = 0,53 M) em *n*-hexano, a reacção de esterificação catalisada pela lipase de *Candida rugosa* imobilizada em espuma Hypol FHP 2002TM conduziu à produção de 0,243 M de butirato de etilo, correspondente a uma conversão em éster de 69 % e uma produtividade volumétrica de 10,12 $\mu\text{mol/mL.h}$). Os valores obtidos no presente estudo estão abaixo dos valores obtidos nos estudos acima mencionados.

As lipases de *Rhizopus oryzae* têm sido utilizadas em estudos sobre reacções de esterificação. Salah *et al.*, (2007), num estudo sobre a produção de acetato de butilo, por esterificação catalisada pela lipase de *Rhizopus oryzae*, na forma livre e imobilizada em celite 545, na presença de solventes orgânicos e em sistema livre de solventes, verificaram que as conversões máximas, de 80 % e 76 %, foram obtidas com os sistemas com lipases imobilizadas na presença de heptano e hexano, respectivamente, a uma temperatura de 37 °C e razão molar ácido/álcool de 1:1 (0,20 M).

Capítulo 5

Conclusões

Conclusões

Os resultados obtidos no decorrer do trabalho experimental descrito ao longo desta dissertação, permitem afirmar que a extensão da reacção de esterificação do ácido butírico com etanol, depende da lipase e do suporte de imobilização. Pires-Cabral *et al.*, (2005a) verificaram que a natureza hidrofílica dos suportes de imobilização e a ligação que estes estabelecem com a lipase condicionam os fenómenos de partição dos substratos, da água inicialmente presente no sistema reaccional e dos produtos de reacção. Um suporte hidrofílico, como é o caso da espuma de poliuretano Hypol FHP 2002TM, favorece a migração dos compostos hidrofílicos do meio reaccional para o microambiente do biocatalisador e do butirato de etilo (hidrofóbico) no sentido contrário, para o meio reaccional. Deste modo, seria interessante estudar as características dos suportes de imobilização utilizados no aprisionamento das lipases de *Yarrowia lipolytica*, de modo a perceber os resultados obtidos para os biocatalisadores lip1, lip2, lip3, lip4, lip5 e lip6.

Após o *screening*, das lipases verificou-se que os biocatalisadores (lip4, lip7 e lip8), foram os que apresentaram maiores velocidades iniciais de esterificação, produtividades volumétricas e conversões em butirato de etilo, sendo o lip8, o biocatalisador que se mostrou mais adequado para a implementação do processo, em reactores descontínuos. Procedeu-se à modelação da produção de butirato de etilo e optimização das condições reaccionais.

O estudo aqui descrito mostra que a previsão das melhores condições iniciais para a produção de butirato de etilo usando um biocatalisador imobilizado pode ser abordada através da utilização de modelos de superfície de resposta. Além disso, confirma-se a viabilidade do RSM para prever a concentração inicial de substratos no meio reaccional e a temperatura a que se obtém o máximo de concentração e conversão em butirato de etilo. Os ensaios de validação demonstram que os modelos obtidos se ajustam aos resultados experimentais.

Para os ensaios de modelação e optimização da produção de butirato de etilo catalisada pela lipase de *Rhizopus oryzae* em espuma de poliuretano Hypol FHP 2002TM, calculou-se a concentração dos substratos no microambiente do biocatalisador. Conclui-se que o aumento da concentração de ácido butírico, na presença de excesso de etanol provoca um aumento da concentração de etanol, no microambiente do

biocatalisador que pode inibir a reacção de esterificação. Verificou-se também que o aumento da temperatura tem influência considerável no aumento da concentração de etanol no microambiente do biocatalisador. Os valores obtidos para a produtividade volumétrica de butirato de etilo neste trabalho não são tão elevados como os valores obtidos por outros autores. De facto, na implementação destes sistemas em reactores contínuos ao nível da produção industrial, a produtividade volumétrica torna-se um parâmetro mais importante que a conversão.

A metodologia desenvolvida neste trabalho pode ser transposta e utilizada para outros sistemas contendo lipases imobilizadas, tendo como objectivo a modelação e optimização das condições reaccionais.

Capítulo 6

Perspectivas de Trabalho Futuro

Perspectivas de Trabalho Futuro

Actualmente, a comunidade académica e industrial vê a biocatálise e, em particular, a biocatálise em solventes não aquosos, como uma área de investigação promissora, especialmente no desenvolvimento de processos ambientalmente sustentáveis. De facto, hoje em dia, entende-se como solventes não aquosos não apenas os tradicionais e problemáticos solventes orgânicos (tóxicos e prejudiciais ao ambiente), mas também uma gama de solventes que vão ao encontro da recente área de investigação e desenvolvimento denominada de “química verde”.

Por outro lado a exigência por parte dos consumidores de produtos naturais também tem ditado esta procura de meios alternativos nesta área.

Além disso, a legislação em vigor no que diz respeito à utilização de aromatizantes na indústria alimentar, também tem potenciado a investigação.

Segundo a directiva (88/388/CEE), relativa à aproximação das legislações dos Estados membros no domínio dos aromas destinados a serem utilizados nos géneros alimentícios e dos materiais de base para a respectiva produção entende-se por:

a) «Aroma», as substâncias aromatizantes, os preparados aromatizantes, os aromas de transformação, os aromas de fumeiro ou as suas misturas;

b) «Substância aromatizante», uma substância química definida que apresente propriedades aromatizantes, e:

i) Obtida por processos físicos adequados (incluindo a destilação e a extracção por solventes), ou por processos enzimáticos ou microbiológicos a partir de uma substância de origem vegetal ou animal não transformada ou transformada para o consumo humano por meio de processos tradicionais de preparação de géneros alimentícios (incluindo a secagem, a torrefacção e a fermentação);

ii) Obtida por síntese química ou isolada por processos químicos e quimicamente idêntica a substâncias presentes naturalmente em substâncias de origem vegetal ou animal tal como descritas em i);

iii) Obtida por síntese química, mas não quimicamente idêntica a substâncias presentes naturalmente em substâncias de origem animal ou vegetal, tal como descritas em i);

Por outro lado segundo esta directiva, os Estados membros adoptarão as disposições necessárias para que os aromas não possam ser comercializados nem utilizados se não respeitarem as regras previstas na presente directiva. Nomeadamente

garantindo que os aromas não contenham qualquer quantidade toxicologicamente perigosa de nenhum elemento ou substância,

Assim, enquadra-se nesta estratégia a utilização de solventes ambientalmente sustentáveis, solventes “verdes”. Os líquidos iônicos e os fluidos supercríticos, ajustam-se a esta designação e a sua utilização tem sido sugerida, como uma alternativa para este tipo de bioprocessos, quer a nível laboratorial como industrial. Deste modo, considera-se de extrema importância estudos futuros sobre a utilização deste tipo de compostos, como solventes na reacção de esterificação apresentada na presente dissertação.

Capítulo VII

Bibliografía

Adlercreutz, P. (1993). Immobilized enzymes. In: Nagodawithana, T., Reed, G., Eds. *Enzymes in Food Processing*, 3rd ed., Academic Press Inc., San Diego, p. 116.

Aires-Barros, M. R. (2002). Biocatálise em solventes orgânicos. *Boletim de Biotecnologia*, v. 72, p. 2-12.

Almarsson, Ö., Klibanov A.M (1995). “Remarkable Activation of Enzymes in Nonaqueous Media by Denaturing Organic Cosolvents”. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 87-92.

Aloulou, A., Rodriguez, J.A., Puccinelli, D., Mouz, N., Leclaire, J., Leblond, Y., Carrière, F. (2007). Purification and biochemical characterization of the Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Biochimica et Biophysica acta*, v. 1771, p. 228-237.

Ando, S., Ishida, H., Kosugi, Y., Ishikawa, K. (2002). Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshi*. *Applied Environment Microbiology*, v. 68, p. 430-433.

Aravindan, R., Anbumathi, P., Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 6, p. 141-158.

Asenjo, J.A. e Merchuck. J.C. (1995). *Bioreactor System Design*, Marcel Dekker, Inc., New York.

Bakker, M., van de Velde, F., van Rantwijk, F., sheldon, R.A. (2000). Hyghly Efficient Immoilization of Glycosylated Enzymes into Polyurethane Foams. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 70(3), p. 342-348.

Barros, J.R., Wethje E., Adlercreutz, P. (1998). Mass Transfer Studies on Immobilized α -Chymotrypsin Biocatalysts prepared by deposition for use in organic medium. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59(3), p. 364-373.

Barth, G. e Gaillardin, C. (1997). “Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*”. *FEMS Microbiology Review*, v.19, p.219-237.

- Bell, G., Halling, P. J., Moore, B. D., Partridge J., Rees, D. G. (1995). Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends in Biotechnology*, v. 13(11) p. 468-473.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Hugejensen, B., Norskov, L., Thim, L., Menge, U. (1990). "A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase". *Nature*, v. 343, p. 767-770.
- Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R., Gama, M. (2003). Engenharia Enzimática. Lidel, Lisboa.
- Chen, Jyh-Ping. (1996). Production of Ethyl Butyrate Using Gel-Entrapped *Candida cylindracea* Lipase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 82(4), p. 43-407.
- Carvalho, P.O., Contesini, F. J., Bizaco, R., Macedo, G.A. (2006). Optimization of enantioselective resolution of racemic ibuprofen by native lipase from *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, v. 33, p. 713-718.
- da Silva, V.C.F., Contesini, F.J., Carvalho, P.O. (2008). Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from *Aspergillus niger*: a comparative study. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, v. 8, p. 1468–1474.
- da Silva, V.C.F., Contesini, F.J., Carvalho, P.O. (2009). Enantioselective behavior of lipases from *Aspergillus niger* immobilized in different supports. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, v. 36, p.949–954.
- De Diego, T., lozano, P. Abad. M.A., steffensky. K., Vaultier, M., Iborra, J.L. (2009). On the nature of ionic liquids and their effects on lipases that catalyze Ester synthesis. *Journal of Biotechnology*, v. 140(3-4), p. 234-241.
- Dias, S.F., Vilasa-Boas, L., Cabral, J.M.S., Fonseca, M.M.R. (1991). Production of ethyl butyrate by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane. *Biocatalysis*, v. 5, p. 21-34.

DIRETIVA DO CONSELHO de 22 de Junho de 1988 relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros no domínio dos aromas destinados a serem utilizados nos géneros alimentícios e dos materiais de base para a respectiva produção (88/388/CEE) (JO L 184 de 15.7.1988, p. 61).

Doran, P. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. Harcourt Brade & Company Publishers. London.

Dordick, J. S. (1989). Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, p.194–211.

Dordick, J.S., Gorman, L.A.S. (1991). Organic solvents sipp water off enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 39 (4), p. 392-397.

Ferreira-Dias, S., DA Fonseca, M.M.R. (1995). The effect of substrate hydrophobicity on thr kinetic behaviour of immobilized *Candida rugosa* lipase. *Biocatalysis and Biotransformatios*, v, 13 (2) p. 99-110.

Ferreira-Dias, S., correra, A.C., Baptista, F. O. (1999). Activity and batch operational stability of *candida rugosa* lipase immobilized in different hydrophilic polyurethane foams during hydrolysis in a biphasic medium. *Bioprocess Engineering*, v. 21, p. 517-524.

Ferreira-Dias, S., Correia, A.C., da Fonseca, M.M.R. (2003). Response surface modeling of glycerolysis catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partial glycerides. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*, v. 21, p. 71-80.

Fickers, P., Benetti, P.H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit M.S. (2005). Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica* and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, v. 5(6–7):527–43.

Foresti, M. L., Errazu, A., Ferreira, M. L. (2005). Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene. *Biochemical Engineering Journal*, v. 25(1), p. 69- 77.

Foresti, M. L., Padernera, M., Bucalá, V., Ferreira, M. L. (2007). Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 62-70.

From, M. Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1997). Lipase catalysed esterification of lactic acid. *Biotechnology Letters*, v. 19(4), p. 315-317.

Gandolfi, R., Converti, A., Pirozzi, D., Molinari, F. (2001). Efficient and selective microbial esterification with dry mycelium of *Rhizopus oryzae*. *Journal of Biotechnology*, v. 92, p. 21-26.

Garcia, R.; Martinez, M. and Aracil, J. (2002). Enzymatic esterification of an acid with an epoxide using an immobilized lipase from *Mucor miehei* as catalyst: optimization of the yield and isomeric excess of ester by statistical analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.28 (3), p. 173-179.

Gaucula Jr., M.C., Singh, J. (1984). Response surface designs and analysis. Em: Statistical Methods in Food and consumer research. Food science and Technology. A Series of Monographs. *Academic Press*, p. 214.

Ghamgui, H., Châabouni, M., Gargouri, Y. (2004). 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent free system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 355-363.

Guieysse D., Sandoval G., Faure, L., Nicaud, JM., Monsana. P., Martya. A. (2004). New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. *Tetrahedron Asymmetry*, v. 15, p. 3539-43.

Gonçalves, A.P.V., Lopes, J.M., F. Lemos, Ramoa Ribeiro, F., Prazeres, D.M.F., Cabra, J.M.S, Aires-Barros. L. M.R. (1997). Effect of the immobilization support on the

hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani* Pisi. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, p. 93.

Haaland, P. D. (1989). *Experimental design in biotechnology, statistics: textbooks and Monographs*, D.B Owen (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York and basel, p.258.

Habulin M., Šabeder S., Paljevac M., Primožič M., Knez Ž. (2007). Lipase-catalyzed esterification of citronellol with lauric acid in supercritical carbon dioxide/co-solvent media. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 43(2), p. 199-203.

Halling, P. (1994). Thermodynamics predictions for biocatalysts in nonconventional media: Theory, test and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme and Microbiology Technology*, v. 16, p. 178-206.

Halling, P., Kvittingen, L. (1999). "Why did biocatalysis in organic media not take off in the 1930s?", *Tibtechnology*, v. 17. p. 343-344.

Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251.

Karra-Chaabounia, M., Bouazizb, I., Boufib, S., do Regoc, A. M. B., Gargouria, Y. (2008). Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 66, p.168–177.

Ibrik, A. (1998). Biochemical and structural characterization of triacylglycerol lipase from *Penicillium cyclopium*. *Lipids*, v. 33(4), p. 377-384.

Jääskeläinen, S., Verma, C.S., Hubbard, R.E., Linko, P.;Caves, L.S.D. (1998). "Conformational change in the activation of lipase: An analysis in terms of low frequency normal modes". *Protein Science*, v.7, p. 1359-1367.

Jaeger, K.E., Eggert, T. (2002). "Lipases for biotechnology", *Current Opinion in Biotechnonology*, v.13, p.390–397.

Jaeger, K.E., Reetz, M.T. (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology", *Tibtechnology*, v.16, p.396–403.

Janssen, A.E.M., Vaidya, A.M., Halling, P.J. (1996). Substrate specificity and kinetics of *Candida rugosa* lipase in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 340-346.

Klibanov, A. M. (2001). "Improving enzymes by using them in organic solvents", *Nature*, v. 409, p. 241-246.

Krishna, S.H, Karanth, N.G. (2002). Lipases and lipase-catalysed esterification reactions in non-aqueous media. *Catalysis reviews*, v. 44(4), p. 499-591.

Kwon, D.Y., Hong, Y.J., Yoon, S.H. (2000). Enantiomeric synthesis of (S)-2-methylbutanoic acid methyl ester, apple flavour, using lipases in organic solven. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 48, p. 524-530.

Laane, C.; Boeren, S., Hilhorst, R.; Veeger, C. (1986). Optimization of biocatalysis in organic media. In: *Biocatalysis in Organic Media*, Edited by C. Laane; J. Tramper and M.D. Lilly, Elsevier, Amsterdam, p. 65 – 84.

Laane, C. (1987). Medium-Engeneering for Bio-Organic synthesis. *Biocatalysis*, v.1, p. 17-22.

Lee, S. H, Doan, T.T.N, Won, K, Ha, S. H., Hoo Y.M. (2010). immobilization of lipase within carbon nanotube-silica composites fot non-aqueous reaction systems. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*, v. 62, p. 169-172.

Lima, A.W.O.; Angnes, L. (1999). Biocatálise em meios Aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica (artigo de revisão). *Química Nova*, v. 22(2), p. 229-245.

Luo, Y.; Zheng, y.; Jiang, Z.; Ma, Y.; Wel, D. (2006). A novel Psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodisel production via transesterification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 73, p.

349-355.

Mahapatra, P. Kumari, A. Garlapati, V. K., Banerjee, R. Nag, A. (2009). Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*. v. 60, p. 57-63.

Melo, L. L. M. M.; Pastore, G. M.; Macedo, G. A. (2005). Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus sp.* *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3181-3185.

Mehtras, N.C.; Bastawde, K.B; Gokhale, D.V. (2009). Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus Níger* NCIM 1207. *Biosource Technology*, v. 100, p. 1486-1490.

Molinari, F., Marianelli, G., Aragozzini, F. (1995). Production of flavour esters by *Rhizopus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 43(6), p. 967- 973.

Montgomery, D.C. (1991). Design and analysis of Experiments. John Wiley and Sons. New York. p. 649.

Moniruzzaman, M. Nakashima, K. Kamiya, N. Goto, M. (2009). Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochemical Engineering journal* (Article in Press).

Nawani, n., E Kaur, J. (2007). Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus sp.*: production, purification and biochemical characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40(4-5), p. 881-887.

Nishio, T., Chikano, T., Kamimura, M. (1988). Ester synthesis by the lipase from *Pseudomonas fragi* 22.39 B. *Agriculture and Biology Chemistry*, v. 52, p. 1203-1208.

Nunes, P., Pires-Cabral, P., Guillén, M., Valero, F., Ferreira-Dias, S. (2009). Production of low caloric structured lipids containing medium chain fatty acids, catalyzed by

immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. *New Biotechnology*, V. 25(1), p. S111.

Nunes, G. F. M., Veloso de Paula, A., de Castro, H. F., dos Santos, J. C. (2010). Compositional and textural properties of milkfat–soybean oil blends following enzymatic interesterification. *Food Chemistry* (Article in Press).

Oishi, H.; Morimoto, T.; Watanabe, Y.; Tamai, Y. (1999). Purification and characterization of phospholipase B from *Kluyveromyces lactis*, and cloning of Phospholipase B gene. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 63(1), p. 83-90.

Olivier-boubigou, H., Magna, L., Morvan, D. (2010). Ionic liquids and Catalysis: Recent progress from Knoeledge to applications. *Applied Catalysis A: General*, v. 373, p. 1-56.

Paiva, A.L., Balcão, V.M., Malcata, F.X. (2000). Kinetics and Mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 187 – 204.

Paques, F.W., Macedo, G.A. (2006). Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, v. 29(1), p. 93-99.

Persson, M., Mladenoska, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P. (2002). Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31(6), p. 833-841.

Pires-Cabral, P. (2005a). Produção de butirato de etilo catalisada pela lipase de *Candida rugosa* imobilizada em poliuretanos. Tese de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial, instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

Pires-Cabral, P., da Fonseca, M.M.R, Ferreira-Dias, S. (2005b). Modeling the microenvironment of a lipase immobilised in polyurethane foams, *Biocatalisys and Biotransformations*, v. 23, p. 363–373.

Pires-Cabral, P.; E. Dubreucq, M.M.R. da Fonseca, Ferreira-Dias, S. (2005c). Partitioning of water in organic systems with lipase immobilized in polyurethane foams, *Biochemical Engineering Journal*, v. 26, p. 29–37.

Pires-Cabral, P., da Fonseca, M.M.R, Ferreira-Dias, S. (2007). Modeling the production of ethyl butyrate catalised by *Candida rugosa* lipase immobilised in polyurethane foams. *Biochemical Engineering Journal*, v. 33, p. 148-158.

Pires-Cabral, P., da Fonseca, M.M.R, Ferreira-Dias, S. (2009). Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study. *Biochemical Engineering Journal*, v. 43(3), p. 327-332.

Pires-Cabral, P., da Fonseca, M.M.R., Ferreira-Dias, S. (2010). Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48(2), Pages 246-252.

Price, N.C., Dwek, R.A., Ratcliffe, R.G., Wormald, M.R. (2001). Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists, 3rd ed., Oxford University Press.

Ozyilmaz, G., Gezer, E. (2009). Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Article in Press.

Raghavendra, T., Sayania, D., Madamwar, D. (2010). Synthesis of the ‘green apple ester’ ethyl valerate in organic solvents by *Candida rugosa* lipase immobilized in MBGs in organic solvents: Effects of immobilization and reaction parameters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (Article in Press).

Rajendran, A., Palanisamy, A., Thangavelu, V. (2009). Lipase catalyzed Ester synthesis for food processing industries, a review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52(1), p. 207-219.

- Rodriguez-Nogales, J.M., Roura, E., Contreras, E. (2005). Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 63-68.
- Ryu, K. Dordick, J.S. (1992). How do organic solvents affect peroxidase structure and function? *Biochemistry*, v. 31, p. 2588-2598.
- Salah, R.B., Ghamgui, H., Miled, N., Mejdoub, H., Gargouri, Y. (2007). Production of Butyl Acetate Ester by lipase from Novel strain of *Rhizopus oryzae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 103(4), p. 368-372.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas, V. (2008). Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 54(1-2), p. 19-26.
- Santos, J. C., Bueno, T., Molgero da Rós, P. C., de Castro F. (2007). Lipase-catalyzed synthesis of butyl esters by direct esterification in solvent-free system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.82, p. 56–961.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, v. 409, p.258-268.
- Shih I.-L., Hung, S.-H., Chen, F.y., Ju, H.Y., Shieh, C.J. (2007). Optimized synthesis of lipase-catalysed L-menthyl butyrate by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry*, v. 100, p. 1223-1228.
- Shu, C. H.; Xu, C. J.; Lin, G.C. (2006). Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia Cinnamomea*. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 3, p. 734-738.
- Surribas, A., Stahn, R., Montesinos, J.L., enfors, S., Valero, F., Jahic, M. (2007). Production of a *Rhizopus oryzae* lipase from *Pichia pastoris* using alternative operational strategies'. *Journal of Biotechnology*, v. 130, p. 291-299.
- Takahashi, S., Mitsuyoshi, U., Atomi, H., Beer, H.D., Bornscheuer, U.T., Schmid, R.D,

- Tanaka, A. (1998). Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 86(2), p. 164-168.
- Tan, H. S. G., Yu, B., Curran, P., Liu, S. Q. (2011). Lipase-catalysed synthesis of natural aroma-active 2-phenylethyl esters in coconut cream. *Food Chemistry*, v. 124, p.80–84.
- Tecelão, C., Guillén, M., Rivera, I., Sandoval, G., Valero, F., Ferreira-Dias, S. (2009). Screening of noncommercial biocatalysts for the production of human milk fat substitutes. *New Biotechnology*, v. 25(1), Page S120.
- Thakar A., Madamwar D. (2005). Enhanced ethyl butyrate production by surfactant coated lipase immobilized on silica. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3263–3266.
- Tsugawa, R., Nakase, T., Koyabashi, T., Yamashita, K. e Okumura, S. (1969). “Fermentation of *n*-paraffins by yeast. Part III. A-Ketoglutarate productivity of various yeasts”, *Agriculture and Biology Chemistry*, v. 33, p.929-938.
- Va, S.S. (2006). Uso de biocatalisadores imobilizados: Uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Analytica*, v. 23, p. 60-70.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M.J. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, p. 113–148
- Weisberg S. (1985). *Applied Linear Regression*. Ed. John Wiley & Sons, p.216-219.
- Wen, S., Tan, T., Yu, M. (2008). Immobilized lipase YLip2-catalyzed resolution of (\pm) α -phenylethyl amine in a medium with organic cosolvent. *Process Biochemistry*, v. 43, p.1259-1264.
- Winkler, F.K., Darcy, A., Hunziker, W. (1990). “Structure of human pancreatic lipase” *Nature*, v. 343, p. 771-774.

Yu, M., Qin, S., Tan, T. (2007). Purification and characterization of extracellular lipase, lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, v. 42(3), p. 384-391.

Yu, M., Lange, S., Ritchter, S., Tan, T., Schmid, R. (2007b). High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, v. 53(2), p. 255-263.

Weete, J. D. (1998). Microbial lipases. *Food Science Technology*, v. 88, p. 641-664

Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1993). Improved activity retention of enzymes deposited on solid supports. *Biotechnology and Bioengineering*, v.41, p.171-178.