

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

SÍNTESE ENZIMÁTICA DOS ÉSTERES DE AROMA BUTIRATO E
VALERATO DE CITRONELILA POR LIPASE DE *RHIZOPUS* SP

Lauro Luís Martins Medeiros de Melo
Engenheiro de Alimentos

Gláucia Maria Pastore
Orientadora

Gabriela Alves Macedo
Co-orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas – SP

2004

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

M491s Melo, Lauro Luís Martins Medeiros de
Síntese enzimática dos ésteres de aroma butirato e valerato
de citronelila por lípase de *Rhizopus* sp / Lauro Luís Martins
Medeiros de Melo. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Co-orientador: Gabriela Alves Macedo
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Enzimas – Síntese. 2.Ésteres. 3.*Rhizopus*. 4.Lipase.
I.Pastore, Gláucia Maria. II.Macedo, Gabriela Alves.
III.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Prof. Dr. Young Kun Park

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Profa. Dra. Maria Regina Bueno Franco

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora professora Gláucia Maria Pastore e à minha co-orientadora professora Gabriela Alves Macedo pela oportunidade de adquirir tantos conhecimentos novos. Além disso, agradeço pela estrutura oferecida para a realização do trabalho, pela orientação na condução da parte prática e pelo auxílio na elaboração desta Dissertação.

Agradeço aos meus pais e irmãos e todo o restante da minha família por proporcionaram a base que me fez chegar até este ponto.

Ao Dr. Alexander Ivanov pelas consultas à distância.

Aos companheiros de pós-graduação Denise, Biba, Eugênia, Mariana, Andréia, Janaina, Andreas, Giselle, Mário, Cedenir e, mais recentemente, Rosângela. E ainda, Juliana, Giulliana, Michele e Raquel. Ao pessoal dos laboratórios, em especial a D. Dora, Eliane, Cleber, Bia e Guilherme, sempre presentes e acessíveis. Agradeço a todos pela amizade construída ao longo do tempo de convívio.

Aos amigos de Viçosa, principalmente aqueles que de lá vieram comigo após a graduação, Bruce, Geórgia e Kathleen.

Finalmente, mas não menos importante, agradeço à Aline. Companheira de todos os momentos - ao meu lado, pelo telefone, ou via internet. Quem soube escutar nos momentos difíceis e vibrar nos de sucesso.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO DA LITERATURA	2
3.1. Biotecnologia de Alimentos	3
3.2. Enzimas Microbianas	9
3.3. Lipases	16
3.4. As Lipases na Indústria de Alimentos	20
3.5. Catálise em Meio Livre de Solvente Orgânico	26
3.6. Enantioseletividade	28
3.7. Imobilização de Enzimas	36
3.8. Ésteres de Aroma Terpênicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1. Materiais	48
4.1.1. Reagentes e Solventes Químicos	48
4.1.2. Enzimas	48
4.1.3. Padrões para Cromatografia Gasosa e Quiral	48
4.1.4. Equipamentos	48
4.2. Metodologia	49
4.2.1. Produção da lipase de <i>Rhizopus</i> sp	49
4.2.2. Reações de Esterificação na Presença de Solvente Orgânico	50
4.2.3. Reações de Esterificação na Ausência de Solvente Orgânico	50
4.2.4. Imobilização da Enzima	51
4.2.5. Quantificação por Cromatografia Gasosa	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1. Seleção da Lipase para Síntese de Ésteres de Citronelila	53

5.2.	Estudo do Efeito do Comprimento da Cadeia do Ácido e da Presença ou Não de Solvente Orgânico (Isooctano) na Síntese de Ésteres de Citronelila	56
5.3.	Otimização dos Parâmetros da Reação de Esterificação	59
5.3.1.	Butirato de Citronelila	60
5.3.2.	Valerato de Citronelila	65
5.4.	Imobilização da Enzima e Otimização	70
5.4.1.	Butirato de Citronelila	71
5.4.2.	Valerato de Citronelila	73
5.5.	Avaliação da Reutilização da Enzima Imobilizada	75
5.6.	Estudo da Enantioseletividade da Lipase de <i>Rhizopus</i> sp	78
6.	CONCLUSÕES	80
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8.	ANEXOS	93

ÍNDICE DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Alguns fungos com reconhecida importância biotecnológica	11
TABELA 2	Importância dos fungos na indústria de alimentos	12
TABELA 3	Aplicações de enzimas para produção e processamento de alimentos	15
TABELA 4	Classificação das hidrolases	16
TABELA 5	Principais lipases usadas para biotransformações em solventes orgânicos	17
TABELA 6	Algumas propriedades e aplicações de lipases comerciais	22
TABELA 7	Vantagens de enzimas e células imobilizadas	37
TABELA 8	Estruturas e propriedades organolépticas do butirato e do valerato de citronelila	47
TABELA 9	Conversão molar na síntese de butirato de citronelila	53
TABELA 10	Conversão molar na síntese de valerato de citronelila	54
TABELA 11	Efeito do comprimento da cadeia do ácido sobre a esterificação do citronelol por lipase de <i>Rhizopus</i> sp na presença de isooctano, a 40°C	57
TABELA 12	Efeito do comprimento da cadeia do ácido sobre a esterificação do citronelol por lipase de <i>Rhizopus</i> sp na ausência de solvente, a 40°C	57
TABELA 13	Resultados observados para síntese do butirato de citronelila utilizando planejamento fatorial completo	60
TABELA 14	ANOVA da EQUAÇÃO 1	61
TABELA 15	ANOVA da EQUAÇÃO 2	62
TABELA 16	Resultados observados para síntese do valerato de citronelila utilizando planejamento fatorial completo	65
TABELA 17	ANOVA da EQUAÇÃO 3	66
TABELA 18	ANOVA da EQUAÇÃO 4	67
TABELA 19	Resultados observados para síntese do butirato e do valerato de citronelila por lipase imobilizada após 24 horas utilizando planejamento fatorial completo	71
TABELA 20	ANOVA da EQUAÇÃO 3	71

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página	
FIGURA 1	Estrutura da lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em um modelo construído com coordenadas de raio-X	18
FIGURA 2	Ação catalítica das lipases	21
FIGURA 3	Apresentação esquemática de uma conversão enzimática em um sistema bifásico	24
FIGURA 4	Ciclodextrinas (escala aproximada)	34
FIGURA 5	Ciclodextrina (modelo molecular)	35
FIGURA 6	Enantioseparação do citrionelol	36
FIGURA 7	Apresentação esquemática de diferentes maneiras de aplicação de enzimas em solventes orgânicos	40
FIGURA 8	Conversão molar na síntese de butirato de citrionelila	54
FIGURA 9	Conversão molar na síntese de valerato de citrionelila	54
FIGURA 10	Efeito do comprimento da cadeia do ácido sobre a esterificação do citrionelol por lipase de <i>Rhizopus</i> sp na presença de isooctano, a 40°C	57
FIGURA 11	Efeito do comprimento da cadeia do ácido sobre a esterificação do citrionelol por lipase de <i>Rhizopus</i> sp na ausência de solvente, a 40°C	58
FIGURA 12	Superfície de resposta da síntese de butirato de citrionelila após 24 horas de reação	61
FIGURA 13	Curva de contorno da síntese de butirato de citrionelila após 24 horas de reação	62
FIGURA 14	Superfície de resposta da síntese de butirato de citrionelila após 48 horas de reação	63
FIGURA 15	Curva de contorno da síntese de butirato de citrionelila após 48 horas de reação	64
FIGURA 16	Superfície de resposta da síntese de valerato de citrionelila após 24 horas de reação	66
FIGURA 17	Curva de contorno da síntese de valerato de citrionelila após 24 horas de reação	67
FIGURA 18	Superfície de resposta da síntese de valerato de citrionelila após 48 horas de reação	68
FIGURA 19	Curva de contorno da síntese de valerato de citrionelila após 48 horas de reação	68

FIGURA 20	Superfície de resposta da síntese de butirato de citronelila por lipase imobilizada	72
FIGURA 21	Curva de contorno da síntese de butirato de citronelila por lipase imobilizada	73
FIGURA 22	Reutilização da enzima imobilizada na síntese do butirato de citronelila	75
FIGURA 23	Reutilização da enzima imobilizada na síntese do valerato de citronelila	76

RESUMO

A capacidade catalítica da preparação bruta de lipase de *Rhizopus* sp foi testada comparando-se com outras lipases na síntese dos ésteres de aroma do álcool terpênico citronelol. A ação desta enzima foi comparada com as lipases de *Fusarium* 152 B, *Fusarium* 160 A1, *Trichoderma* sp e *Alcaligenes* sp. A lipase de *Rhizopus* sp pelo desempenho apresentado foi selecionada para este trabalho.

Foi verificado o efeito do comprimento da cadeia carbônica do doador acila sobre o rendimento da reação, bem como o efeito da adição de solvente orgânico ao meio de reação. Foram verificadas melhores taxas de esterificação de acordo com o aumento do número de carbonos do ácido utilizado. Assim, os ésteres butirato e valerato de citronelila foram escolhidos para dar prosseguimento ao trabalho. Além disso, constataram-se as mesmas conversões molares tanto na presença de solvente orgânico (isooctano) quanto em meio livre de solvente.

A etapa seguinte consistiu de um planejamento experimental fatorial completo com o intuito de otimizar a síntese dos ésteres em meio livre de solvente, tendo como parâmetros reacionais a razão molar entre os substratos (álcool/ácido) e a quantidade de enzima (% p/p em relação à massa de reagentes). Destes ensaios, verificou-se melhor habilidade catalítica da enzima quando se utiliza maior proporção de álcool (3:1) e maior quantidade de enzima (6%).

Realizou-se a imobilização da lipase em celite a fim de verificar se a produtividade do sistema poderia ser aumentada através da reutilização. Este procedimento resultou em um aumento das taxas de esterificação. Quando a enzima imobilizada foi aplicada sob as condições ótimas de razão molar entre os substratos e quantidade de enzima, obteve-se rendimentos de até 100% na síntese do butirato e do valerato de citronelila. Todavia, não obteve-se sucesso no que se refere à reutilização desta lipase imobilizada, tendo em vista que sua atividade caiu consideravelmente após poucos ciclos de uso.

Os estudos realizados com a preparação de lipase bruta de *Rhizopus* sp demonstraram que a mesma não apresenta a propriedade de selecionar apenas um dos isômeros óticos do citronelol, apresentando baixa enantioseletividade nas condições analisadas.

ABSTRACT

The enzymatic synthesis of citronellyl flavor esters with a non commercial lipase from *Rhizopus* sp was investigated. The results were compared with other lipases from *Fusarium* 152 B, *Fusarium* 160 A1, *Trichoderma* sp, and *Alcaligenes* sp. The lipase from *Rhizopus* sp was selected as better biocatalyst for the citronellyl ester synthesis.

It was verified the effect of the acyl donor chain length as well as the use of organic solvent on the esterification rate. The ester production was higher for butyric and valeric acids. The same yield was observed in organic solvent (isooctane) and in solvent-free systems.

A two level factorial design was used to optimize the ester synthesis. The reaction parameters were substrate molar ratio (alcohol/acid) and enzyme amount (% for mass of reactants). This study showed that the lipase has the best catalytic activities with molar ratio 2,41:1 and enzyme amount, 6%.

The behavior of the immobilized lipase on celite was studied and its esterification activity improved, mainly under the best operational conditions. However, immobilized lipase on celite is not appropriate with respect to reuse because its activity decreased after few cycles.

During the study it was observed that the lipase has no enantioselectivity in the synthesis of citronellyl flavor esters.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o estilo de vida saudável vem direcionando a vida de um número cada vez maior de pessoas. Este novo estilo de vida inclui, principalmente, uma alimentação baseada em produtos que não comprometam a saúde ou até promovam benefícios à mesma. Com isso, uma maior tendência é a preferência por alimentos, ingredientes e aditivos naturais. Nesse contexto, os aditivos naturais têm recebido especial atenção por parte dos consumidores.

No caso específico dos compostos de aroma, foi preciso obter uma alternativa que atendesse à demanda cada vez maior por estes compostos e que já não podia ser suprida somente pelos métodos clássicos de extração das plantas superiores.

Neste ponto, a biotecnologia se apresenta como uma alternativa promissora, podendo atender aos desejos dos consumidores por ingredientes de aromas naturais já que a Legislação da maioria dos países prevê que os produtos obtidos por via biotecnológica possam ser comercializados como naturais.

A síntese de ésteres de aroma catalisada por lipases é objeto de pesquisa há alguns anos. Primeiramente, com enzimas livres em solventes orgânicos; posteriormente, desenvolveram-se as técnicas de imobilização das enzimas; e, mais recentemente, a tecnologia dos sistemas livres de solvente vem se destacando pela suas vantagens, principalmente no que se refere ao uso dos seus produtos para fins alimentícios.

Por tudo isso, faz-se necessário um estudo mais aprofundado da síntese enzimática de compostos de aroma. E os ésteres terpênicos butirato e valerato de citronelila são amplamente encontrados na natureza como compostos de aroma e empregados como tal pela indústria de alimentos. Este estudo deve analisar os principais fatores que interferem no rendimento desta síntese, avaliando seus efeitos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo estudar os parâmetros de reação de síntese dos ésteres de aroma butirato e valerato de citronelila por lipase de *Rhizopus* sp. Além disso, estudou-se a imobilização da enzima com o intuito de verificar a possibilidade de sua reutilização. Por fim, foi investigada a enantioselitividade da lipase em função da esterificação do álcool racêmico citronelol.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Na conversão de matérias-primas em produtos finais alimentícios, três fatores devem ser considerados: viabilidade econômica, segurança e aceitabilidade. Depois de se atender aos dois primeiros elementos, deve-se dar atenção à aceitabilidade. O aroma, bem como a cor e a textura, tem um papel importante na aceitabilidade. Portanto, a conversão de precursores em compostos de aroma não tem somente importância científica, mas também é de interesse para a indústria de alimentos em geral. Os seus produtos representam um elemento crítico no sucesso de outras indústrias alimentícias que os utilizam como insumos (ERICKSON, 1991).

Mais de 5000 compostos de aroma já foram identificados em alimentos. Muitos desses não estão presentes no estado verdadeiramente natural dos alimentos. Eles são gerados por processos enzimáticos ou térmicos durante o processamento dos alimentos. Frequentemente, os aromas gerados dessa forma são mais dependentes do tipo de processamento do que do alimento em si. É a proporção entre esses diferentes aromas presentes, que podem chegar a 1000 em um único alimento (KATZ, 1986), que determina as características sensoriais do mesmo (STOFBERG, 1986).

A indústria de aromas tem tido uma ótima performance nas últimas décadas com um crescimento médio anual de 6-7% (HARTMANN *et al*, 1995).

Atualmente, há um grande campo para a indústria de aromas se forem levados em consideração os 10000-15000 novos produtos desenvolvidos pelas companhias de alimentos e bebidas na Europa e nos Estados Unidos a cada ano – sem falar nos 1000 ou mais novos refrigerantes desenvolvidos no Japão anualmente (HARTMANN *et al*, 1995).

Além disso, compostos flavorizantes (substâncias que geram sabor e odor) representam 10-15%, em massa, de todos os aditivos usados no mundo, o que significa 25% do valor de todo o mercado mundial de aditivos (ARMSTRONG *et al*, 1989).

Há previsões de que o mercado de aromas pode crescer a uma taxa anual em torno de 30%. Uma população cada vez mais velha e a conseqüente diminuição da acuidade do sabor entre as pessoas mais idosas resultam numa necessidade por produtos com maior intensidade de aromas (ARMSTRONG *et al*, 1989).

Em resposta à necessidade de melhores serviços, as estratégias e métodos mudaram drasticamente nos últimos anos (HARTMANN *et al*, 1995). Não é somente a criação de novos aromas o objetivo principal, mas também o desenvolvimento de novas tecnologias.

3.1. Biotecnologia de Alimentos

A biotecnologia influenciou e continua influenciando o mercado de aromas. O uso de aromas naturais produzidos por fermentação ou processos enzimáticos está crescendo em todo o mundo.

Por muito tempo, óleos essenciais de plantas superiores foram as únicas fontes de aromas naturais. Hoje, devido à preferência dos consumidores por aditivos naturais nos alimentos, a demanda por aromas naturais excede a quantidade de aromas produzida pelas plantas superiores. Além disso, essa quantidade é altamente dependente de fatores de difícil controle tais como influência do clima, doenças vegetais, flutuação da qualidade,

instabilidade sócio-política da maioria das áreas fornecedoras. Por tudo isso, a biotecnologia representa uma alternativa promissora (KRINGS *et al*, 1995).

Consumidores e legisladores de todo o mundo estão se tornando cada vez mais envolvidos nas fontes e composições dos aromas em alimentos. Em muitos casos, especialmente por parte dos consumidores, há uma preferência crescente pelo que se chama de aromas naturais (STOFBERG, 1986).

Esta preferência do consumidor por aromas naturais (produzidos biologicamente ao invés de quimicamente) criou uma demanda por substâncias que contenham todas as propriedades desejáveis por ambos os aromas “naturais” e “artificiais”. Dependendo do tipo de aroma e de sua aplicação, tais propriedades desejáveis são: resistência, estabilidade térmica, estabilidade microbiológica, qualidade uniforme e disponibilidade ilimitada (STOFBERG, 1986).

Nossa alimentação contém substâncias químicas naturalmente presentes e, freqüentemente, compostos químicos sintéticos. Não há distinção química entre um aroma sintetizado pela natureza ou o mesmo composto preparado em laboratório. Porém, a idéia de que qualquer substância natural é benéfica e que as sintéticas são prejudiciais ainda prevalece entre os consumidores (LUGAY, 1986).

Segundo a Resolução nº 104 de 14 de maio de 1999 (ANVISA) aromatizantes/aromas naturais são obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias primas aromatizantes/aromas naturais. Entende-se por matérias primas aromatizantes/aromas naturais os produtos de origem animal ou vegetal normalmente utilizados na alimentação humana, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado (torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, enzimático, etc.).

Os aromatizantes/aromas naturais compreendem: óleos essenciais, extratos, bálsamos, oleoresinas e oleogomaresinas, e substâncias aromatizantes/aromas isolados (ANVISA, 1999).

Substâncias aromatizantes/aromas naturais isoladas são substâncias quimicamente definidas, obtidas por processos físicos, microbiológicos ou enzimáticos adequados, a partir de matérias primas aromatizantes naturais ou de aromatizantes/aromas naturais (ANVISA, 1999).

Esta situação não escapou da percepção das indústrias de alimentos. Nota-se claramente nos últimos anos uma tendência crescente por ingredientes e aditivos naturais nas formulações de alimentos. Esta tendência está de acordo com o aumento da conscientização a respeito dos assuntos de saúde por parte dos consumidores. Os consumidores vão continuar a pressionar as indústrias de alimentos a procurar novas formas de aditivos naturais (LUGAY, 1986).

Durante os últimos 15 a 20 anos os processos biotecnológicos se estabeleceram na indústria de aromas para produção de substâncias naturais. A Legislação de alimentos de muitos países reconhece o fato de aromas naturais poderem ser obtidos por métodos biotecnológicos. Entretanto, certas condições têm que ser observadas para se garantir a característica natural do produto final. Estas condições estipulam que as matérias primas usadas têm que ser naturais e somente processos físicos são permitidos para o isolamento e purificação dos materiais formados. Exemplos típicos de tais processos físicos são extração, destilação e cristalização (GATFIELD *et al*, 1995).

As três principais técnicas de biotransformação podem ser distinguidas da seguinte forma: (1) uso de enzimas, (2) uso de microrganismos, e (3) células vegetais e cultura de tecidos. A técnica de biotransformação mais utilizada é a aplicação de enzimas. Um exemplo de aplicação comercial de um processo de biotransformação enzimática é a produção de benzaldeído a partir de caroços de pêssgo e damasco (BERGER *et al*, 1999).

Pode-se fazer uma distinção entre a biotecnologia microbiana tradicional e a moderna. Fermentações de produtos lácteos e para produção de etanol fazem parte da biotecnologia mais tradicional; elas foram praticadas durante milênios e são bem aceitas pelos consumidores na maior parte do mundo. Em comparação, outros aditivos microbianos de alimentos e enzimas não fizeram parte da indústria dos alimentos até o século XX (JOHNSON-GREEN, 2002).

No Brasil, o setor de biotecnologia cresceu 300% (em número de novas empresas) entre 1993 e 2001. Atualmente, ele emprega 28 mil trabalhadores com um faturamento de 9 bilhões de reais - há sete anos era de 1 bilhão de reais. Porém, o setor ainda é pequeno: a indústria brasileira de biotecnologia, em número de empresas, corresponde a 1/5 da norte-americana, não chega a metade da européia e tem o mesmo tamanho da canadense. O setor de biotecnologia é a área que consiste em usar a ciência para criar ou modificar organismos e fabricar novos produtos. O Brasil importou 500 milhões de dólares em produtos de biotecnologia em 1999. Em 1995, 100 milhões. Isso mostra que há forte demanda no país por esses produtos. Ou seja, existe mercado interno. O crescimento do parque industrial reduziria a pressão do setor sobre a balança comercial do país (Folha de S. Paulo, 2002).

Além disso, a biotransformação apresenta algumas vantagens que certamente levarão a um aumento da importância comercial da produção de aromas por esse processo em um futuro próximo: produção de aromas naturais, obtenção de produtos uniformes com uma produtividade constante, métodos de processo compatíveis com a atual preocupação ambiental, produção de aromas naturais que não são encontrados em quantidades apreciáveis na natureza, alta especificidade (química, regio e estereo), altas velocidades com baixas frações molares e regio-estereoseletividade (BERGER *et al*, 1999).

Esta última vantagem citada pode ser explicada pelo fato de a configuração absoluta de um aroma influenciar fortemente suas propriedades sensoriais, especialmente em relação à sua composição estereoquímica. Os métodos usados de produção de aromas devem, portanto, resultar em compostos opticamente puros. Enquanto métodos químicos geralmente levam a formação de misturas de isômeros, os métodos biotecnológicos usualmente

possuem grande regio-estereoseletividade, como no caso das enzimas (BERGER *et al*, 1999).

Ainda competindo com sínteses químicas, os biocatalisadores possuem outras vantagens: eles atuam em carbonos quimicamente inertes, modificam seletivamente ou especificamente determinada funcionalidade numa molécula multifuncional, introduzem quiralidade, resolvem misturas racêmicas, e atuam sob condições ambiente (BERGER *et al*, 1999).

Duas estratégias distintas são possíveis envolvendo o uso de enzimas para produzir aromas: a de multicomponentes e a de aromas individuais (GATFIELD, 1986).

A estratégia de produção de componentes de aroma individuais consiste na biossíntese, isolamento e purificação de determinada substância. Isto envolve a exploração de bioconversões específicas, tais como oxidação e redução ou sínteses, por sistemas enzimáticos específicos (GATFIELD, 1986).

Várias substâncias foram identificadas como associadas a aromas específicos: 2-isobutiltiazol com aroma de tomate, cinamatos de metila e etila com aroma de morango, antranilato de metila com aroma de uva, e benzaldeído com aroma de cereja (ARMSTRONG *et al*, 1989).

O grande desafio é produzir aromas que sejam, senão idênticos, tão bons quanto os tradicionais (com os quais os consumidores estão familiarizados). Resumidamente, a qualidade do aroma não pode ser menor do que as expectativas dos consumidores (LUGAY, 1986).

Há algumas aplicações para os aromas naturais ou seus precursores. Elas incluem adição direta em formulações de alimentos e bebidas, bem como em processos onde precursores irão liberar os aromas desejados. Há muitas outras aplicações, especialmente

em relação à substituição de aromas sintéticos pelos naturais. Porém, a maior vantagem é dar aos consumidores o que eles desejam – um aroma de melhor qualidade, prontamente disponível e a um custo razoável (LUGAY, 1986).

Além da produção de compostos de aroma, biocatalisadores podem facilitar processos usuais de extração. Um processo japonês utiliza celulases de fungo para melhorar a extração de suco de laranja sem rompimento das glândulas oleosas da casca que contêm *off flavors* e amargor. Celulases e pectinases também foram usadas para degradar paredes celulares para liberar mais óleo de sementes durante o processamento. O uso de 500-1000 g de enzima por tonelada de semente a temperatura de 30-50°C pode produzir um aumento de 2-6% no rendimento da extração do óleo (ARMSTRONG *et al*, 1989).

Ésteres são compostos de aroma extremamente importantes. O aroma indesejável “de fruta” às vezes encontrado em queijo tipo *Cheddar* é devido à presença de ésteres, principalmente butirato e caproato de etila. Ésteres similares podem ser encontrados em cervejas nas quais o álcool fusel e os ácidos graxos de cadeia curta acético e butírico estão também presentes. Essas substâncias sofrem esterificação mediada pela enzima álcool acetiltransferase presente nas leveduras usadas na fermentação da cerveja. Há também ésteres presentes no vinho que são metabolicamente produzidos pelas leveduras. Destes, o acetato de etila parece ter um papel importante no aroma deste produto (GATFIELD, 1986).

Embora métodos químicos sejam amplamente empregados na produção de aromas comerciais, processos enzimáticos são também colaboradores para o desenvolvimento de aromas usando uma crescente quantidade de alimentos: molho de soja, vinho, embutidos, cerveja, chucrute e vários laticínios. Dentre o grande número de reações catalisadas por enzimas, há aquelas que envolvem a modificação de substratos ou precursores apropriados levando à criação de aromas. Estes compostos de aroma são produzidos como resultado do catabolismo de complexos ingredientes de alimentos, abrangendo proteínas, lipídeos e carboidratos por enzimas selecionadas (LEE, 1996).

Gordura de leite lipolisada foi um dos primeiros aromas de fermentação a serem produzidos em larga escala. O creme era submetido a uma hidrólise enzimática controlada utilizando lipase. A importância dos ácidos graxos livres nos aromas característicos de vários laticínios é um fato não contestado, e ácidos graxos diferentes apresentam características de aroma consideravelmente distintas (LEE, 1996).

A extração de constituintes de aroma é efetuada através de pectinases e celulases. Em plantas, os componentes aromáticos estão frequentemente ligados a carboidratos na forma de glucosídeos. Estes compostos aromáticos (que formam a aglicona) variam na natureza como fenóis, lactonas, álcoois, ácidos e aldeídos. No caso do abacaxi, demonstrou-se que a aglicona é o 2,5-dimetil-4-hidróxi-3(2H)-furanona (DMHF), e este é o principal componente dos concentrados de aroma do abacaxi. O DMHF está de fato glicosidicamente ligado no abacaxi, e os níveis de DMHF são mais que duplicados quando o suco de abacaxi é tratado com β -glucosidade de amêndoa (LEE, 1996).

Precusores de aroma específicos são também formados pela ação de enzimas sobre proteínas e carboidratos. Por exemplo, proteases e amilases hidrolisam proteína e amido até aminoácidos simples e açúcares, respectivamente. Estes metabólicos podem ser usados em reações subsequentes que envolvem caramelização e reação de Maillard para gerar aromas particulares. A produção de certas carnes emprega esta tecnologia (LEE, 1996).

A maioria dos constituintes voláteis de muitas frutas e vegetais originam-se da ação de enzimas endógenas sobre precursores de aroma presentes no tecido. Assim, a ação da lipoxigenase nos ácidos graxos poli-insaturados linoléico e linolênico, seguida da ação da liase hidroperóxido, dá origem ao hexanal em maçãs (LEE, 1996).

3.2. Enzimas Microbianas

As enzimas comerciais usadas pela indústria podem ser obtidas a partir de fontes vegetais, animais, ou microbianas. Atualmente, os microrganismos se tornaram a maior

fonte de enzimas comerciais, mas as enzimas de animais e de plantas ainda são usadas para aplicações especiais. As enzimas são muito importantes nas indústrias de processamento de alimentos para produção de ingredientes e modificação de textura. Algumas das maiores aplicações industriais incluem produção de xarope de milho, clarificação de bebidas, cervejaria, panificação, tenderização de carne, e preparação de leite deslactosado. As vantagens do emprego de enzimas microbianas em processos industriais se devem (1) à existência de diferentes tipos de atividade enzimática, (2) à rapidez e estabilidade de produção através de fermentação microbiana de baixo custo, reproduzível e segura, e (3) às otimizações no rendimento que são obtidas muito mais facilmente com engenharia genética ou de proteínas do que a partir de culturas de plantas ou animais (LEE, 1996).

Diversos aspectos devem ser considerados na seleção de um microrganismo como fonte de uma enzima (LEE, 1996):

1. Deve ser capaz de gerar altos rendimentos de enzima no menor tempo de reação possível.
2. Se possível, enzimas extracelulares devem ser usadas porque elas são mais fáceis de serem produzidas e isoladas, ao passo que enzimas intracelulares exigem maiores gastos.
3. Um microrganismo “GRAS” que não produza nenhuma substância tóxica é preferível para facilitar a obtenção da aprovação da agência regulatória.
4. Deve crescer em meios com baixo custo contendo substratos baratos, já que o custo da matéria prima é a maior despesa em uma fermentação.

Com isso, a maior parte das enzimas utilizadas nos alimentos são produzidas por espécies de *Bacillus* e *Aspergillus*, que são capazes de secretar as enzimas e crescer em meios com baixo custo. As enzimas são vendidas tendo como base a atividade ao invés do peso ou volume e, desse modo, a estabilidade de uma preparação enzimática durante o armazenamento é de vital importância. As enzimas comerciais, exceto aquelas usadas em indústrias de aminoácidos e antibióticos, raramente são puras, mas as impurezas não interferem na atividade da enzima (LEE, 1996).

Dentre os microrganismos eucariotos, as espécies mais frequentemente conhecidas em trabalhos de biotransformação são dos subgrupos dos fungos, isto é, as leveduras e os

mofos. A maior parte dos fungos são microrganismos aeróbios que formam longos filamentos, células nucleadas conhecidas como *hifas*. Suas células são maiores do que as de bactérias, tendo entre 4 e 20 µm de largura e mais de 100 µm de comprimento. As hifas crescem entrelaçando-se para formar micelas. A classificação dos fungos é baseada mais nas características morfológicas do que em reações bioquímicas (LEE, 1996).

Mofos são fungos superiores com uma estrutura vegetativa chamada de *micélios*, que é um sistema de tubos altamente ramificado. Dentro desses tubos há uma massa móvel de citoplasma contendo muitos núcleos. Os longos e finos filamentos de células nos micélios são chamados de hifas. Os mofos são organismos sem motilidade que não contêm clorofila, e a reprodução, que pode ser sexuada ou assexuada, é realizada por meio de esporos. As classes mais importante de mofos utilizados industrialmente são *Aspergillus* e *Penicillium*. Os principais produtos destes organismos são antibióticos, ácidos orgânicos (ácido oxálico, ácido cítrico), e catalisadores biológicos (enzimas). Os fungos de importância biotecnológica estão sumarizados na TABELA 1 (LEE, 1996). A TABELA 2 mostra a importância dos fungos na indústria de alimentos (JOHNSON-GREEN, 2002).

TABELA 1 – Alguns fungos com reconhecida importância biotecnológica

Gênero	Produtos
<i>Mucor</i>	Ácidos orgânicos, enzimas
<i>Rhizopus</i>	Ácidos orgânicos, enzimas
<i>Blackeslea</i>	β-Caroteno
<i>Choanephora</i>	β-Caroteno
<i>Ashbya</i>	Riboflavina
<i>Cryptococcus</i>	Riboflavina
<i>Candida</i>	Ácido cítrico
<i>Rhodotorula</i>	Lipídeos
<i>Saccharomyces</i>	Etanol, vinho, cerveja
<i>Saccharomycopsis</i>	Proteínas
<i>Torulopsis</i>	Ácido cítrico
<i>Aspergillus</i>	Enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos
<i>Cephalosporium</i>	Antibiótico
<i>Penicillium</i>	Antibiótico, ácido orgânico, enzimas
<i>Fusarium</i>	Proteína, gordura

TABELA 2 – Importância dos fungos na indústria de alimentos

Fungo	Característica	Alimento Relacionado
<i>Agaricus bisporus</i> e outros	Formação do corpo do fruto	Cogumelo comestível
<i>Penicillium roquefortii</i> e <i>Penicillium camembertii</i>	Habilidade de crescer em queijo	Queijo azul e camembert
<i>Kluyveromyces lactis</i> e <i>Aspergillus nidulans</i>	Leveduras recombinantes com gene da quimosina	Produção de quimosina para queijo
<i>Mucor miehei</i> e outros <i>Kluyveromyces lactis</i>	Proteases aspárticas Produção de Lactase	Produção de queijo Diminuição da intolerância à lactose
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Produção de etanol	Bebidas fermentadas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Produção de CO ₂	Produtos de panificação
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Rápido crescimento	Uso direto em alimentos
<i>Aspergillus niger</i>	Produção de enzimas	Processamento de amido e sucos
<i>Aspergillus niger</i>	Produção de ácido cítrico	Ingrediente de alimentos
<i>Aspergillus oryzae</i>	Produção de aromas	Molho de soja

A maioria das reações químicas que ocorrem em células vivas são efetuadas em milisegundos ou menos, sob condições físicas relativamente limitadas. Esta alta taxa de metabolismo se deve à existência de catalisadores biológicos conhecidos como enzimas. As enzimas possibilitam que essas reações ocorram em condições fisiológicas que, de outra maneira, seriam muito lentas para manter a vida. As enzimas não somente contribuem essencialmente para as atividades celulares, mas também possuem uma grande aplicação em biotecnologia, especialmente na indústria de alimentos, para fabricação de queijo, cerveja e adoçantes, entre outros exemplos, e nas indústrias química e farmacêutica para síntese de aminoácidos e antibióticos (LEE, 1996).

Büchner, em 1897, foi quem primeiro extraiu enzimas ativas a partir de células vivas, demonstrando que estes catalisadores atuantes em organismos vivos também podem agir em sistemas *in vitro*, completamente independentes de qualquer processo de vida. Os estudos do primeiro isolamento com sucesso de uma enzima pura por Summer em 1926 revelaram que o material era uma proteína. O número de enzimas conhecidas aumentou rapidamente no século passado, atingindo quase 1500. Embora muitas enzimas exijam cofatores não protéicos ou grupos prostéticos, elas são proteínas ou polipeptídeos muito grandes, com peso molecular variando de 10000 até 500000. Seus grandes tamanhos

permitem que essas enzimas formem estruturas tridimensionais bem definidas e estabilizadas por interações entre os aminoácidos que as constituem. Estas conformações são decisivas para uma das mais importantes características das enzimas: a habilidade de reconhecer e agir especificamente sobre um ou poucos substratos, mesmo em uma mistura complexa destes (LEE, 1996).

Comparadas com reações químicas que requerem condições extremas tais como pHs ou temperaturas muito baixas ou muito altas, as enzimas atuam sob condições amenas, que são atrativas em relação tanto à economia de energia quanto à preservação do meio ambiente. Em alguns casos, sob um ponto de vista industrial, as enzimas podem conduzir reações não realizáveis por nenhum outro método (LEE, 1996).

As enzimas, que são catalisadores protéicos sintetizados por sistemas vivos, são importantes em catálises sintéticas ou degradativas. Com a ajuda de um imenso número de enzimas, os microrganismos são capazes de realizar uma grande variedade de etapas de reações químicas necessárias para o crescimento e manutenção das células (metabolismo). Muitos microrganismos sintetizam substâncias adicionais e, freqüentemente, complexas, os chamados *metabólitos secundários* tais como os aromas (LEE, 1996).

O reconhecimento das funções e utilidades das enzimas em algumas mudanças desejáveis em alimentos levou à produção em larga escala de enzimas comerciais. Entre as mais de 3000 enzimas conhecidas em animais, plantas, ou microrganismos, menos de 20 são produzidas industrialmente em larga escala para a produção de alimentos e intermediários. A maioria são hidrolases tais como amilases, celulasas, pectinases e proteases, que degradam substâncias poliméricas em moléculas simples (LEE, 1996).

As enzimas têm uma rica história de aplicação na indústria de alimentos. Elas são usadas na produção ou processamento de amidos, farinhas, queijos, sucos de frutas, adoçantes artificiais e carnes, e também são freqüentemente usadas nas indústrias de cerveja e vinho. As enzimas também são usadas na agricultura; por exemplo, fazendeiros usam silagem como alimento, facilmente estocado para as vacas. A fermentação reduz o pH

da silagem, o que inibe o crescimento de organismos deterioradores, tanto quanto o ar é eliminado da silagem. Celulases são comumente adicionadas à silagem a fim de aumentar a quantidade de açúcares fermentáveis (JOHNSON-GREEN, 2002).

Dentro da indústria de alimentos, as enzimas são particularmente úteis quando uma transformação química específica é requerida (JOHNSON-GREEN, 2002).

Teoricamente, as enzimas podem ser obtidas de animais, plantas ou microrganismos. Realmente, enzimas com padrões alimentícios são obtidas a partir destas fontes; proteases vegetais, por exemplo, são preferidas em relação a outras fontes para a tenderização de carne. Entretanto, para a maioria dos processos enzimáticos, enzimas microbianas são mais utilizadas, primeiramente porque elas são mais fáceis e baratas de serem obtidas. Uma das razões para isso é que muitas bactérias e fungos têm a habilidade natural de secretar enzimas. Outra razão para o uso de microrganismos é que muitos deles possuem uma longa história de aplicação segura na indústria de alimentos. A TABELA 3 mostra algumas aplicações para as enzimas microbianas. Estes microrganismos são também grandes produtores de uma larga quantidade de enzimas hidrolíticas. Isto permite que companhias produzam enzimas como misturas; por exemplo, uma companhia pode vender um produto caracterizado como “protease” que, na verdade, contem um número de proteases diferentes, freqüentemente produzidas pelo mesmo microrganismo. Misturas de enzimas relacionadas são comumente úteis, porque muitas aplicações de enzimas são descobertas em experimentos empíricos. Na maioria dos casos, o mecanismo exato da ação da enzima é desconhecido, tornando difícil a determinação da função específica das enzimas. Por esta razão, as companhias preferem vender enzimas como “categorias” (por exemplo, proteases) a produzir enzimas específicas (JOHNSON-GREEN, 2002).

TABELA 3 – Aplicações de enzimas para produção e processamento de alimentos

Enzima	Uso	Produto	Fonte da Enzima
α -Amilase	Processamento de amido	Dextrinas	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
β -Amilase	Cervejaria	Maltose	<i>B. subtilis</i>
Glucoamilase	Processamento de amido e cervejaria	Glucose	<i>Aspergillus niger</i>
Glucose isomerase	Produção de frutose	Frutose	<i>Streptomyces</i> spp.
Invertase	Processamento de doces	Glucose + frutose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pululanase	Processamento de amido	Amido desramificado	<i>Klebsiella</i>
Pectinase	Clarificação de sucos	Galacturonato	<i>Aspergillus oryzae</i>
Quimosina	Coagulação de leite	Queijo	<i>Kluyveromyces</i> spp
Renina	Coagulação de leite	Queijo	<i>Mucor miehei</i>
β -Glucanase	Cervejaria	β -Glucose	<i>A. niger</i>
Lipase	Fabricação de queijos	Compostos de aroma	<i>Rhizopus oryzae</i>
Lactase	Processamento de laticínios	Glucose + galactose	<i>A. niger</i>

Como os microrganismos usados para obtenção de enzimas devem ser seguros para produção de alimentos, normalmente é possível vender misturas de enzimas que não foram extremamente purificadas (em outras palavras, a purificação para remover compostos tóxicos é desnecessária). Isto diminui o custo da produção da enzima sem comprometer a qualidade ou segurança (JOHNSON-GREEN, 2002).

O mercado mundial de enzimas industriais está em torno de 1 bilhão de dólares; pelo menos 400 companhias fabricam enzimas, embora 12 delas dominem o mercado. A maior parte das enzimas produzidas por essas companhias provem de microrganismos e são usadas por cervejarias, produtores de vinho, processadores de amido, laticínios, e muitos outros processadores de alimentos e bebidas. Muitas aplicações não alimentícias de enzimas também existem, tais como o uso de proteases e lipases em produtos de limpeza de roupas (JOHNSON-GREEN, 2002).

3.3. Lipases

Em 1964, a *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry* (IUB) concebeu um esquema de classificação que trouxe uma ordem considerável para a situação caótica de então. As enzimas foram classificadas em seis grupos de acordo com a reação catalisada. Esta Comissão distribuiu um único código com quatro números e um nome sistemático para cada enzima. Todas as enzimas pertencem a um dos seis principais grupos. O primeiro número indica a classe principal (oxidoreductase, transferase, hidrolase, liase, isomerase ou ligase); o segundo, a subclasse; o terceiro, a sub-classe; e o quarto é um número individual da enzima dentro da classe (LEE, 1996).

De acordo com esta nomenclatura, as hidrolases (ou enzimas hidrolíticas) pertencem ao terceiro grupo de enzimas (TABELA 4), o número (EC 3.a.b.c) caracteriza uma enzima específica. Neste código, *a* se refere ao tipo de reação, *b* especifica a natureza do substrato e *c* é o número individual da enzima (KANERVA, 1996).

TABELA 4 – Classificação das hidrolases

Hidrolase	Exemplos Comuns Usados em Solventes Orgânicos
(EC 3.1) ação em ligações éster	<i>Hidrolases de ésteres carboxílicos:</i> Carboxilesterase (EC 3.1.1.1) Lipase (EC 3.1.1.3) Lipase de lipoproteína (EC 3.1.1.34)
(EC 3.2) ação em compostos <i>O</i> -, <i>N</i> - e <i>S</i> -glicosílicos	
(EC 3.3) ação em ligações éter	
(EC 3.4) ação em ligações peptídicas	
(EC 3.5) ação em ligações C–N (exceto peptídicas)	
(EC 3.6) ação em ácidos anidros	
(EC 3.7) ação em ligações C–C	
(EC 3.8) ação em ligações haleto	
(EC 3.9) ação em ligações P–N	
(EC 3.10) ação em ligações S–N	
(EC 3.11) ação em ligações C–P	

As hidrolases catalisam a quebra hidrolítica de C–O, C–N e C–C e outras ligações, incluindo P–O em fosfatos. Essas aplicações são muito diversas, abrangendo hidrólise de polissacarídeos, nitrilas, proteínas, lipídeos e esterificação de ácidos graxos. O termo hidrolase é incluído no nome sistemático, que contem o nome do substrato e o sufixo –ase (KRISHNA, 2002).

As hidrolases de ésteres e de peptídeos são as enzimas mais comumente usadas em solventes orgânicos. Além disso, biotransformações catalisadas por lipases são de valor especial, e as lipases mais importantes estão listadas na TABELA 5 (KANERVA, 1996).

TABELA 5 – Principais lipases usadas para biotransformações em solventes orgânicos

Fonte da Lipase	Abreviatura	Fornecedor
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LPL	Amano
	TE3285	Toyo Jozo
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipase PS	Amano
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipase P	Amano
	SAM-2	Fluka
<i>Pseudomonas sp</i>	Lipase AK	Amano
<i>Candida antarctica B</i>	SP 525	Novo
	Novozym 435	Novo
<i>Candida antarctica A</i>	SP 526	Novo
<i>Candida Cylindracea</i>	CCL	Sigma
	Lipase AY-30	Amano
	Lipase OF	Toyo Jozo
	Lipase MY	Meito Sangyo
<i>Mucor miehei</i>	Lipase MAP-10	Amano
	Lipozyme	Novo
<i>Chromobacterium viscosum</i>	CV	Biocatalysis
<i>Aspergillus niger</i>	Lipase A ou K-30	Amano
Pâncreas suíno	PPL	Sigma

Entre os motivos que fazem das lipases as enzimas mais usadas em sínteses orgânicas estão os fatos de não precisarem de coenzimas e de serem suficientemente estáveis em solventes orgânicos e temperaturas relativamente altas (SANTANIELLO *et al*, 1993).

Em eucariotos, as lipases (triacilglicerol acilhidrolases, E.C. 3.1.1.3) estão envolvidas em vários estágios do metabolismo de lipídeos, incluindo digestão, absorção e reconstituição de gorduras, e metabolismo de lipoproteínas. Em plantas, as lipases são encontradas em tecidos de reserva de energia (SHARMA *et al*, 2001).

Milhares de microrganismos diferentes foram isolados do solo e avaliados quanto a sua capacidade de produzir lipases e 20% destes mostraram-se úteis em tal aplicação (JAEGER *et al*, 2002).

A maioria das lipases são serina-hidrolases contendo um resíduo de serina no seu sítio ativo, como principal resíduo da tríade clássica Ser...His...Asp (ou Glu). As estruturas tridimensionais de poucas delas foram descritas (FIGURA 1) (ALCÁNTARA *et al*, 1998).

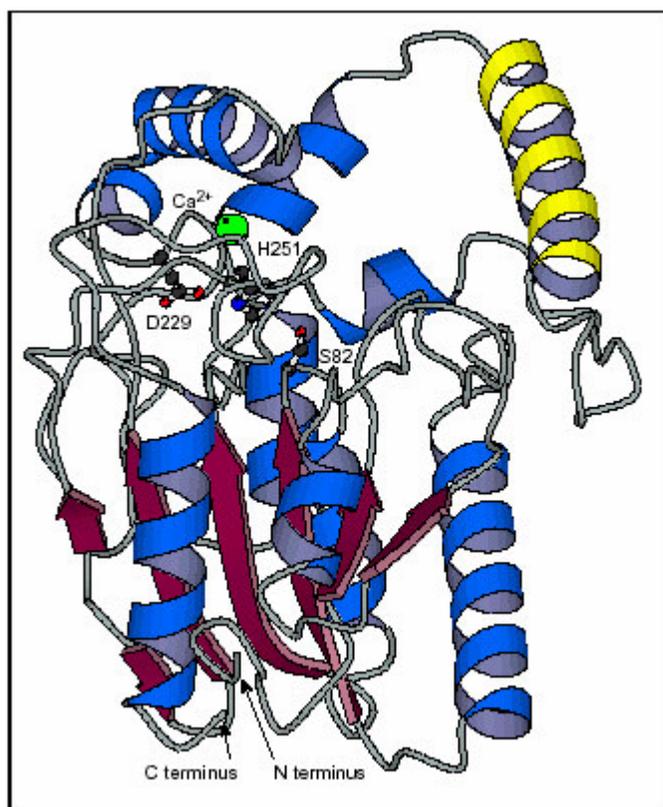


FIGURA 1 – Estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* em um modelo construído com coordenadas de raio-X. Os resíduos do sítio ativo Ser82, Asp229 e His251 estão destacados, e a posição potencial de um íon Ca⁺² está indicado por uma bola verde (JAEGER *et al*, 1998)

As lipases apresentam aplicações promissoras em processamentos químicos orgânicos, formulações de detergentes, sínteses de biosurfactantes, indústria óleo-química, indústria de laticínios, fabricação de papel, nutrição, cosméticos e processamentos farmacêuticos. O desenvolvimento de tecnologias baseadas em lipases para a síntese de novos compostos está rapidamente expandindo o uso destas enzimas. Um número crescente de lipases com propriedades adequadas está se tornando disponível. A maior aplicação comercial para as lipases hidrolíticas está no seu uso em produtos para lavagem de roupa. Este mercado chega a 32% de todas as vendas de lipases. A lipase para esse fim deve ser termoestável e permanecer ativa no ambiente alcalino típico de uma máquina de lavar. Estima-se que 1000 toneladas de lipases são adicionadas a aproximadamente 13 bilhões de toneladas destes produtos todos os anos (SHARMA *et al*, 2001).

Outras novas aplicações biotecnológicas das lipases estabelecidas com sucesso são a síntese de biopolímeros e de biodiesel (JAEGER *et al*, 2002).

Biopolímeros como polifenóis, polissacarídeos e poliésteres apresentam um alto grau de diversificação e complexidade. Além disso, estes compostos estão recebendo cada vez mais atenção por serem biodegradáveis e produzidos a partir de fontes naturais renováveis. E lipases e esterases são usadas como catalisadores de sínteses poliméricas (JAEGER *et al*, 2002).

O biodiesel é uma fonte alternativa de energia para o transporte público, que tem sido produzida quimicamente usando-se óleos de várias plantas. O biodiesel é originário de fontes naturais renováveis e, ao mesmo tempo, reduz a produção de óxidos de enxofre. A conversão dos óleos vegetais para ésteres metílicos ou de outros álcoois de cadeia curta pode ser catalisada por uma única reação de transesterificação empregando lipase em solventes orgânicos (JAEGER *et al*, 2002).

LINKO *et al* (1998) demonstraram que lipases podem ser utilizadas como biocatalisadores na produção de compostos biodegradáveis. O oleato de butila foi produzido com esterificação direta do butanol com ácido oléico para diminuir a viscosidade

do biodiesel durante o inverno. A alcoólise enzimática de óleos vegetais sem adição de solvente orgânico foi investigada. Também demonstrou-se a obtenção de uma mistura de ésteres de 2-metil-1-hexila com um bom rendimento por transesterificação enzimática de ácidos graxos de óleo de semente de colza para uso como solvente. Finalmente, a descoberta que lipases também podem catalisar síntese de ésteres e reações de transesterificação em sistemas de solventes orgânicos abriu a possibilidade da produção de poliésteres catalisada pela enzima. Usando lipase como biocatalisador, obteve-se, por esterificação direta do 1,4-butanodiol com ácido sebácico, poliésteres com massa molar média da ordem de $56000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ou maior, e uma massa molar máxima por volta de $130000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

3.4. As Lipases na Indústria de Alimentos

As enzimas são aplicadas na produção de alimentos e seus ingredientes há séculos com fundamentos puramente empíricos e pouco conhecimento dos princípios básicos envolvidos. Os primeiros sistemas enzimáticos dedicados ao processamento de alimentos foram desenvolvidos somente na segunda metade do século passado como resultado de uma maior compreensão da estrutura e função das macromoléculas biológicas (VULFSON, 1996).

As lipases são auxiliares cada vez mais importantes no processamento de alimentos. As duas maiores aplicações das lipases são: (1) síntese específica de lipídeos com ácidos graxos desejados, e (2) formação de ácidos graxos voláteis para melhorar o aroma da manteiga, queijo e vários outros alimentos. A primeira aplicação faz uso das capacidades sintéticas das lipases, e a segunda faz uso das propriedades hidrolíticas destas enzimas. A síntese de lipídeos é realizada através da transesterificação. Quando um lipídeo simples é exposto a um ácido graxo (desejado) e lipase, a enzima catalisará a substituição de um ou mais ácidos graxos pelo ácido graxo mais desejável. Algumas lipases catalisam esta reação em pontos específicos na molécula de glicerol (por exemplo, uma lipase 2-específica troca ácidos graxos apenas no segundo carbono do glicerol). Outras lipases (por exemplo, as produzidas por *Candida rugosa*, um organismo “GRAS”) não são específicas e podem

formar diversos lipídeos diferentes. As lipases de *C. rugosa* são particularmente populares porque podem trocar um grande número de ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia e graus de insaturação (JOHNSON-GREEN, 2002).

Então, as lipases catalisam ambas as reações de hidrólise e síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (FIGURA 2) (JAEGER *et al*, 1998).

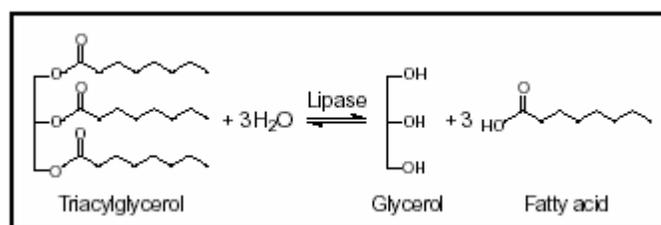


FIGURA 2 – Ação catalítica das lipases. Um triglicerídeo pode ser hidrolisado para formar glicerol e ácidos graxos, ou a reação reversa (síntese) pode combinar glicerol e ácidos graxos para formar o triglicerídeo

Dessa forma, a transesterificação gera uma modificação precisa na estrutura de lipídeos. Isto, às vezes, é usado para produzir tipos específicos de detergentes e biossurfactantes. Há também um grande potencial para melhorar os aspectos nutricionais de óleos vegetais, porque pode ser usada para aumentar o conteúdo de ácidos graxos, tais como o ácido linolênico, que são geralmente benéficos para a saúde humana. Esta tecnologia pode também ser usada para modificar pontos de fusão, solubilidade, e outras propriedades físicas de óleos comestíveis (JOHNSON-GREEN, 2002).

Nem todas as lipases microbinas são específicas, catalisando reações em todas as posições do glicerol. Estes tipos de lipases são usadas como catalisadores para interesterificação de misturas de triglicerídeos, produzindo uma distribuição aleatória dos grupos de ácidos graxos. Os sistemas de reação usados para interesterificação de triglicerídeos consistem da lipase e uma quantidade limitada de água dispersa em solventes orgânicos (meio não aquoso). Por causa da restrição da quantidade de água no sistema de reação, a hidrólise é limitada e a interesterificação se torna a reação dominante (LEE, 1996).

Para “convencer” as lipases a atuarem como enzimas sintéticas, deve-se diminuir o conteúdo de água (até menos que 5%). Os solventes orgânicos são muito usados para alcançar este objetivo, embora diversas estratégias de imobilização possam ser utilizadas se o uso de solventes orgânicos é indesejado. Quando as lipases estão presentes na interface líquido-orgânica, elas se comportam como enzimas sintéticas, primeiramente por causa da menor concentração de água (a água é um reagente em reações hidrolíticas). Estes são os sistemas parcionados de solvente (JOHNSON-GREEN, 2002).

A função hidrolítica das lipases é também útil porque pode ser usada para formação de ácidos graxos livres, que freqüentemente contribuem para o aroma de alimentos. Na fabricação de queijo, as lipases podem encurtar o período de maturação e melhorar o aroma do produto final (JOHNSON-GREEN, 2002).

Algumas propriedades e aplicações de lipases comerciais estão descritas na TABELA 6.

TABELA 6 – Algumas propriedades e aplicações de lipases comerciais

Fonte	pH Ótimo	Temperatura Ótima (°C)	Aplicações
Pâncreas	8,0	50	Enzimas digestivas
<i>Aspergillus niger</i>	7,0	45	Interesterificação de gorduras
<i>Mucor miehei</i>	7,5	50	Fabricação de queijo e aromas de manteiga
<i>Rhizopus delemar</i>	5,6	35	Aceleração da maturação de queijos; queijo com enzima modificada
<i>Candida cylindracea</i>	7,5	50	Fabricação de sabão

Com relação a qual método é o mais economicamente atrativo, não há uma resposta simples. Vários fatores estão envolvidos e o método escolhido irá variar de um produto para o outro. O preço e a facilidade de reciclagem do agente utilizado são obviamente fatores críticos. Nesse contexto, as lipases se destacam por serem reconhecidamente de preço não muito caro (SHELDON, 1996).

Uma forma de produzir ésteres naturais é pela exploração das capacidades sintéticas de certas enzimas conhecidas como lipases (GATFIELD *et al*, 1995).

Outra vantagem de resoluções cinéticas enzimáticas, empregando lipases em meio orgânico, é que elas podem ser usadas em altas concentrações de substratos (SHELDON, 1996).

Normalmente, os sistemas enzimáticos são operados em ambientes aquosos. Mas, recentemente, se tornou evidente que muitas enzimas e até certas células podem atuar em solventes apolares ou orgânicos como o hexano. Embora esses sistemas sejam chamados de “não aquosos”, tecnicamente, as enzimas devem estar em sistemas bifásicos (solvente orgânico/água) com o componente aquoso estando em pequena quantidade, podendo esta ser até mesmo uma camada monomolecular sobre a enzima. Este conhecimento certamente beneficiou a produção biotecnológica de aromas por uma série de razões. Já que muitos aromas ou seus precursores têm limitadas solubilidades em água, o uso de solventes apolares ao invés de água pode permitir conversões mais eficientes devido à melhor interação enzima/substrato. Mais especificamente, algumas reações só podem ocorrer numa significativa extensão em ambientes apolares, tal como acontece com a esterificação por lipases. Em condições normais, no caso da conversão por lipases, os ésteres são hidroliticamente convertidos em ácido e álcool. Em certos solventes apolares essa reação pode ser revertida devido à preferência da enzima pela síntese do éster (ARMSTRONG *et al*, 1989).

A razão mais comum para o uso de meios orgânicos para reações enzimáticas é que o substrato a ser convertido é pouco solúvel em água. A adição de uma quantidade moderada de solvente orgânico é uma maneira direta de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e, com isso, tornar a reação possível. Tanto os solventes miscíveis em água quanto os não miscíveis podem ser usados. No segundo caso, obtém-se um sistema bifásico com a enzima e outras substâncias hidrofílicas ficando na fase aquosa enquanto os substratos hidrofóbicos e produtos, na fase orgânica (FIGURA 3). Para que ocorra a bioconversão, os substratos devem ser transferidos para a enzima na fase aquosa. Depois da

reação, os produtos hidrofóbicos são transferidos de volta para a fase orgânica (ADLERCREUTZ, 1996).

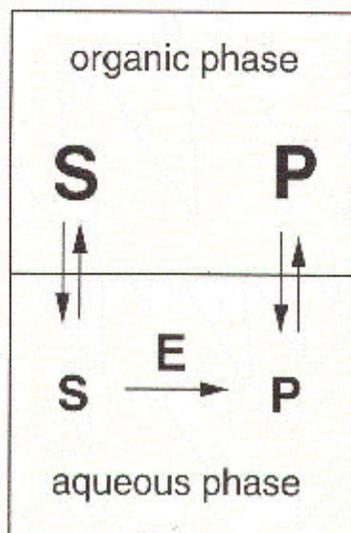


FIGURA 3 – Apresentação esquemática de uma conversão enzimática em um sistema bifásico. S = substrato, P = produto e E = enzima

Várias lipases são capazes de sintetizar ésteres a partir de álcoois e ácidos sob certas condições. Determinadas lipases microbianas, como por exemplo a de *Aspergillus niger*, sintetizam ésteres de terpenos tais como propionatos e butiratos de álcoois terpênicos primários, como o citrônolol. Este método foi estendido para outras áreas da indústria de alimentos e foi descrito para a interesterificação de gorduras usando preparações de lipases imobilizadas solúveis. É então possível alterar a composição de ácidos graxos em triglicerídeos de ocorrência natural para obter gorduras com diferentes pontos de fusão (GATFIELD, 1986).

A enzima possui uma grande especificidade por substrato. O grau de esterificação alcançado depende, entre outros fatores, do comprimento da cadeia do ácido carboxílico. Os ácidos propiônico e acético são substratos muito pobres e não sofrem esterificação numa extensão considerável em determinadas condições. A adição de ácidos com maior peso molecular é benéfico e, sob certas condições, altas taxas de propionatos são obtidas, provavelmente por mecanismos de transesterificação. Usando a técnica enzimática é

possível se conduzir sínteses preparativas de ésteres de aroma em escala relativamente grande, usando matérias primas naturais como substrato. Também é possível produzir certos ésteres terpênicos (GATFIELD, 1986).

A capacidade sintética da enzima de *Mucor miehei* foi examinada a baixas temperaturas. A taxa e o grau de esterificação determinados a -22°C foram apenas um pouco menores do que aqueles determinados em temperatura ambiente. Recentemente foi demonstrado que a lipase pancreática de suínos pode não somente resistir a aquecimento a 100°C por muitas horas, como também possui alta atividade catalítica a esta temperatura. Por esses resultados, deduz-se que certas enzimas podem ser usadas sob condições severas para realizar novos tipos de reações. Espera-se que este novo tipo de tecnologia, usando por exemplo enzimas imobilizadas e possivelmente solventes orgânicos, seja mais estudado e, com isso, mais utilizado na área de aromas. Um exemplo relatado é a síntese enzimática do aroma de uma mistura de ésteres de etila a partir de gordura de manteiga usando a lipase de *Candida cylindracea*. Ambas as gorduras de manteiga hidrolisada e não hidrolisada sofreram considerável esterificação com etanol na presença da lipase. Os perfis dos ésteres de etila indicaram que a enzima tem uma alta especificidade pelos ácidos butírico e capróico e que este último teve taxa de esterificação mais baixa (GATFIELD, 1986).

GUBICZA *et al* (2000) desenvolveram um novo processo em larga escala para produção de ésteres de aroma de baixo peso molecular em solvente orgânico. Foram criadas soluções para inibição pelo substrato e pelo produto. O excesso de água produzida durante o processo foi continuamente removido por destilação hetero-azeotrópica e os ésteres foram produzidos com rendimentos acima de 90%.

LABORET *et al* (1995) demonstraram que a lipase de *Mucor miehei* pode ser usada para catalisar a síntese de propionato de metila em condições não imobilizadas e em hexano saturado com água. Foi possível atingir até 96% de rendimento na biossíntese do éster depois de 2,30 horas, reforçando a capacidade operacional da enzima livre em meios orgânicos modificados. Este método constitui um caminho fácil para produção de propionato de metila usando substratos e enzimas naturais disponíveis.

A lipase extraída do microrganismo psicotrófico, *Pseudomonas fluorescens* P38 foi capaz de realizar a síntese do éster de aroma caprilato de metila em baixas temperaturas (TAN *et al*, 1995).

Segundo MACEDO (1997), a lipase de *Rhizopus* sp apresenta grande habilidade em esterificar o álcool citronelol, principalmente na síntese de ésteres de baixo peso molecular, empregados como formadores de aroma em alimentos, tais como acetato e butirato de citronelila.

A esterificação do ácido oléico por etanol usando lipases de *Rhizopus niveus* e *Mucor miehei* como biocatalisadores foi avaliada em sistemas microaquosos, bifásicos (*n*-hexano-água) e bifásicos com surfactante, contendo diferentes quantidades de água. Os resultados mostraram que a esterificação catalisada pela lipase de *R. niveus* no sistema microaquoso (atividade de água 0,75) é a melhor opção do ponto de vista cinético (TWEDDELL *et al*, 1998).

A lipase de *Pseudomonas fragi* modificada com polietileno glicol, solúvel e ativa em solventes orgânicos tais como benzeno e hidrocarbonetos clorados, foi usada para sintetizar ésteres de álcoois terpênicos a partir de várias combinações de álcoois (citraonelol, geraniol, farnesol e fitol) e ácidos carboxílicos (acético, propiônico, *n*-butírico e valérico) em benzeno a 25°C com altas taxas de rendimento (NISHIO *et al*, 1987)

3.5. Catálise em Meio Livre de Solvente Orgânico

O uso de enzimas em meios com pouca água teve um progresso significativo nas últimas duas décadas. Esta evolução começou com a investigação de sistemas predominantemente aquosos que possuíam pequenas quantidades de solventes orgânicos miscíveis em água, continuou com o desenvolvimento de misturas reacionais bifásicas (aquosa-orgânica), dispersão de uma fase aquosa em uma grande quantidade de solvente, e finalmente levou à introdução e uso de suspensões de enzimas em solventes orgânicos

praticamente anidros. Esta última etapa foi especialmente importante porque demonstrou conclusivamente que muito pouca água é realmente necessária para as enzimas manterem suas conformações cataliticamente ativas. Entretanto, se isto é verdade, seria tecnologicamente atrativo um passo a mais na tentativa de dispensar os solventes, com a condução da reação enzimática em uma mistura dos próprios substratos. Este método, se praticável, combinaria a precisão das catálises biológicas com os altos níveis de produtividade alcançados pelos melhores métodos convencionais (VULFSON *et al.*, 1996).

É interessante que se realize a síntese de ésteres de aroma por lipases em meio livre de solvente orgânico. Essa escolha pode ser justificada com base nas considerações de vários autores sobre as vantagens e desvantagens da síntese em solventes orgânicos. Utilizando sistemas livres de solventes não se corre riscos de desnaturação da enzima pelo solvente; não se geram descartes de difícil e onerosa reciclagem; a recuperação do produto é mais fácil e menos dispendiosa; não haverá limitação de temperatura de operação por parte dos reagentes; os sistemas são mais simples sem problemas de evaporação dos solventes além de considerarmos que os ésteres sintetizados sem a presença de solventes orgânicos poderão ser utilizados em alimentos sem maiores restrições (MACEDO, 1997).

Ésteres de citronelila com ácidos de cadeia curta foram sintetizados com uma nova lipase de *Rhizopus* sp. As reações de esterificação direta e transesterificação foram realizadas para produzir acetato e butirato de citronelila em sistema livre de solvente e com n-hexano. Os meios de reação foram conduzidos a 45°C com concentração equimolar de substratos: ácido (esterificação direta) ou éster (trans-esterificação) e álcool. Apenas o butirato de citronelila foi sintetizado por esterificação direta com rendimentos de 95 a 100% depois de 24 horas de reação, com ou sem n-hexano. O acetato de citronelila foi sintetizado por transesterificação com acetato de etila e citronelol, obtendo rendimento de 58% em 48 horas e 48% de conversão para reação entre acetato de butila e citronelol. Estes resultados sugerem que o tamanho da cadeia alifática do doador acila foi importante para taxa de conversão. Ácidos com mais de dois carbonos demonstraram ser substratos melhores para lipase de *Rhizopus* sp. A reação de transesterificação apresentou comportamento diferente, sendo o substrato de éster com quatro carbonos melhor do que o

com seis carbonos para a síntese do acetato de citronelila (MACEDO, LOZANO *et al*, 2003).

MACEDO (1997) demonstrou que a lipase de *Rhizopus* sp possui grande potencial de síntese dos ésteres acetato, propionato e butirato de isoamila em sistema livre da adição de solvente orgânico e de água.

A lipase de *Candida antarctica* catalisou a esterificação do citronelol com altos rendimentos (74%) em meio livre de solvente. O uso de dessecadores causou um aumento de 10% no rendimento e o consumo do excesso de substrato pela adição de quantidades calculadas de ácido acético levaram a acetato de citronelila 80% puro (FONTEYN *et al*, 1994).

3.6. Enantioseletividade

As lipases têm um importante papel entre as várias enzimas e microrganismos empregados como biocatalisadores em sínteses orgânicas. A extensão das suas aplicações, além do tradicional campo da modificação de lipídeos, se deve principalmente às suas habilidades de aceitar um amplo espectro de substratos diferentes dos triglicerídeos, de catalisar reações não somente em meio aquoso, mas também em meio orgânico, e de diferenciar entre enantiômeros, caso substratos quirais forem empregados. Baseado nessas características, as lipases têm sido largamente utilizadas na área de química de aromas para síntese de aromas naturais, tais como ésteres e para obtenção de compostos de aroma quirais em formas opticamente puras, através de resoluções cinéticas de precursores racêmicos (ENGEL, 1991).

Estas formas são de interesse devido a diferentes razões: (1) se estas substâncias são obtidas em formas opticamente enriquecidas ou puras, propriedades analíticas podem ser avaliadas, permitindo que se estabeleça, por exemplo, suas configurações absolutas ou que se determine a ordem de eluição numa cromatografia quiral; (2) depois da separação de

enantiômeros, é possível a caracterização de suas respectivas propriedades sensoriais; (3) finalmente, preparações “biossintéticas” de compostos em razões enantioméricas são altamente versáteis como ingredientes de alimentos (LUTZ *et al*, 1991).

Apesar da quiralidade não ser um pré-requisito para a atividade biológica, diferenças são usualmente observadas nas atividades dos enantiômeros individuais quando moléculas bioativas contêm um centro estereogênico. Isto é um fenômeno geral e aplica-se a todas as substâncias bioativas, tais como as farmacêuticas, inseticidas, herbicidas, aromas e fragrâncias. O crescente reconhecimento da importância da quiralidade em conjunto com a atividade biológica levou à pressão por um mercado de farmacêuticos quirais, como por exemplo, enantiômeros simples. Por essa razão, houve um aumento na demanda de métodos economicamente viáveis para síntese de compostos enantiomericamente puros (SHELDON, 1996).

ENGEL *et al* (1989) demonstraram a formação de enantiômeros opticamente puros de álcoois secundários alifáticos e hidróxi-ésteres usando oxiredutases da levedura da cerveja. Também estudaram a redução de metil cetonas e a subsequente metabolização enantioselectiva por *Penicillium citrinum* como reações modelo para racionalizar as proporções de enantiômeros de álcoois secundários em sistemas naturais.

Neste mesmo trabalho também demonstrou-se que a combinação de várias aproximações analíticas e a seleção de sistemas modelo apropriados podem acrescentar informações valiosas ao nosso conhecimento sobre as rotas e enzimas envolvidas na biossíntese de compostos voláteis quirais. Algumas dessas técnicas necessitam de melhoramentos adicionais. A adição de precursores em concentrações comparáveis àquelas presentes em sistemas vegetais e de microrganismos seria possível. A investigação da enantioselectividade de enzimas deve ser aprofundada e, eventualmente, não apenas de enzimas disponíveis no mercado ou facilmente acessíveis em microrganismos, mas também aquelas ativas em sistemas vegetais.

Ainda segundo ENGEL *et al* (1989) o conhecimento sobre as propriedades estereoquímicas das enzimas que participam da biossíntese de compostos voláteis quirais não é apenas de interesse por um ponto de vista estritamente científico; é também uma base essencial para um futuro melhoramento de aromas naturais através da engenharia genética de plantas e microrganismos.

Nos anos 60 demonstrou-se a síntese de gama- e delta-lactonas opticamente ativas por redução microbiológica. Outro exemplo do potencial da biotecnologia nessa área é a produção de L-glutamato opticamente ativo para ser usado como o melhorador do aroma glutamato monossódico por meios microbiológicos (ARMSTRONG *et al*, 1989).

Transformações de precursores em compostos de aroma podem rapidamente trazer vantagens para processos biotecnológicos. Uma área onde a biotransformação melhoraria os seus rendimentos e simultaneamente resultaria num produto final opticamente ativo envolve a produção de L-mentol. Normalmente, o mercado desse terpeno é de aproximadamente 3000 toneladas por ano e é constituído de extração de fontes vegetais. Na hortelã-pimenta, a “maturação” do óleo ocorre entre o início da floração e a florada e, neste período, somente uma pequena porção (40%) de L-mentona é convertida em L-mentol. Foi proposto que a L-mentona poderia ser extraída da planta nos seus níveis máximos e convertida por deidrogenase de diversos microrganismos. Vários sistemas empregando a bactéria *Pseudomonas putida* e a levedura *Rhodotorula minuta* resultaram em L-mentol com 100% de atividade ótica. A produção de complexos de aroma onde possivelmente centenas de substâncias individuais contribuem para uma impressão global é altamente adequada para biotransformação. A criação de sistemas de aroma complexos pela adição de compostos individuais seria muito difícil, senão impossível. Como consequência disso, a adição exógena de células e/ou enzimas para acelerar o processo de maturação de aromas de produtos alimentícios é uma realidade comercial atraente (ARMSTRONG *et al*, 1989).

Exemplos da importância da seleção de enantiômeros na área de aromas podem ser os seguintes casos. Os ácidos metilados na posição 2 e seus ésteres são importantes constituintes que contribuem para o aroma de vários sistemas naturais, especialmente em

frutas. Foi demonstrada quase que uma presença exclusiva do enantiômero (S) do ácido 2-metil-butanóico em abacaxi e morango. A determinação do *threshold* e o cálculo das unidades de odor revelaram um papel fundamental do (S)-2-metil-butanoato de etila no aroma de abacaxi. Outra evidência da importância da quiralidade pode ser observada com o álcool terpênico linalol. Sua forma S(+) apresenta odor doce enquanto que a S(-), lavanda (BERGER, 1985).

SOSTMANN *et al* (1995) isolaram e purificaram três enzimas do extrato bruto pancreático suíno e estudaram suas capacidades de catalisar a esterificação enantioselectiva em meios não aquosos com ácido butírico e 2-pentanol. A lipase pancreática suína purificada (PPL, EC 3.1.1.3) não apresentou nenhuma atividade de esterificação. A esterase de colesterol purificada (CE, EC 3.1.1.13) demonstrou ter atividade catalítica com baixo excesso enantiomérico (ee). A terceira proteína purificada possuiu atividade de esterificação com altos valores de ee (>95%).

O uso de micélio seco de *Rhizopus oryzae* como biocatalisador para produção de ésteres em solvente orgânico foi estudado por GALDOLFI *et al* (2001). Micélios com uma significativa atividade de esterase foram produzidos quando empregou-se diferentes Tweens (20, 40, 60 e 80) como principal fonte de carbono para o crescimento. O micélio seco da cepa de *Rhizopus oryzae* utilizada demonstrou ser eficiente na síntese de diferentes ésteres de aroma (acetato e butirato de hexila, acetato e butirato de geranila) partindo-se do álcool e do ácido correspondentes. Além disso, a esterificação da mistura racêmica de 2-octanol e ácido butírico procedeu-se com alta enantioselectividade (*R*-éster produzido com excesso enantiomérico $\geq 97\%$) quando utilizou-se *Rhizopus oryzae* CBS 112.07 e *Rhizopus oryzae* 260.28.

TORRES *et al* (1999) desenvolveram dois procedimentos enzimáticos para obtenção de regioisômeros diferentes de monoésteres do ácido málico. Estes procedimentos são baseados nas diferenças de reatividade dos grupos carboxílicos do ácido málico na presença da lipase de *Candida antarctica*. Na reação de esterificação, a polaridade do solvente orgânico teve uma grande influência na distribuição do produto; meios mais

apolares aumentaram o rendimento. Inicialmente, a reação de síntese seletiva dos monoésteres exigiu adição de água no solvente. Entretanto, a seletividade e a conversão do processo aumentaram com a remoção da água depois de 24 horas de reação. Os isômeros dos monoésteres de ácido málico podem apresentar propriedades desejáveis que os tornam úteis como umectantes ou como emulsificantes em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos.

A separação de enantiômeros usando fases estacionárias quirais ocorre porque as interações entre os enantiômeros e a fase estacionária resultam na formação de complexos de associação diastereoméricos transientes que possuem diferentes entalpias de sorção e, com isso, diferentes características de retenção (POOLE, 1991).

As primeiras fases quirais introduzidas em cromatografia gasosa eram ésteres de aminoácidos, dipeptídeos, diamidas. Em geral, essas fases exibiam pouca estabilidade térmica e não são frequentemente usadas atualmente. O interesse e o progresso reais em separações quirais veio após a preparação de fases de diamida ligadas num esqueleto de polisiloxano. Estas fases eram termicamente estáveis e podiam ser usadas na produção de colunas abertas tubulares eficientes. Estas colunas têm sido usadas para resolver um grande número de derivados enantioméricos de aminoácidos, aminoálcoois, aminas, hidróxi-cetonas, 2-hidróxi-ácidos e seus ésteres, 3-hidróxi-ácidos, lactonas e sulfóxidos. Elas permitiram pela primeira vez a resolução de todos os enantiômeros dos aminoácidos protéicos comuns e dos seus ésteres derivados de isopropil N-pentafluoropropionilamida em uma separação simples. Também foram desenvolvidas técnicas para análise quantitativa de aminoácidos (usando o D-enantiômero não natural). A fase de poli-dimetilsiloxano contendo L-valina-S- α -feniletílamida pode ser facilmente usada num método de análise configuracional de açúcares, bem como para a resolução de enantiômeros de aminoácidos e aminoálcoois. Várias cetonas, produtos farmacêuticos, álcoois e hidróxi-ácidos também já foram resolvidos nessa fase. Uma fase quiral de polisiloxano com substituintes de tartramida foi usada para separação de enantiômeros capazes de formarem pontes de hidrogênio com a fase estacionária, tais como enantiômeros contendo os grupos funcionais carboxila, hidroxila ou amina (POOLE, 1991).

Recentes tentativas do uso de ciclodextrinas (CDs) e seus derivados simples, como fases estacionárias quirais em cromatografia gasosa, encontraram um sucesso limitado devido às suas propriedades físicas desfavoráveis. Muitos compostos são sólidos cristalinos com altas temperaturas de fusão ou decomposição, o que dificulta suas aplicações como fases estacionárias em cromatografia gasosa. Desde 1988, o interesse em ciclodextrinas se intensificou com o desenvolvimento de novas tecnologias, que diminuíram suas limitações físicas, e alcançou-se um sucesso espetacular na resolução de um grande número de compostos enantioméricos de baixo peso molecular incluindo álcoois, amins, aminoácidos, epóxidos, ácidos carboxílicos, ésteres, lactonas, éteres, haloalcanos e hidrocarbonetos. Muitos desses compostos são difíceis ou impossíveis de serem resolvidos por outros meios e são economicamente importantes na avaliação das propriedades de perfumes, aditivos de alimentos e aromas, e como blocos construtores sintéticos quirais para moléculas mais complexas. Algumas ciclodextrinas peralquiladas são líquidos viscosos que podem recobrir diretamente a superfície do vidro. As moléculas de glicose que formam as ciclodextrinas possuem três grupos hidroxila não envolvidos na formação da cavidade desses carboidratos, uma hidroxila primária localizada na base estreita do tronco (posição 6) e duas hidroxilas secundárias localizadas na boca mais larga (posições 2 e 3). Por causa de diferenças na sua reatividade natural e fatores estéricos, uma derivação completa ou seletiva não é fácil de ser obtida. Esses produtos têm uma boa estabilidade térmica. Outra solução é a dissolução da ciclodextrina derivada numa fase estacionária convencional. Considerações sobre ponto de fusão e transição de fase passam a não ser importantes para ciclodextrinas dissolvidas e colunas de alta eficiência podem geralmente ser produzidas. Recentemente, fases de ciclodextrinas permetiladas ancoradas em polisiloxano têm sido imobilizadas em superfície de sílica fundida (POOLE, 1991).

As ciclodextrinas têm sido os agentes quirais mais utilizados para a cromatografia direta. Não apenas as CDs nativas são usadas em separações quirais, mas também seus vários derivativos (mais hidrofílicos ou mais hidrofóbicos) (JUVANCZ *et al*, 2002).

Nos últimos anos, enantiômeros têm sido separados por colunas cromatográficas preparadas com α , β e γ -CDs peralquiladas dissolvidas em polisiloxanos e recobertas

dentro de tubos capilares de vidro ou sílica fundida (FIGURA 4). Enantiômeros de compostos polares (álcoois, dióis, ácidos carboxílicos) podem ser separados sem prévia derivatização, em tubos de sílica fundida inerte recoberta com fases polisiloxano/ciclodextrina. Mais ainda, alcanos e cicloalcanos racêmicos são separados por tais fases. Conseqüentemente, fases estacionárias de ciclodextrina têm a capacidade de separações quirais, com aplicações nos campos da agricultura, alimentos, aromas, bebidas, amostras ambientais, petroquímicos, produtos naturais e químicos (SUPELCO – Bulletin 877, 1998).

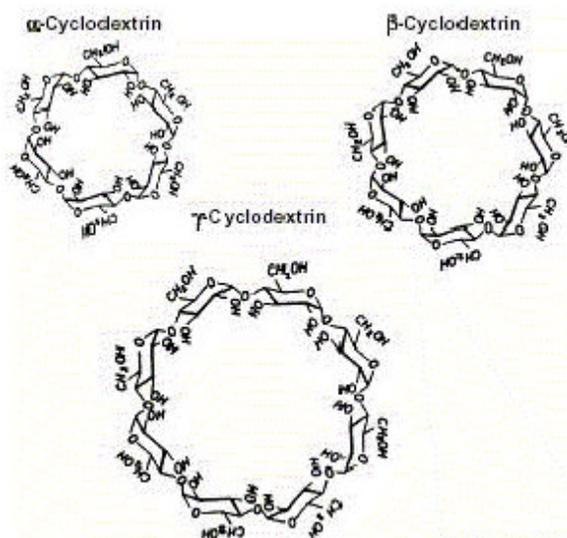


FIGURA 4 – Ciclodextrinas (escala aproximada)

As CDs possuem numerosos centros quirais – cinco em cada unidade de glicose. Em uma unidade de glicose, cada centro quiral tem uma orientação distinta e está a uma distância diferente do seu átomo vizinho. Além disso, os formatos das unidades de glicose não se repetem de uma unidade para a outra, então a β -CD possui 35 centros de reconhecimento quirais distintos (JUVANCZ *et al.*, 2002).

O mecanismo pelo qual colunas com ciclodextrinas permetiladas separam enantiômeros não é completamente entendido. As separações são, em parte, devido à formação de complexos de inclusão geometricamente dissimilares nas ciclodextrinas. Interações por pontes de hidrogênio também estão envolvidas na enantioseletividade. É

postulado que o número de unidades de glicose e o tamanho da cavidade da ciclodextrina têm um papel crítico nas diferentes interações com os enantiômeros. Isto pode ser visualizado, por exemplo, quando um enantiômero forma predominantemente um complexo de inclusão assimétrica dentro da cavidade da β -CD. O outro enantiômero, forçado por razões geométricas a formar complexos completamente diferentes, começa a se separar do primeiro enantiômero como resultado da diferença do tempo gasto por cada um na interação com a macromolécula de β -CD (FIGURA 5) (SUPELCO – Bulletin 877, 1998).

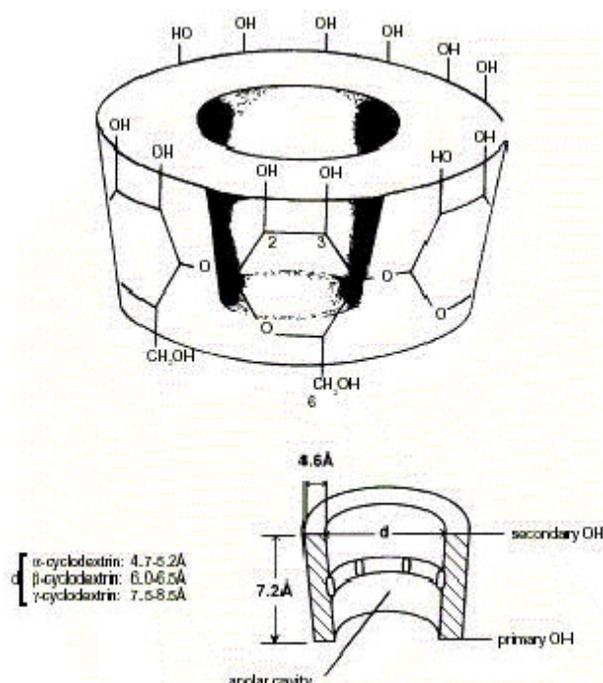


FIGURA 5 – Ciclodextrina (modelo molecular)

A FIGURA 6 mostra um cromatograma típico da enantioseparação do citronelol (SUPELCO – Note 114, 1998).

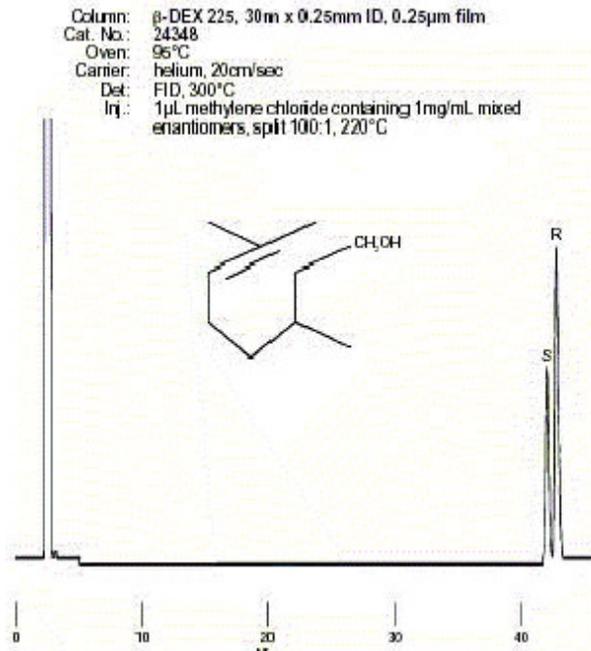


FIGURA 6 – Enantioseparação do citronelol

3.7. Imobilização de Enzimas

Enzimas imobilizadas são definidas como “enzimas que estão fisicamente confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção das suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente”. O termo enzimas imobilizadas inclui: (1) enzimas modificadas para uma forma insolúvel por técnicas adequadas, (2) enzimas solúveis usadas em reatores equipados com uma membrana de ultrafiltração não permeável que retém as moléculas de enzima dentro do reator, e (3) enzimas cuja mobilidade foi restringida pela ligação com outra macromolécula, sendo a molécula resultante solúvel em água (KENNEDY *et al*, 1987).

Houve uma expansão muito grande do uso de enzimas imobilizadas nos últimos 20 anos para obtenção de produtos industriais. O princípio básico é o mesmo tanto para enzimas como para células imobilizadas. A imobilização é essencial quando o custo das enzimas é alto (JOHNSON-GREEN, 2002).

Biocatalisadores imobilizados são enzimas que foram confinadas para permitir reutilização contínua. Ambas as técnicas, química e física, são usadas para imobilizar enzimas. As técnicas físicas tendem a ser de menor custo (LEE, 1996).

Quando as enzimas estão presentes na solução, algumas delas irão deixar os reatores junto com o produto final, o que significa não apenas que novas enzimas devem ser introduzidas para repor as que foram perdidas, mas também que as enzimas devem ser removidas do produto porque constituem impurezas indesejáveis. Além disso, enzimas imobilizadas podem manter sua atividade mais tempo do que em solução. A maioria das enzimas são lábeis sob condições normais de operação, tendo somente um vida útil muito limitada. Uma enzima imobilizada pode ser fixada numa posição próxima a outras enzimas participando de uma seqüencia catalítica, aumentando a eficiência de uma conversão com várias etapas (LEE, 1996).

As vantagens adicionais de enzimas e células imobilizadas estão listadas na TABELA 7.

TABELA 7 – Vantagens de enzimas e células imobilizadas

Enzimas	Células
1. Reutilização da enzima que permite operação contínua	1. Reutilização da célula que permite operação contínua
2. Estabilidade aumentada	2. Desnecessário para extração de enzimas ou purificação
3. Aumento das propriedades cinéticas; melhor controle do processo catalítico	3. Mantem intacta a atividade enzimática e menor sensibilidade a mudanças nas condições de operação
4. Produto livre de enzima	4. Menores custos
5. Menores custos para enzimas caras	5. Uso de sistema multienzimático que requer muitas enzimas e renovação de cofatores
6. Uso de sistemas multienzimáticos	6. Novos usos médicos/industriais
7. Novos usos médicos/industriais	7. Redução dos problemas de poluição industrial por causa do processo contínuo (menores volumes)
8. Uso de enzimas de microrganismos não-“GRAS”	

As partículas de enzimas às vezes tendem a formar agregados e se prendem nas paredes do reator, especialmente quando a enzima é hidratada para obter atividade catalítica. Estes problemas podem ser reduzidos pela imobilização da enzima sobre um suporte sólido. Além disso, preparações de enzimas sobre suportes freqüentemente apresentam atividade catalítica maior do que enzimas em pó. Outra razão possível é que o suporte pode proteger a enzima da inativação reversível durante a secagem ou liofilização e, desse modo, manter alto o número de moléculas de enzimas ativas. Ainda mais uma explicação possível é que o suporte fornece um micro ambiente favorável para a enzima durante a catálise e, portanto, a atividade catalítica aumenta (ADLERCREUTZ, 1996).

Ainda não foram desenvolvidos métodos gerais que se apliquem à imobilização de enzimas. Por isso, é necessário escolher métodos e condições disponíveis para imobilização de cada sistema (LEE, 1996).

As enzimas são usualmente mais fáceis de imobilizar do que as células por causa da questão da manutenção da viabilidade celular. Conseqüentemente, produtos como glutaraldeído podem ser usados para ligar covalentemente as enzimas a leitos sólidos (JOHNSON-GREEN, 2002).

Alternativamente, as enzimas podem ser adsorvidas sobre suportes sólidos. Atrações iônicas, pontes de hidrogênio, ou forças de van der Waals podem estar envolvidas na adsorção. Por exemplo, leitos de celulose modificada semelhantes aos usados em cromatografia de troca iônica (por exemplo, dietilaminoetil (DEAE)-sephadex) podem ser usados para imobilizar enzimas. A enzima é acoplada aos leitos através de atrações eletrostáticas. Uma importante vantagem destes sistemas é que os suportes podem ser reciclados. Quando a atividade enzimática diminui ao longo do tempo, a enzima pode ser facilmente removida do leito e uma nova enzima readsorvida. Este é um importante componente das análises econômicas da possibilidade de aplicação de um sistema com enzima imobilizada. Uma enzima que mantém sua atividade por um longo período de uso é crucial (JOHNSON-GREEN, 2002).

As enzimas também podem ser imobilizadas em géis. Reatores de leitos empacotados e reatores de leitos fluidizados podem ser utilizados para processos de enzimas imobilizadas (JOHNSON-GREEN, 2002).

Xaropes de “high-frutose” são importantes ingredientes em muitos alimentos e são tipicamente produzidos com o uso de enzimas acopladas a leitos de celulose modificada. Muitos outros processos biotecnológicos são conduzidos com uma variedade de técnicas de enzimas imobilizadas, e a aplicação da tecnologia de imobilização tende a crescer nos próximos anos (JOHNSON-GREEN, 2002).

Nos processos de adsorção, a enzima é anexada a materiais com superfície ativa. Até para esses carreadores chamados de inertes, o mecanismo de união não é tão simples e provavelmente envolve uma combinação de forças de van der Waals e pontes de hidrogênio. Demonstrou-se que resinas de troca iônica resultam em atividade e estabilidade melhoradas. A eluição da enzima continua ocorrendo, mas pode ser reduzida pela alteração do pH, temperatura e força iônica. A primeira enzima imobilizada comercialmente com sucesso foi preparada por adsorção, e este método continua tendo vantagens para aplicações industriais em larga escala (LEE, 1996).

Como compostos reativos não estão envolvidos, há pouca ou nenhuma mudança conformacional na enzima neste tipo de imobilização (KENNEDY *et al*, 1987).

A FIGURA 7 mostra duas formas de aplicação de enzimas em meios predominantemente orgânicos (ADLERCREUTZ, 1996).

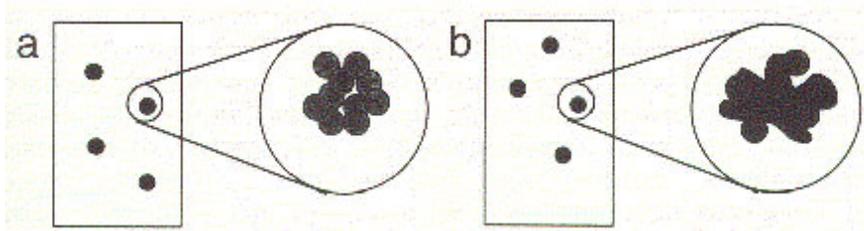


FIGURA 7 – Apresentação esquemática de diferentes maneiras de aplicação de enzimas em solventes orgânicos: (a) suspensão de enzima em pó no solvente; os círculos menores na figura ampliada representam moléculas de enzima; (b) suspensão de enzima sobre um suporte

ABBAS *et al* (2003) investigaram a habilidade da lipase de *Mucor* sp imobilizada sobre Amberlite IRC 50 para catalisar a síntese de ésteres de aroma em meio orgânico (ciclohexano) a 35°C. Foram usados como substratos os ácidos propiônico, butírico e capróico, bem como os álcoois metanol, etanol, alílico, butanol, isoamílico, geraniol, citronelol e farnesol em razão equimolar. A maioria dos ésteres foram sintetizados com bom rendimento (>90%). Diferentes rendimentos de conversão foram observados de acordo com a afinidade da lipase com os ácidos ou os álcoois. Altas e rápidas conversões de 92 a 98% foram observadas para os caproatos de metila e de etila, respectivamente, depois de 4 horas de reação, e rendimentos de 95, 100 e 93% foram obtidos para butirato de butila, caproato de butila e caproato de alila, respectivamente, depois de 24 horas de reação.

A lipase de *Staphylococcus warneri* foi imobilizada em sílica gel e usada na esterificação de diferentes ácidos e álcoois em *n*-heptano. A enzima produziu ésteres de etila do ácido valérico até o oléico com um ótimo para o ácido decanóico. Ela esterificou álcoois primários alifáticos de cadeia normal e de cadeia ramificada do etanol até o hexanol. Sob as mesmas condições, os ácidos acético e butírico sofreram pouca esterificação (TALON *et al*, 1995).

A lipase de *Candida cylindracea* foi imobilizada em géis com ligações cruzadas para a síntese de butirato de etila por esterificação direta do etanol com ácido butírico em hexano. A imobilização da enzima aumentou sua atividade em até 2,8 vezes, melhorou o rendimento da esterificação e diminuiu a inibição pelo álcool. Géis hidrofóbicos mostraram-se melhores do que os hidrofílicos em termos de performance geral, e a enzima

imobilizada manteve 70% da sua atividade inicial depois de 15 ciclos de reação em batelada (CHEN, 1996).

O isovalerato de isoamila, um éster relacionado ao aroma de maçã, foi sintetizado por esterificação direta do álcool isoamílico com ácido isovalérico usando lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM-20) imobilizada em uma resina trocadora de ânions. Investigou-se vários parâmetros da reação que afetam a síntese do éster, incluindo concentração de substrato, concentração de enzima, razão molar dos substratos, temperatura e tempo de incubação. O rendimento máximo (>85%) foi obtido com a concentração de 0,5 M do ácido (razão molar 1,5:1 de álcool/ácido), usando 10g/L de enzima, temperatura de 50°C e tempo de incubação de 144 horas em *n*-hexano (CHOWDARY *et al*, 2000).

HAMSAVENI *et al* (2001) usaram a lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM-20) para a síntese do isobutirato de isobutila por esterificação direta do ácido isobutírico e do isobutanol. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinar o efeito do solvente ($\log P$ variando de 0,49 a 4,5), concentração do ácido (0,05-0,25 M), concentração de enzima (25-225 mg), período de incubação (24-120 horas) e temperatura (30-70°C) na reação de esterificação. A reação apresentou bons resultados para todas as concentrações de ácido empregadas, mas com melhores valores em concentrações mais altas de enzima. Até com a baixa concentração de enzima de 25 mg, observou-se 50% de conversão. A enzima apresentou atividade em toda a faixa de temperatura analisada, até o período de incubação de 120 horas. Os resultados mostram que os rendimentos foram maiores para solventes com $\log P > 2$, isto é, quando solventes mais apolares foram empregados. As condições ótimas preditas pelo modelo para um rendimento máximo de 200 mM foram ácido isobutírico 0,2 M, isobutanol 0,2 M, concentração de enzima 225 mg, período de incubação 72 horas, hexano ($\log P = 3,5$) como meio de reação e temperatura 70°C. Sob estas condições, obteve-se um rendimento experimental de 195 mM que condiz perfeitamente com o rendimento predito pelo modelo.

Os monoésteres de propileno glicol com baixo balanço hidrofílico-lipofílico são amplamente usados na indústria de alimentos. A habilidade da lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM-77) na catálise da esterificação direta de propileno glicol com ácido láurico foi investigada por SHAW *et al* (2003). Adotou-se a metodologia de superfície de resposta para avaliar os efeitos das variáveis da síntese, tais como tempo de reação (3-9 horas), temperatura (25-65°C), quantidade de enzima (15-45%) e razão molar entre ácido láurico e propileno glicol (1:1 a 1:3), sobre a conversão molar percentual obtendo-se monolaurato de propileno glicol. Os resultados demonstraram que a temperatura e o tempo de reação foram os parâmetros mais importantes e a quantidade de enzima tem o menor efeito sobre a conversão molar percentual. As condições ótimas para a síntese foram: tempo de reação, 7,6 horas; temperatura, 37,6°C; quantidade de enzima, 37,1%; e razão molar entre os substratos, 2,6:1, sendo predito 100% de conversão molar. O valor experimental observado foi de 96% de conversão molar.

O acetato de *cis*-3-hexen-1-ila, amplamente usado na indústria de alimentos, é um éster de cadeia curta com odor frutal, que é um modelo importante de compostos de aroma com notas naturais “verdes”. CHIANG *et al* (2003) avaliaram a habilidade da lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM-77) de catalisar a transesterificação do *cis*-3-hexen-1-ol com triacetina em *n*-hexano. A metodologia de superfície de resposta foi adotada para mensurar os efeitos dos parâmetros da reação sobre a conversão molar percentual do acetato de *cis*-3-hexen-1-ila, tais como tempo de reação (8-24 horas), temperatura (25-65°C), quantidade de enzima (0,02-0,1 BAUN), razão molar dos substratos triacetina/*cis*-3-hexen-1-ol (1:1 a 1:3) e conteúdo de água adicionada (0-20%). A temperatura da reação e a razão molar dos substratos foram os parâmetros mais importantes e o conteúdo de água adicionada teve o menor efeito sobre a conversão molar percentual. A melhor taxa de transesterificação foi obtida, segundo o modelo, em 19,2 horas, 48,5°C, 0,09 BAUN de enzima, razão molar de substratos 2,5:1 e água adicionada 7,85%. Nessas condições, o modelo prevê 82,1% de conversão molar e o valor experimental observado foi de 80,9%.

A síntese de ésteres de ácidos graxos com açúcares catalisada por lipase através de esterificação direta com 2-metil-2-butanol como solvente foi conduzida por SOULTANI *et al* (2001). Estas moléculas têm diversas aplicações nas indústrias de cosméticos e de alimentos. De fato, estes surfactantes não iônicos podem ser usados como emulsificantes e são compostos de aroma em uma grande variedade de formulações de alimentos. Frutose e ácidos graxos saturados foram usados como substratos e a reação foi catalisada por lipase imobilizada de *Candida antarctica*. Investigou-se os efeitos da razão molar inicial frutose/doador acila, do comprimento da cadeia carbônica do ácido bem como das suas interações recíprocas sobre a performance da reação. Com este objetivo, empregou-se um planejamento experimental variando a razão molar de 1:1 até 1:5 e o comprimento da cadeia carbônica do ácido de C8 até C18. A análise estatística dos dados indicou que os dois fatores, assim com suas interações, têm efeito significativo na síntese de ésteres de açúcar. As menores razões molares apresentaram as melhores taxas de reação.

3.8. Ésteres de Aroma Terpênicos

Compostos terpênicos são basicamente formados por unidades biológicas de isopreno-C₅. Juntamente com o recente conhecimento de mecanismos de reações químicas, tornou-se possível explicar a grande variedade de estruturas terpênicas naturais (KRASNOBAJEV, 1984).

Os monoterpenos constituem um grande grupo de produtos naturais sintetizados e acumulados em estruturas glandulares distintas de 50 famílias de plantas superiores. A vasta maioria desses compostos é cíclica e representa um número relativamente pequeno de “esqueletos” que se multiplicam em vários derivados simples, isômeros de posição e variantes estereoquímicos (CROTEAU, 1986).

A análise dos derivados de monoterpenos permite a diferenciação entre variedades de uva e entre vinhos de estilos similares (STRAUSS *et al*, 1986). Este grupo de compostos mostra uma relação com diversas características sensoriais. Os aromas de algumas variedades de uva são determinados pelos seus monoterpenos.

Nos últimos anos, transformações microbianas de compostos terpênicos foram muito estudadas. Estas revisões enfatizaram transformações microbianas de compostos terpênicos com aplicação potencial especialmente na indústria de aromas e fragrâncias e, mais ainda, enfatizaram os compostos com possível desenvolvimento biotecnológico (KRASNOBAJEW, 1984).

Já há muito tempo desenvolveram-se formulações sofisticadas de terpenos de ocorrência natural e seus derivados oxigenados. Destilação a vapor de materiais vegetais pode produzir óleos essenciais cujos constituintes majoritários são os terpenos, porém alguns podem estar presentes em baixas concentração. Compostos terpênicos também são encontrados no reino animal, especialmente em insetos, microrganismos e organismos marinhos (KRASNOBAJEW, 1984).

As dificuldades encontradas na transformação de terpenos são devido ao fato de muitos microrganismos transformarem ou degradarem os terpenos adicionados em vários metabólitos sem utilidade ou de difícil separação. Além disso, compostos terpênicos voláteis podem ser perdidos por causa da forte aeração necessária, especialmente em fermentações em tanques profundos (KRASNOBAJEW, 1984).

Por outro lado, vários estudos indicam um alto potencial para o uso industrial de transformações microbianas de terpenos (KRASNOBAJEW, 1984).

A produção de monoterpênicos por *Ceratocystis moniliformis* é um processo subsequente à rota do mevalonato, após o término da fonte de nitrogênio. Isto é uma típica produção de metabólito secundário. Geraniol é o primeiro composto a ser formado, diminuindo depois de dois dias. Citronelol, nerol, e neral surgem depois do segundo dia, e linalol e α -terpineol não são produzidos até o quarto dia (SCHARPF *et al*, 1986).

SCHREIER *et al* (1986) identificaram o linalol como o volátil mais abundante em mamão (*Carica papaya*) numa concentração maior que 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Segundo MARRIOT (1986), dependendo da cultivar de groselha preta, o linalol pode ser encontrado em concentrações que variam de 16 a 59 µg/Kg e o citronelol, de 138 a 185 µg/Kg.

Segundo STRAUSS *et al* (1986), o linalol e o citronelol (e seus ésteres de acetato) estão presentes na uva *Vitis vinifera* e em vinhos, e são um dos principais terpenos de aroma da fruta.

O linalol é encontrado na uva em uma concentração maior do que seu *threshold*. Além disso, já foi demonstrada uma correlação entre o seu conteúdo e a intensidade do aroma em uvas (STRAUSS *et al*, 1986).

Ainda segundo STRAUSS *et al* (1986), a concentração de linalol pode ser usada para distinguir seis cultivares de uvas utilizadas para produção de vinho.

Kluyveromyces lactis são capazes de produzir monoterpenos, tais como citronelol e linalol, embora em taxas muito baixas (50 µg/L). Alterando-se as condições de cultivo, muda-se a taxa e o tipo de produto formado. Aumentando-se a temperatura e a concentração da fonte de nitrogênio asparagina, aumenta-se substancialmente a taxa de citronelol (SCHARPF *et al*, 1986).

Terpenos acíclicos e álcoois sesquiterpênicos ocorrem em muitos óleos essenciais. Eles são formalmente isolados dos óleos nos quais são os principais constituintes. Os álcoois terpênicos acíclicos geraniol, linalol e citronelol são os mais importantes, usados como substâncias de fragrâncias e aromas (BAUER *et al*, 1985).

O l-citronelol foi encontrado na natureza em plantas da família *Rosaceae*; d- e dl-citronelol foram identificados em: *Verbenaceae*, *Labiatae*, *Rutaceae*, *Geraniaceae* e outras. O citronelol foi relatado como constituinte de cerca de 70 óleos essenciais e no óleo de *Rosa bourbonia*. O óleo de rosa búlgara foi relatado como contendo mais de 50% de l-

citronelol, enquanto gerânio do leste da África contem mais de 80% do isômero *d*. O produto natural é sempre opticamente ativo (FENAROLI, 1971). Os isômeros óticos $\beta(+)$ -citronelol e $\beta(-)$ -citronelol exibem odores diferentes (KRASNOBAJEW, 1984).

O ácido butírico normalmente está presente em manteiga como um glicerídeo. Ele foi encontrado em óleos essenciais de: Ceilão de citronela, *Eucalyptus globulus*, *Araucaria cunninghemii*, *Lippia scaberrima*, *Monarda fistulosa*, cajeput, *Heracleum giganteum*, lavanda, *Hedeoma pulegioides*, valeriana, noz-moscada, lúpulo, *Pastinaca sativa*, erva-doce espanhola e outros. Foi também identificado em aroma de morango (FENAROLI, 1971).

O ácido valérico não é muito comum na natureza. É relatado (como o éster correspondente) em óleo essencial de *Boronia anemonifolia*, em frutos de abacaxi e em outras plantas; também foi identificado como ácido ou o éster correspondente em óleo essencial de limão petit-grain (FENAROLI, 1971).

Os ésteres dos álcoois terpênicos acíclicos geraniol, linalol e citronelol com ácidos graxos de cadeia curta são substâncias de fragrâncias e aromas extremamente importantes. Todos os ésteres terpênicos acíclicos usados como compostos de fragrâncias e aromas podem ser preparados por esterificação direta dos álcoois. Como os ésteres de geraniol, linalol e citronelol com ácidos graxos de cadeia curta são importantes para o odor de muitos óleos essenciais, eles são amplamente usados na reconstituição de tais óleos, bem como na composição de perfumes e aromas (BAUER *et al*, 1985).

O butirato de citronelila está presente em óleo de citronela do Ceilão. Ele tem odor forte de rosa, frutal e gosto doce de ameixa. Pode ser usado em bebidas não alcoólicas - 3,8 ppm; sorvetes, etc - 11 ppm; doces - 13 ppm; gelatinas e pudins - 3,1 a 4,2 ppm; gomas de mascar - 2,3 ppm. Ainda está presente nos aromas naturais de abacaxi e de ameixa (FENAROLI, 1971).

O valerato de citronelila é relatado na essência de *Boronia citriodora*. Este composto possui odor característico de rosas, ervas e mel. Ele tem como principais usos: bebidas não alcoólicas - 1,0 ppm; sorvetes, etc - 2,5 ppm; doces - 3,0 ppm (FENAROLI, 1971).

Os ésteres de aroma quirais butirato e valerato de citronelila, com suas respectivas estruturas e propriedades organolépticas, são apresentados na Tabela 8 (CATÁLOGO *Flavors & Fragrances – Featuring Naturals*, 1999/2000 e FENAROLI, 1971).

TABELA 8 – Estruturas e propriedades organolépticas do butirato e do valerato de citronelila

Composto	Estrutura	Propriedades Organolépticas	FDA	FEMA N°
Butirato de Citronelila		Frutal ¹ , doce, rosa	121.1164 ²	2312
Valerato de Citronelila		Morno, mel, herbáceo ³ , rosa suave	121.1164	2327

¹ Termo genérico para odores de vários tipos de frutas (BAUER *et al*, 1985)

² §121.1164 – Refere-se à seção do “Federal Food, Drug and Cosmetic Act” que indica que substâncias aromatizantes sintéticas podem ser usadas de forma segura em alimentos de acordo com as seguintes condições (FENAROLI, 1971):

1. usadas na quantidade mínima requerida para produzir o efeito desejado e em conformidade com todos os princípios de Boas Práticas de Processamento, e
2. elas consistirem de uma ou mais formas apropriadas utilizadas sozinhas ou em combinação com substâncias aromatizantes geralmente reconhecidas como seguras em alimentos, previamente sancionadas para uso em alimentos ou regulamentadas em qualquer seção.

³ Odor complexo, não característico, de ervas verdes como, por exemplo, salva, hortelã, eucalipto, ou nuances de terra (BAUER *et al*, 1985)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Reagentes e Solventes Químicos

DL-Citronelol (Sigma); ácido acético (Merck), ácido butírico (Sigma), ácido valérico (Merck) e ácido caprílico (Vetec); isooctano (Sigma); peneira molecular 4 Å; celite 545 (Labsynth).

4.1.2. Enzimas

Preparações de lipase bruta liofilizada de *Rhizopus* sp, *Fusarium* 152 B, *Fusarium* 160 A1, *Trichoderma* sp e *Alcaligenes* sp.

Lipase comercial Lipozyme IM 20 (NOVO – Copenhagen, Denmark).

4.1.3. Padrões para Cromatografia Gasosa e Quiral

(S)-(-)- β -Citronelol 99%, (R)-(+)- β -citronelol 98% (padrões Aldrich Chemical Co).

4.1.4. Equipamentos

Estufa de cultura modelo 002-CB, Fanem; centrífuga refrigerada modelo J2-21, Beckman; liofilizador Flexi-Dry™, FTS Systems; cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama Chrompack CP 9001 com integrador e software MOSAIC; coluna quiral β -DEX™ 225 (30 m x 0,25 mm Ø), partícula 0,25 μ m (SUPELCO); banho de água termostaticado modelo G-76, New Brunswick Scientific; evaporador rotativo modelo MA 120, Marconi.

4.2. Metodologia

4.2.1. Produção da Lipase de *Rhizopus* sp

A metodologia para a obtenção do extrato enzimático bruto liofilizado foi estabelecida por COSTA (1997). O meio de cultura semi-sólido foi composto de farelo de trigo e água (60 e 40% p/p, respectivamente). Erlenmeyers de 500 mL contendo 20 g de meio esterilizados foram inoculados com 1 mL de suspensão homogênea de esporos de *Rhizopus* sp, preparada com água destilada estéril e com esporos de cultura de 96 horas de crescimento em meio inclinado de ágar batata dextrosado. Os erlenmeyers foram incubados a 30°C por 120 horas.

Os meios de cultura foram homogeneizados e permaneceram sob extração por uma hora. O meio de cultura foi filtrado em gaze e coletado em um único recipiente. Ao filtrado foi acrescentado sulfato de amônio até 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu por 24 horas a 5°C para precipitação completa da enzima. A mistura foi centrifugada a 7000 rpm por 15 minutos sob refrigeração (4°C). O precipitado foi dialisado contra água destilada a 5°C até a liberação completa do sulfato de amônio. Após a diálise, o material foi congelado e liofilizado. O pó obtido foi denominado preparação enzimática bruta e estocado em congelador. Foi determinada a atividade lipolítica e concentração protéica da preparação enzimática, encontrando-se 0,212 μ mol/min*mg de enzima (quantidade de ácido graxo liberada, em ácido oléico, por minuto e mg de enzima) e 607,4mg de proteína por g de enzima.

As outras preparações enzimáticas brutas foram obtidas do estoque já existente no laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/UNICAMP).

4.2.2. Reações de Esterificação na Presença de Solvente Orgânico

As reações de esterificação foram realizadas em frascos de vidro com capacidade de 30 mL selados com lacre. O sistema foi composto de isooctano, álcool terpênico, um dos ácidos de interesse, peneira molecular (4% em relação a massa total de substratos), pérolas de vidro, e enzima. Experimentos sem adição de enzima foram preparados a fim de avaliar a porcentagem de esterificação espontânea do sistema (controle). Uma vez dissolvidos os substratos no solvente em banho termostaticado, a enzima e a peneira molecular foram adicionadas ao meio de reação. As reações foram conduzidas a 40°C e 200 rpm.

Em um primeiro momento, testou-se a capacidade catalítica de lipases de diferentes fontes (*Rhizopus* sp, *Fusarium* 152 B, *Fusarium* 160 A1, *Trichoderma* sp e *Alcaligenes* sp) na esterificação do citrionelol com os ácidos butírico e valérico. O sistema foi composto por 2 mL de solvente orgânico (isooctano), 8 mmoles do álcool, 8 mmoles do ácido, peneira molecular, enzima (5% em relação a massa total de substratos) e pérolas de vidro. Alíquotas foram retiradas após 24 e 48 horas de reação.

O efeito do comprimento da cadeia do ácido e da presença ou não de solvente orgânico sobre a atividade de esterificação da lipase de *Rhizopus* sp foi avaliado. O sistema com presença de solvente foi composto de 2 mL de isooctano, 3,15 mmoles de álcool e um dos ácido analisados (acético, butírico, valérico e caprílico), peneira molecular, enzima (5%) e pérolas de vidro. Alíquotas foram retiradas após 12, 24, 48, 72 e 96 horas de reação.

4.2.3. Reações de Esterificação na Ausência de Solvente Orgânico

O sistema livre de solvente orgânico foi composto por 8,5 mmoles de álcool, 8,5 mmoles de um dos ácidos, enzima (5%) e pérolas de vidro. Alíquotas foram retiradas após 12, 24, 48, 72 e 96 horas de reação.

A partir deste ponto, analisou-se o efeito da razão molar entre os substratos (citronelol e ácidos butírico ou valérico) e da quantidade de enzima sobre o rendimento da reação de esterificação catalisada pela lipase de *Rhizopus* sp em meio livre de solvente. Para tanto, foi realizado um planejamento fatorial completo (NETO *et al*, 2002) com o intuito de otimizar o rendimento da catálise em relação aos fatores já mencionados. Este planejamento experimental será melhor detalhado no ítem 5. (Resultados e Discussão). Alíquotas foram retiradas em 24 e 48 horas de reação.

4.2.4. Imobilização da Enzima

A lipase de *Rhizopus* sp foi imobilizada sobre celite 545 como descrito por IVANOV *et al* (1997). 200 mg da preparação enzimática bruta liofilizada foram dissolvidos em 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 7,5) e a solução foi misturada com agitador magnético em um banho de gelo por 1 hora. A solução foi, então, filtrada e diluída com água destilada até 20 mL. Celite 545 (2,5 g) foi adicionada à solução enzimática, e a mistura foi agitada por 15 minutos e seca sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 40°C. A enzima imobilizada foi armazenada em congelador. Como o método de imobilização utilizado é baseado em adsorção física, o rendimento do processo foi considerado como 100%.

O mesmo planejamento experimental aplicado para avaliar o efeito da razão molar entre os substratos e da quantidade de enzima foi utilizado para os estudos com a lipase imobilizada. Porém, desta vez, a esterificação foi conduzida em meio com solvente (isooctano). Alíquotas foram retiradas após 24 horas de reação.

Com o resultado deste planejamento, testou-se a reutilização da enzima imobilizada nas suas condições de melhor rendimento a fim de avaliar se a sua atividade na catálise da esterificação direta se mantinha após diversos ciclos de aplicação. Fez-se a mesma avaliação para a lipase comercial Lipozyme IM 20 (NOVO – Copenhagen, Denmark).

4.2.5. Quantificação por Cromatografia Gasosa e Quiral

Os experimentos tiveram seus rendimentos analisados por cromatografia gasosa (Chrompack CP 9001) em coluna de separação quiral β -DEX™ 225 (20% de β -ciclodextrina permetilada) com o objetivo de avaliar, além da esterificação total, se a enzima possuía preferência por alguma das duas formas enantioméricas do álcool utilizado.

A quantificação dos ésteres formados foi realizada através da análise das duas formas enantioméricas residuais do álcool utilizando Calibração Externa. As condições de análise foram: temperatura do forno 95°C; do detector (FID), 300°C e do injetor, 220°C; gás de arraste, He, na velocidade linear de 18,5 cm/s (80kpa) em sistema de injeção *split* com razão 1:100.

A curva de calibração externa foi preparada através da injeção, nas mesmas condições de análise, de 1 μ mL das soluções-padrão de (S)-(-)- β -Citronelol. As concentrações destas soluções variaram entre 0,5 e 4 mg/mL. A curva de calibração obtida pode ser vista no ANEXO 1.

Ao final de cada tempo de reação, eram retirados 20 μ mL do sistema reacional e estes eram diluídos até 1 mL. Desta solução injetava-se 1 μ mL para análise. Exemplos dos cromatogramas gerados estão expostos no ANEXO 2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção da Lipase para Síntese de Ésteres de Citronelila

A ordem de adição dos componentes do meio de reação foi escolhida com base no trabalho de CLAON *et al* (1993). Ésteres de geraniol e citronelol com ácidos graxos de cadeia curta foram sintetizados por esterificação direta catalisada por lipase com rendimentos que variaram de 90 a 100% de conversão molar. Neste trabalho, investigou-se o efeito da ordem de adição dos substratos, solvente e enzima. Os rendimentos foram maiores quando o solvente foi adicionado primeiro seguido pelos substratos e, então, pela lipase.

As TABELAS 9 e 10 mostram os rendimentos, em porcentagem de conversão molar, para a síntese dos ésteres butirato e valerato de citronelila, respectivamente, em 24 e 48 horas empregando lipases microbianas de diferentes fontes. Após cada tabela, apresenta-se a versão gráfica destes resultados (FIGURAS 8 e 9).

TABELA 9 – Conversão molar na síntese de butirato de citronelila

Fonte da Lipase	Conversão Molar (%) 24 horas	Conversão Molar (%) 48 horas
<i>Rhizopus</i> sp	17,4	48,8
<i>Fusarium</i> 152 B	4,00	11,1
<i>Fusarium</i> 160 A1	0,00	0,00
<i>Tricoderma</i> sp	0,00	0,00
<i>Alcaligenes</i> sp	2,90	15,3

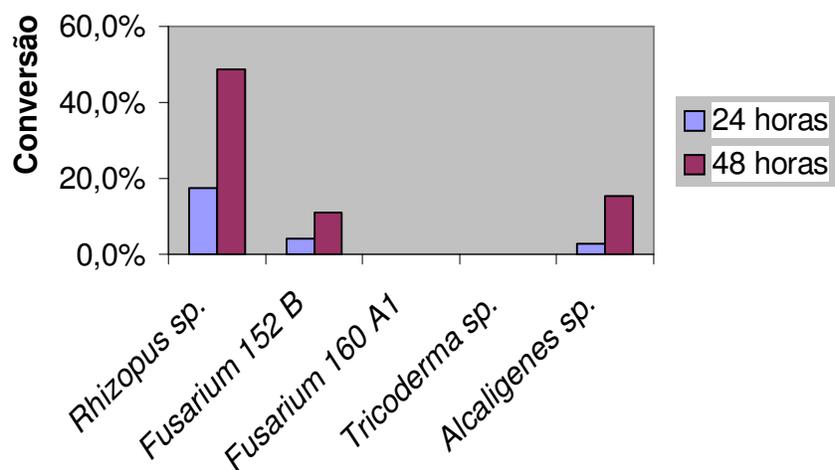


FIGURA 8 – Conversão molar na síntese de butirato de citronelila

TABELA 10 – Conversão molar na síntese de valerato de citronelila

Fonte da Lipase	Conversão Molar (%) 24 horas	Conversão Molar (%) 48 horas
<i>Rhizopus</i> sp	63,1	76,3
<i>Fusarium</i> 152 B	0,00	17,5
<i>Fusarium</i> 160 A1	6,80	13,6
<i>Tricoderma</i> sp	11,1	14,4
<i>Alcaligenes</i> sp	11,5	11,3

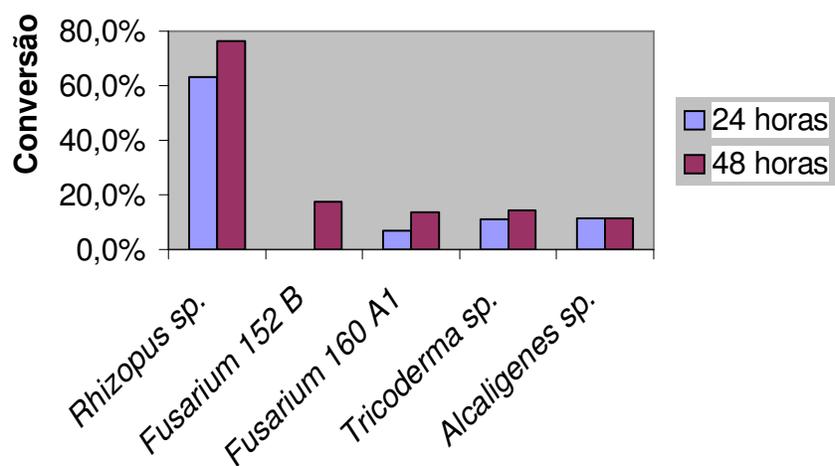


FIGURA 9 – Conversão molar na síntese de valerato de citronelila

Os resultados obtidos mostram, claramente, um melhor rendimento de esterificação apresentado pela lipase de *Rhizopus* sp. Esta lipase atinge esterificações da ordem de 50% em 48 horas para os ésteres estudados, enquanto as demais não atingem 20% no mesmo período. Estes valores só vêm confirmar um estudo que tem sido realizado no laboratório de Bioaromas da FEA/UNICAMP com a enzima em questão.

A lipase de *Rhizopus* sp apresentou valores de conversão comparáveis à literatura que utiliza sempre lipases comerciais, confirmando que estas lipases devem ser objeto de mais estudos por possuírem grande potencial de aplicação na síntese de ésteres formadores de aroma em alimentos (MACEDO, 1997).

A lipase de *Rhizopus* sp também apresentou intensa atividade de esterificação em meio reacional isento de água. A maior ou menor porcentagem de esterificação depende da relação molar entre o ácido graxo e o glicerol bem como da especificidade da ação enzimática quanto ao tipo de ácido graxo utilizado (VIEIRA, 1999).

Com todas estas evidências, optou-se por realizar o restante do trabalho apenas com a lipase de *Rhizopus* sp, aprofundando o estudo das variáveis da reação catalisada por esta enzima na esterificação direta do citrionelol visando à síntese de ésteres terpênicos de aroma.

Nove lipases em pó comercialmente disponíveis foram investigadas por WU *et al* (1996) em relação à habilidade de hidrolisar óleo de oliva e sintetizar oleato de 1-butila por esterificação direta e éster de 2-etila-1-hexila de óleo de semente de colza por transesterificação. Sob as condições experimentais usadas, a lipase de *Candida rugosa* apresentou a maior atividade hidrolítica (88 U/mg de enzima). A lipase de *Pseudomonas fluorescens* obteve a maior conversão do óleo, cerca de 95%, em 24 horas. Além disso, as lipases de *C. rugosa* e *Rhizopus* sp resultaram na maior conversão de óleo de semente de colza, sendo de quase 100%. A lipase pancreática de suíno mostrou a menor atividade hidrolítica (1,5 U/mg de enzima) e também a menor atividade sintética com conversões de ácido oléico e óleo de semente de colza de apenas 50 e 19%, respectivamente. Para a lipase

de *Rhizomucor miehei*, apenas atividades de esterificação e transesterificação foram relatadas. Finalmente, para a lipase de *Chromobacterium viscosum*, nenhuma relação entre as atividades hidrolítica e sintética foi observada.

AKOH *et al* (1998) testaram diversas lipases quanto a habilidade de catalisar a síntese de ésteres de citronelila e geranila em meio orgânico usando ésteres de vinila como agentes acilantes. Baseado nos resultados, escolheu-se a lipase SP 435 de *Candida antarctica* para o estudo do efeito dos parâmetros reacionais na síntese de ésteres de álcoois terpênicos com ácido acético. Esta enzima (na concentração de 10% p/p em relação à massa de substratos) apresentou rendimentos de 97,7 e 98,6% para os acetatos de geranila e citronelila, respectivamente. Os estudos do tempo de reação mostraram que os rendimentos máximos são obtidos em 8 e 16 horas de incubação, respectivamente. Para os dois acetatos, solventes com $\log P > 3,2$ foram necessários para os maiores rendimentos e a faixa de temperatura entre 30 e 50°C foi adequada para a síntese destes ésteres.

YEE *et al* (1995) testaram cinco lipases quanto a habilidade de sintetizar ésteres terpênicos por transesterificação. A natureza do álcool terpênico e da enzima, bem como o comprimento da cadeia do doador acila afetaram os rendimentos da reação. A lipase AY de *Candida rugosa* apresentou o melhor rendimento global (96,2%). Geraniol e tributirina foram também os melhores reagentes.

5.2. Estudo do Efeito do Comprimento da Cadeia do Ácido e da Presença ou Não de Solvente Orgânico (Isooctano) na Síntese de Ésteres de Citronelila

O efeito do comprimento da cadeia carbônica do ácido na esterificação do álcool terpênico citronelol empregando lipase de *Rhizopus* sp foi verificado. Além disso, avaliou-se a necessidade da presença ou não de solvente orgânico nesta reação.

As taxas de esterificação em diferentes tempos de reação na presença de solvente (isooctano) estão apresentadas na TABELA 11 e FIGURA 10.

TABELA 11 – Efeito do comprimento da cadeia do ácido sobre a esterificação do citronelol por lipase de *Rhizopus* sp na presença de isoctano, a 40°C

Tempo (horas)	Ác. Acético (2 carbonos)	Ác. Butírico (4 carbonos)	Ác. Valérico (5 carbonos)	Ác. Caprílico (8 carbonos)
12	0,00%	5,36%	15,2%	50,1%
24	0,00%	10,3%	32,4%	82,1%
48	0,00%	47,8%	86,0%	91,6%
72	0,00%	75,4%	90,0%	91,5%
96	4,20%	83,7%	88,5%	89,9%

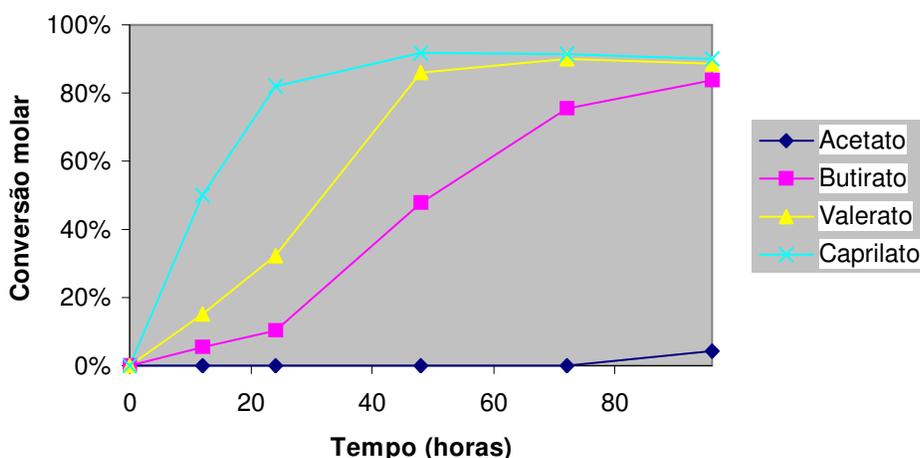


FIGURA 10 – Efeito do comprimento da cadeia do ácido sobre a esterificação do citronelol por lipase de *Rhizopus* sp na presença de isoctano, a 40°C

As mesmas reações foram conduzidas em meio livre de solvente orgânico e seus resultados podem ser vistos na TABELA 12 e na FIGURA 11.

TABELA 12 – Efeito do comprimento da cadeia do ácido sobre a esterificação do citronelol por lipase de *Rhizopus* sp na ausência de solvente, a 40°C

Tempo (horas)	Ác. Acético (2 carbonos)	Ác. Butírico (4 carbonos)	Ác. Valérico (5 carbonos)	Ác. Caprílico (8 carbonos)
12	0,00%	3,56%	10,7%	22,2%
24	0,00%	6,63%	28,8%	65,7%
48	8,36%	41,2%	74,4%	85,0%
72	10,6%	73,8%	83,4%	87,3%
96	40,8%	79,3%	83,8%	84,4%

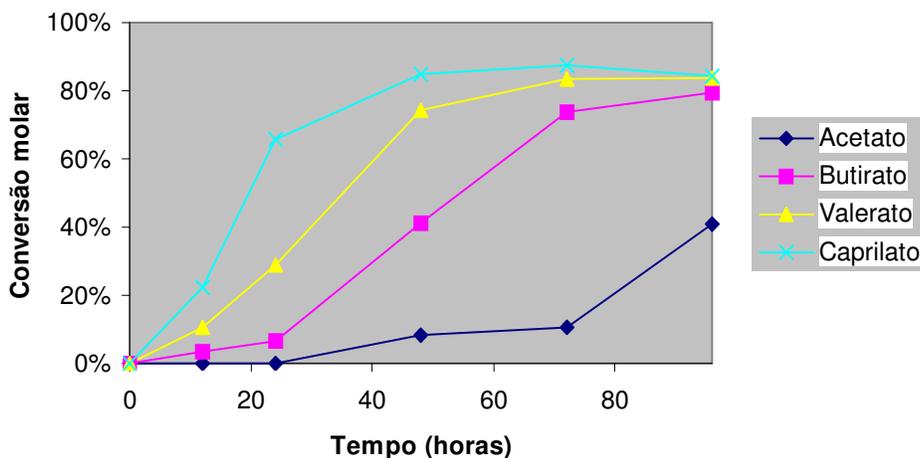


FIGURA 11 – Efeito do comprimento da cadeia do ácido sobre a esterificação do citronelol por lipase de *Rhizopus* sp na ausência de solvente, a 40°C

Os resultados acima descritos conduzem a duas conclusões imediatas. Primeiro, entre os ácidos estudados, quanto maior o comprimento da sua cadeia carbônica, maior o rendimento da reação de esterificação do citronelol. Sendo a maior diferença entre o ácido acético e os outros três doadores acila. Enquanto o acetato de citronelila alcançou apenas 40% de síntese, os outros três ésteres ultrapassaram 80% de formação.

Inclusive entre os três ácidos de melhor desempenho (butírico, valérico e caprílico) percebe-se uma maior taxa de conversão nas primeiras horas de reação para maior comprimento de cadeia. Ou seja, inicialmente, a catálise é mais rápida para o ácido caprílico, seguida do valérico e do butírico. Porém esta diferença se reduz bastante até 96 horas.

A segunda conclusão desta parte do estudo se evidencia no fato de a enzima ser capaz de catalisar a esterificação do citronelol com os ácidos em questão tanto na presença quanto na ausência de isooctano. Esta observação foi extremamente importante pois os ésteres sintetizados possuem propriedades sensoriais e, portanto, podem ser empregados na indústria de alimentos. Com isso, sua produção em meios com solvente orgânico dificulta esta finalidade. Uma exceção foi a síntese do acetato de citronelila que foi mais pronunciada em meio livre de solvente.

Porém, como a síntese do acetato de citronelila apresentou baixo rendimento, decidiu-se por não continuar seu estudo a fim de aprofundar a análise dos outros ésteres. E apesar do caprilato de citronelila ter sido o produto de mais rápida formação pela lipase de *Rhizopus* sp, este composto também não foi avaliado nas etapas posteriores porque não é um éster de aroma encontrado na natureza e relatado na literatura.

BOURG-GARROS *et al* (1998) investigaram a lipase de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica (Novozym 435) para a síntese de acetato de (z)-3-hexen-1-ila por esterificação direta em *n*-hexano e em meio livre de solvente. Um exame cuidadoso dos principais parâmetros (temperatura, quantidade de lipase, concentração dos substratos, razão ácido:álcool) estabeleceu a habilidade desta enzima na preparação do composto já mencionado. Sob as mesmas condições, a lipase de *Mucor miehei* imobilizada em uma resina trocadora de ânions (Lipozym IM) não apresentou rendimentos apreciáveis na síntese do éster. Em *n*-hexano, a 70°C, na presença de 2% de lipase (p/p em relação aos reagentes) e 1,5 mol/L de substrato, o rendimento atingiu 94% em menos de 72 horas; além disso, a lipase agiu na ausência de solvente: 70% de rendimento usando 9% de lipase.

Portanto, o estudo passou a se concentrar na síntese do butirato e do valerato de citronelila em meio livre de solvente. Buscando, principalmente, diminuir o tempo necessário para se atingir uma alta taxa de conversão. Foi feito um planejamento experimental com o objetivo de avaliar os efeitos das variáveis razão molar entre os substratos (álcool/ácido) e quantidade de enzima (% p/p em relação à massa de reagentes). Esta diminuição no tempo de reação é almejada basicamente para a redução dos custos do processo.

5.3. Otimização dos Parâmetros da Reação de Esterificação

Com o intuito de otimizar o rendimento da esterificação direta do citronelol com os ácidos butírico e valérico por lipase de *Rhizopus* sp em meio livre de solvente, realizou-se um planejamento fatorial completo com dois níveis e duas variáveis (2^2 ; $\alpha = 1,41$). Os parâmetros reacionais avaliados foram razão molar entre os sustratos e quantidade de

enzima. A razão molar entre os substratos variou entre 3:1 e 1:3 (álcool/ácido) e a quantidade de enzima, entre 1 e 7% p/p (em relação à massa de reagentes).

5.3.1. Butirato de Citronelila

A TABELA 13 mostra o resultado experimental obtido para cada um dos onze ensaios na síntese do butirato de citronelila. Nesta tabela, os números entre parênteses são os valores reais de razão molar e quantidade de enzima utilizados.

TABELA 13 – Resultados observados para síntese do butirato de citronelila utilizando planejamento fatorial completo

Ensaio	Razão Molar	Quantidade de Enzima	Conversão Molar (%)	Conversão Molar (%)
			24 horas	48 horas
1	-1 (2,41:1)	-1 (1,88%)	9,12	45,2
2	+1 (1:2,41)	-1 (1,88%)	42,9	12,0
3	-1 (2,41:1)	+1 (6,12%)	69,6	100
4	+1 (1:2,41)	+1 (6,12%)	15,2	30,2
5	-1,41 (3:1)	0 (4%)	100	78,5
6	+1,41(1:3)	0 (4%)	13,7	24,0
7	0 (1:1)	-1,41 (1%)	2,72	24,3
8	0 (1:1)	+1,41 (7%)	38,1	71,9
9	0 (1:1)	0 (4%)	28,9	33,3
10	0 (1:1)	0 (4%)	21,5	50,9
11	0 (1:1)	0 (4%)	23,3	39,7

Com os valores observados após 24 horas e ignorando-se o parâmetro Quantidade de Enzima Quadrático por não ser estatisticamente significativo, obtem-se o seguinte modelo codificado (EQUAÇÃO 1):

$$\text{Conversão Molar (\%)} = 21,57 - 17,83 (\text{Raz Mol}) + 15,97 (\text{Raz Mol})^2 + 10,35 (\text{Quant Enz}) - 22,05 (\text{Raz Mol} \times \text{Quant Enz})$$

O modelo apresentado acima teve sua validade comprovada, a 89% de probabilidade, pela Análise de Variância (ANOVA) da TABELA 14.

TABELA 14 – ANOVA da EQUAÇÃO 1

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	6922,46	4	1730,6	7,16	4,534
Resíduos	1449,36	6	241,6		
Falta de Ajuste	1419,57	4			
Erro Puro	29,7867	2			
Total	8371,81	10			

$R^2 = 0,82688$

Esta ANOVA, com F_{cal} maior do que o F_{tab} e $R^2 = 0,82688$ nos permite traçar a superfície de resposta e a curva de contorno do modelo gerado (FIGURAS 12 e 13, respectivamente).

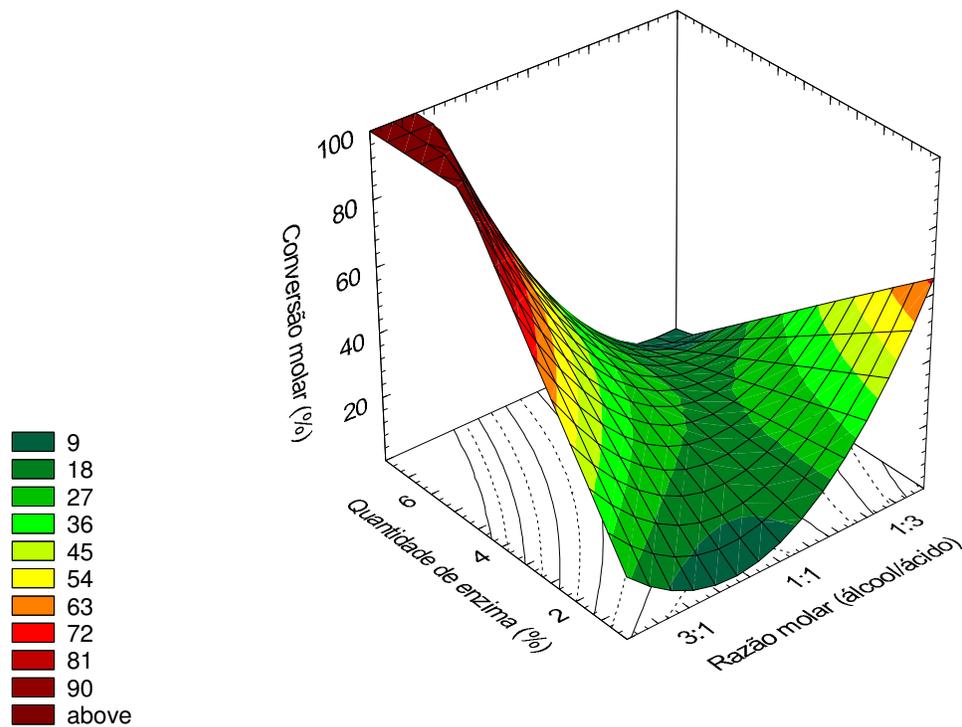
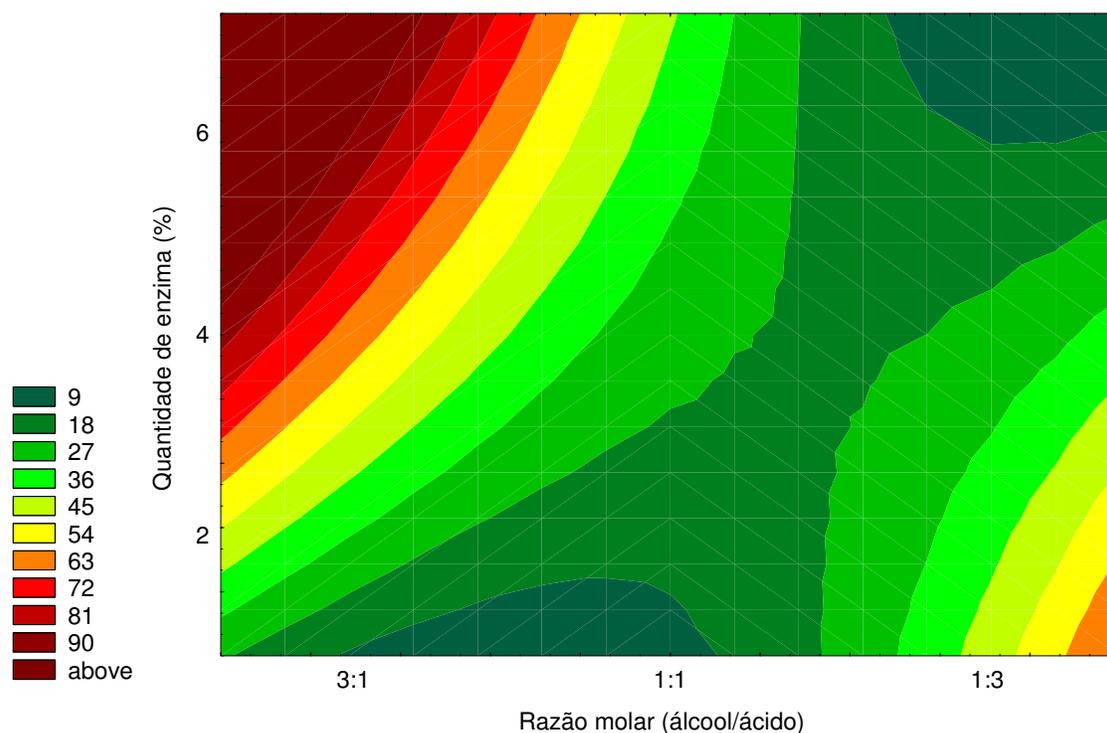


FIGURA 12 – Superfície de resposta da síntese de butirato de citronelila após 24 horas de reação

FIGURA 13 – Curva de contorno da síntese de butirato de citronelila após 24 horas de reação



Com 48 horas de reação o modelo codificado que descreve a conversão molar em função da razão molar entre os substratos e da quantidade de enzima resultou na EQUAÇÃO 2.

$$\text{Conversão Molar (\%)} = 46,36 - 22,51 (\text{Raz Mol}) + 17,54 (\text{Quant Enz}) - 9,15 (\text{Raz Mol} \times \text{Quant Enz})$$

A TABELA 15 demonstra a ANOVA que valida este modelo a 95% de confiança.

TABELA 15 – ANOVA da EQUAÇÃO 2

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	6849,34	3	2283,11	42,23	4,347
Resíduos	378,424	7	54,06		
Falta de Ajuste	219,704	5			
Erro Puro	158,72	2			
Total	7227,77	10			

$$R^2 = 0,94764$$

A superfície de resposta e a curva de contorno podem ser vistas nas FIGURAS 14 e 15, respectivamente.

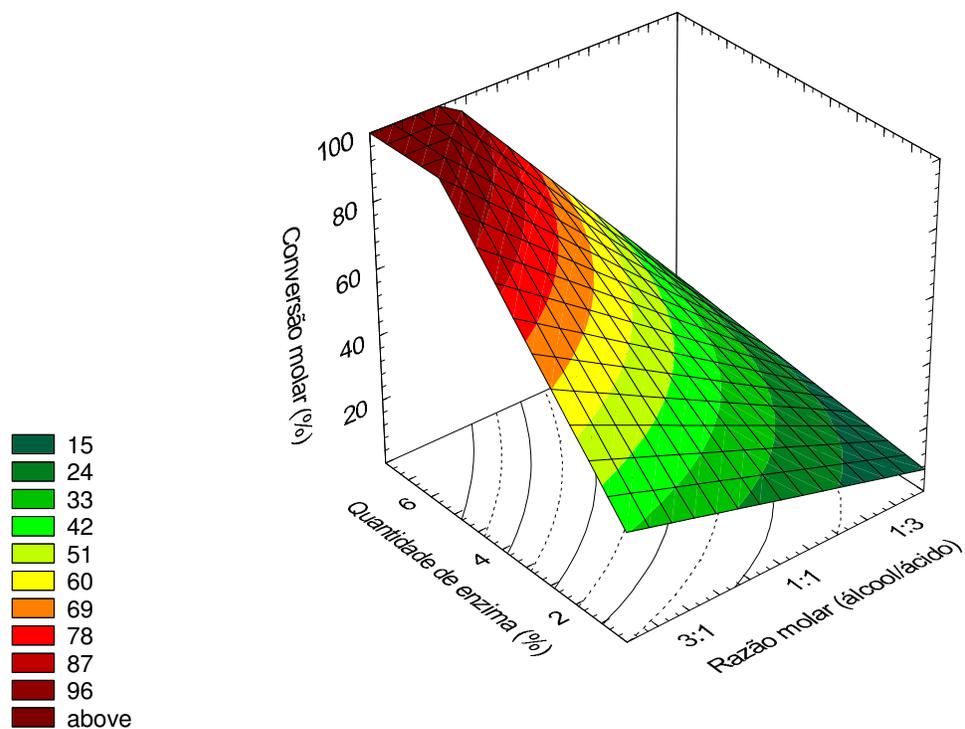


FIGURA 14 – Superfície de resposta da síntese de butirato de citronelila após 48 horas de reação

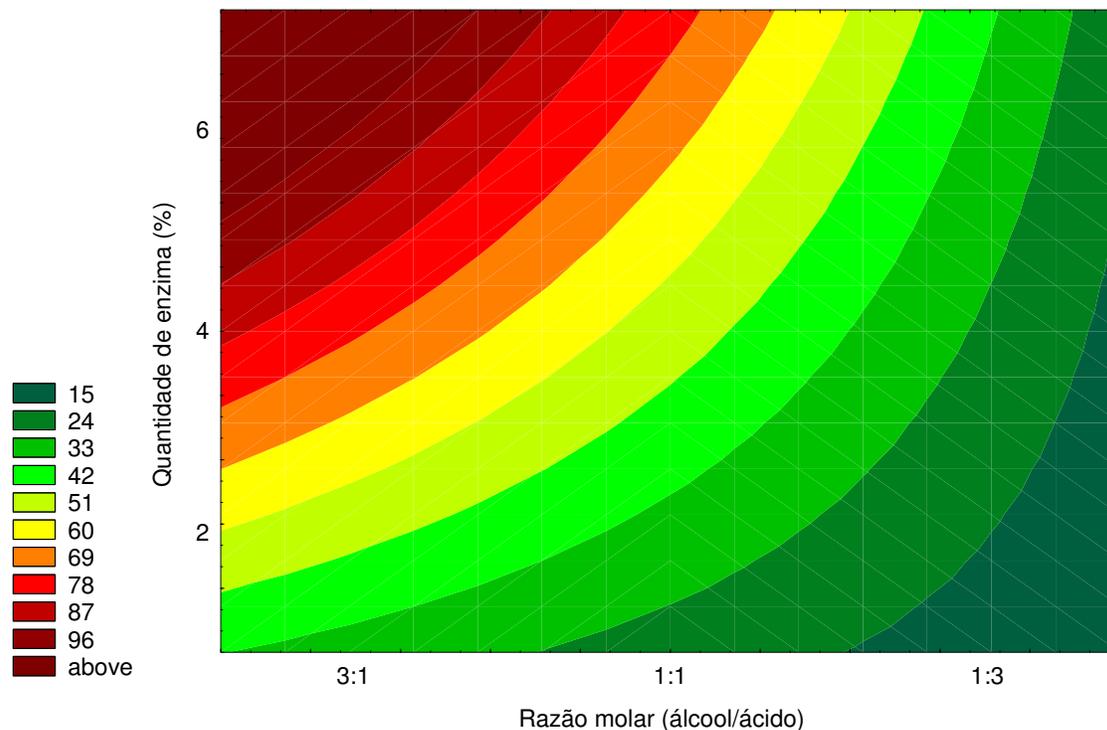


FIGURA 15 – Curva de contorno da síntese de butirato de citronelila após 48 horas de reação

Os resultados dos ensaios, os modelos obtidos e suas respectivas superfícies de resposta e curvas de contorno indicam o efeito dos fatores analisados.

Quanto a razão molar entre os substratos, chega-se a conclusão de que uma maior proporção do álcool no meio de reação é favorável à ação da lipase. Os maiores valores de conversão molar foram encontrados entre 2,41:1 e 3:1 (álcool/ácido).

Em relação ao outro fator avaliado, vê-se que quanto maior a quantidade de enzima adicionada ao meio, maior a taxa de reação alcançada, principalmente para valores acima de 4%.

Nas condições acima descritas, pode-se observar valores de conversão molar maiores do que os anteriormente obtidos no mesmo tempo de reação (TABELA 12).

Portanto, diminuiu-se o tempo de reação necessário para se atingir valores em torno de 70% de esterificação.

5.3.2. Valerato de Citronelila

O mesmo planejamento experimental foi traçado para a síntese de valerato de citronelila e suas respostas observadas estão na TABELA 16.

TABELA 16 – Resultados observados para síntese do valerato de citronelila utilizando planejamento fatorial completo

Ensaio	Razão Molar	Quantidade de Enzima	Conversão Molar (%)	Conversão Molar (%)
			24 horas	48 horas
1	-1 (2,41:1)	-1 (1,88%)	19,7	58,8
2	+1 (1:2,41)	-1 (1,88%)	30,3	11,6
3	-1 (2,41:1)	+1 (6,12%)	91,5	75,8
4	+1(1:2,41)	+1 (6,12%)	12,7	52,9
5	-1,41 (3:1)	0 (4%)	75,1	50,9
6	+1,41 (1:3)	0 (4%)	4,77	21,9
7	0 (1:1)	-1,41 (1%)	0,297	4,15
8	0 (1:1)	+1,41 (7%)	66,7	81,5
9	0 (1:1)	0 (4%)	28,0	65,9
10	0 (1:1)	0 (4%)	37,5	72,7
11	0 (1:1)	0 (4%)	28,6	51,1

Após 24 horas de reação o modelo codificado encontrado que descreve a reação é expresso na forma da EQUAÇÃO 3.

$$\text{Conversão Molar (\%)} = 30,92 - 20,96 (\text{Raz Mol}) + 18,51 (\text{Quant Enz}) - 22,35 (\text{Raz Mol} \times \text{Quant Enz})$$

Também neste caso, a validade do modelo foi comprovada com 99% de probabilidade pela ANOVA (TABELA 17) e, por isso, sua superfície de resposta e curva de contorno foram traçadas (FIGURAS 16 e 17, respectivamente).

TABELA 17 – ANOVA da EQUAÇÃO 3

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	8253,891	3	2751,297	37,78	4,347
Resíduos	509,6926	7	72,81323		
Falta de Ajuste	453,0859	5			
Erro Puro	56,60667	2			
Total	8763,584	10			

$R^2 = 0,94184$

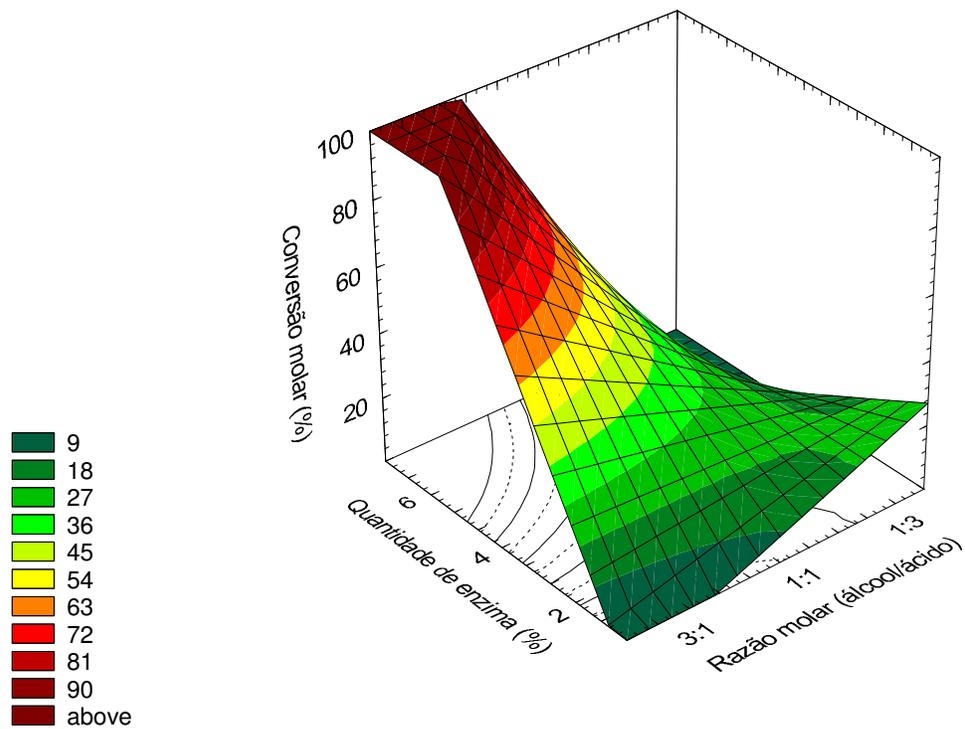


FIGURA 16 – Superfície de resposta da síntese de valerato de citronelila após 24 horas de reação

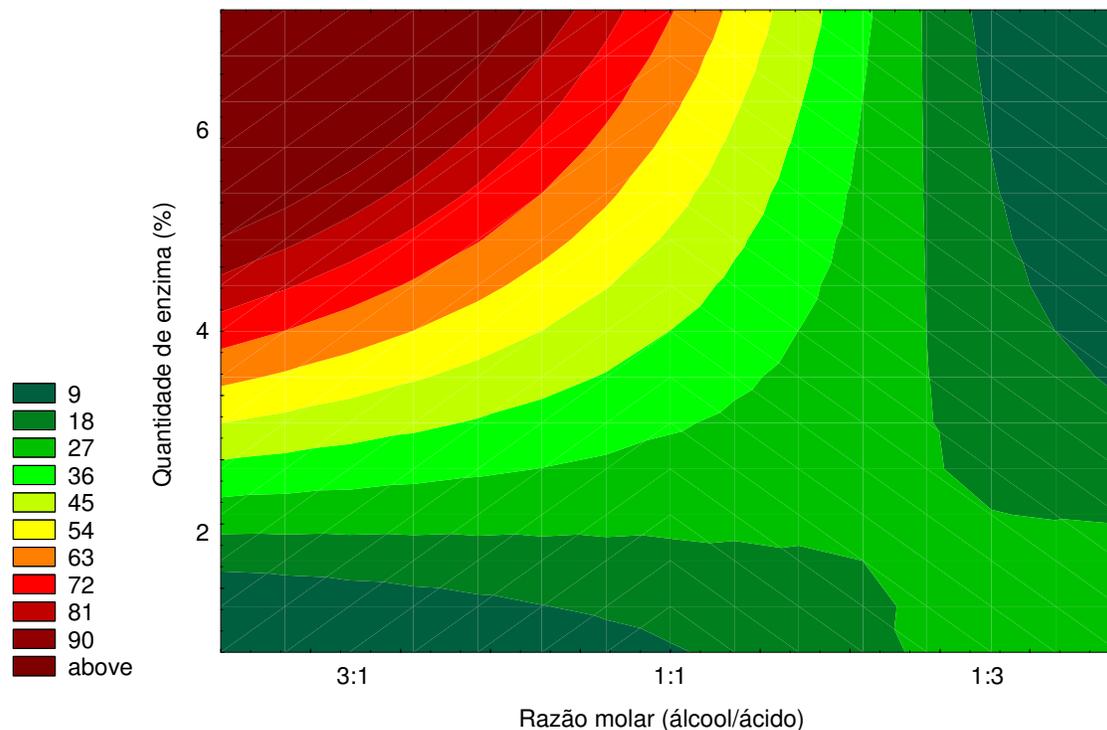


FIGURA 17 – Curva de contorno da síntese de valerato de citronelila após 24 horas de reação

Quando a reação atingiu 48 horas o novo modelo codificado passou para EQUAÇÃO 4, sendo validado pela ANOVA (TABELA 18) com 83% de confiança.

Conversão Molar (%) = 56,02 – 13,89 (Raz Mol) – 8,62 (Raz Mol)² + 20,96 (Quant Enz)

TABELA 18 – ANOVA da EQUAÇÃO 4

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	5517,76	3	1839,253	9,45	4,347
Resíduos	1361,8	7	194,543		
Falta de Ajuste	1117,86	5			
Erro Puro	243,947	2			
Total	6879,57	10			

$$R^2 = 0,80205$$

As FIGURAS 18 e 19 são, respectivamente, a superfície de resposta e a curva de contorno.

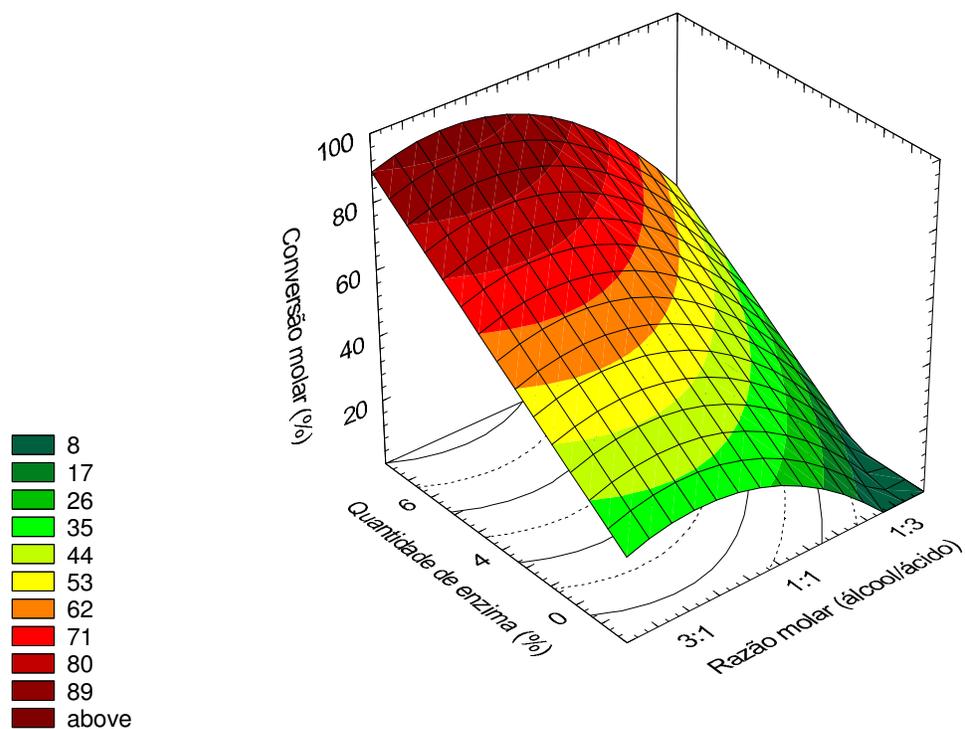


FIGURA 18 – Superfície de resposta da síntese de valerato de citronelila após 48 horas de reação

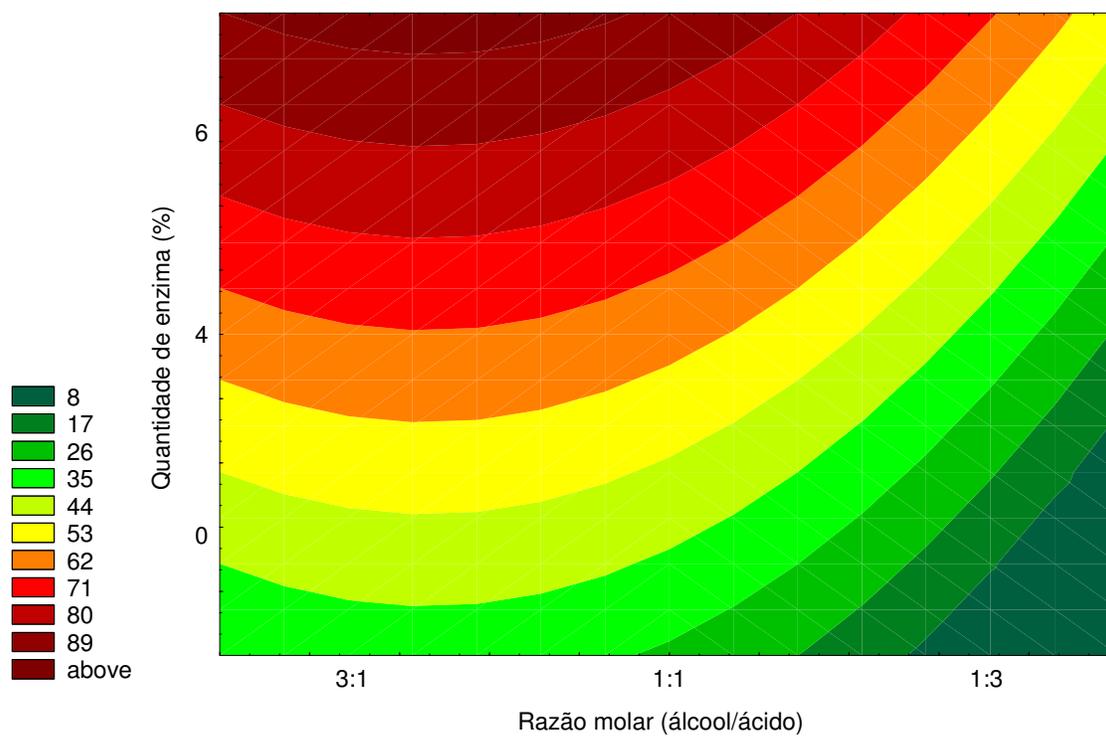


FIGURA 19 – Curva de contorno da síntese de valerato de citronelila após 48 horas de reação

O comportamento da lipase de *Rhizopus* sp na esterificação do citrionelol parece ser semelhante tanto para o ácido butírico quanto para o valérico.

Maior quantidade de álcool é requerida em relação a quantidade de ácido para aumentar a catálise da formação do éster pela enzima. Também é necessária uma maior quantidade de lipase para aumentar a produtividade.

Outro fator comum foi a possibilidade de diminuição do tempo de reação atingindo melhores valores de conversão molar.

CHENG *et al* (2003) analisaram detalhadamente a taxa de reação da tiotransesterificação com a variação da atividade de água e da concentração do álcool e propuseram que a água e o álcool podem agir como modificadores na manipulação do centro ativo da enzima, além dos seus já conhecidos papéis de inibidora da lipase e acceptor acila.

As lipases microbianas produzidas por *Geotrichum* sp e *Rhizopus* sp foram preparadas e testadas como catalisadores da esterificação do álcool isoamílico com ácido butírico em meio livre de solvente por MACEDO, PASTORE *et al* (2003). A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para otimizar este processo, em relação às variáveis importantes da reação (razão molar dos substratos, temperatura e concentração da lipase). As variáveis razão molar dos substratos e concentração de lipase foram as mais significativas no processo. O aumento na concentração de álcool de 1:2 para 4:1 causou um decréscimo no rendimento de até 18,45% depois de 48 horas de reação, e a variação da concentração de lipase de 1 para 10% causou um acréscimo no rendimento de até 32,2%. As condições ótimas encontradas para atingir o rendimento máximo de esterificação (75%) são: razão molar dos substratos – 1,5:1; concentração de lipase – 5,5% (p/p); e 40°C, em 48 horas de reação.

A produção do acetato de isoamila foi investigada usando lipases imobilizadas de *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica* por esterificação do ácido acético com álcool isoamílico em meio livre de solvente. A razão molar ácido-álcool, o tipo e quantidade de enzima, o tempo de reação, a temperatura e a rotação do *shaker* foram escolhidos como os parâmetros a serem analisados. A produção do éster foi máxima com razão molar 1:2 (ácido-álcool), 5% de enzima (em relação à massa de reagentes), 30°C e 150 rpm para Novozym 435. Sob estas condições, 6 horas de reação foram suficientes para atingir alta concentração do produto de interesse (380g/L) e conversão (80%) (GÜVENÇ, 2002).

YADAV e LATHI (2003) usaram lipases para a síntese de isobutirato de butila por esterificação do ácido butírico com *n*-butanol. Os efeitos de vários parâmetros foram estudados para deduzir a cinética e o mecanismo da reação. A enzima Novozym 435 foi a que apresentou melhor eficiência de catálise e o heptano foi o melhor solvente. Com quantidades equimolares de reagentes em heptano, a Novozym 435 atingiu 56% de conversão a 30°C em 6 horas.

5.4. Imobilização da Enzima e Otimização

Foi realizada a imobilização da lipase de *Rhizopus* sp em celite com dois objetivos principais. O primeiro de avaliar o possível aumento na capacidade catalítica da enzima como observado em diversos trabalhos na literatura devido à proteção oferecida pelo suporte à enzima em relação ao meio. O segundo de testar a reutilização desta enzima em diversos ciclos (bateladas) de esterificação. Ambos os objetivos da imobilização podem ser entendidos levando-se em consideração os benefícios econômicos, caso estes sejam alcançados.

Utilizou-se o mesmo planejamento experimental já descrito nas etapas anteriores para a avaliação da capacidade catalítica da enzima imobilizada sobre celite. Os resultados, para 24 horas de reação, podem ser analisados na TABELA 19.

TABELA 19 – Resultados observados para síntese do butirato e do valerato de citronelila por lipase imobilizada após 24 horas utilizando planejamento fatorial completo

Ensaio	Razão Molar	Quantidade de Enzima	Conversão Molar (%) butirato de citronelila	Conversão Molar (%) valerato de citronelila
1	-1 (2,41:1)	-1 (1,88%)	20,7	100
2	+1 (1:2,41)	-1 (1,88%)	8,54	75,0
3	-1 (2,41:1)	+1 (6,12%)	100	100
4	+1(1:2,41)	+1 (6,12%)	35,1	87,9
5	-1,41 (3:1)	0 (4%)	100	82,4
6	+1,41 (1:3)	0 (4%)	30,3	31,4
7	0 (1:1)	-1,41 (1%)	4,02	0
8	0 (1:1)	+1,41 (7%)	63,6	65,5
9	0 (1:1)	0 (4%)	59,4	45,9
10	0 (1:1)	0 (4%)	57,2	39,3
11	0 (1:1)	0 (4%)	58,8	29,5

5.4.1. Butirato de Citronelila

O modelo codificado para a lipase imobilizada na síntese do butirato de citronelila está expresso na EQUAÇÃO 5.

$$\text{Conversão Molar (\%)} = 59,64 - 21,95 (\text{Raz Mol}) + 23,76 (\text{Quant Enz}) - 14,79 (\text{Quant Enz})^2 - 13,19 (\text{Raz Mol} \times \text{Quant Enz})$$

Este modelo tem sua validade comprovada pela ANOVA da TABELA 20, tendo 99% de probabilidade.

TABELA 20 – ANOVA da EQUAÇÃO 3

Fonte de Variação	SQ	gl	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	10422	4	2605,503	58,24	4,534
Resíduos	268,427	6	44,73791		
Falta de Ajuste	265,841	4			
Erro Puro	2,58667	2			
Total	10690,4	10			

$$R^2 = 0,97489$$

Os efeitos da razão molar entre os substratos e da quantidade de enzima estão ilustrados nas FIGURAS 20 e 21.

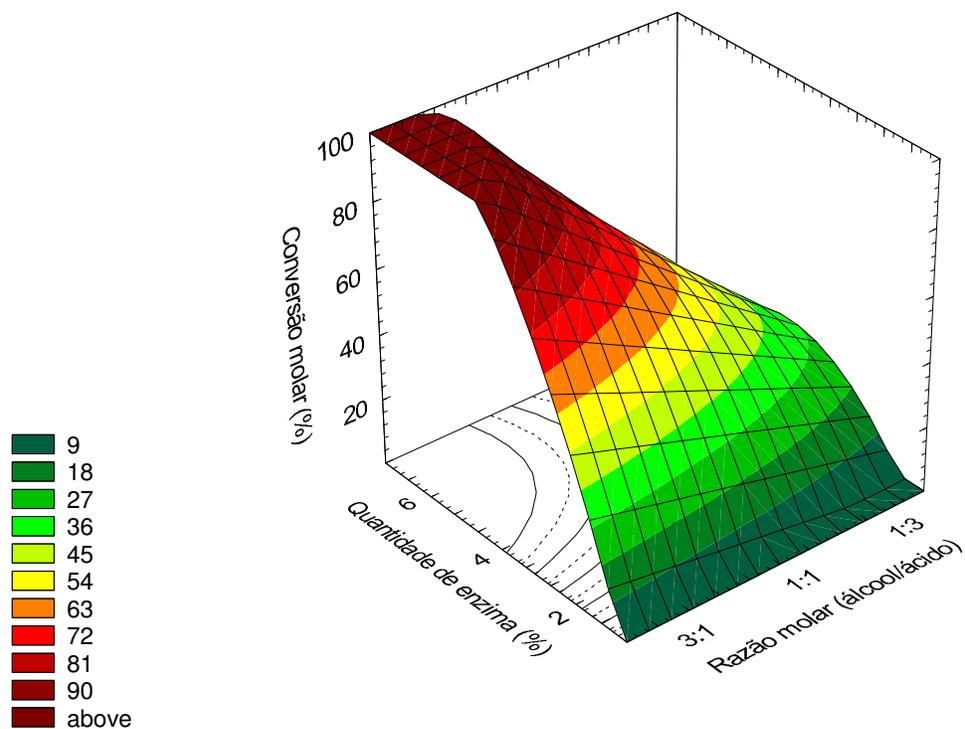


FIGURA 20 – Superfície de resposta da síntese de butirato de citronelila por lipase imobilizada

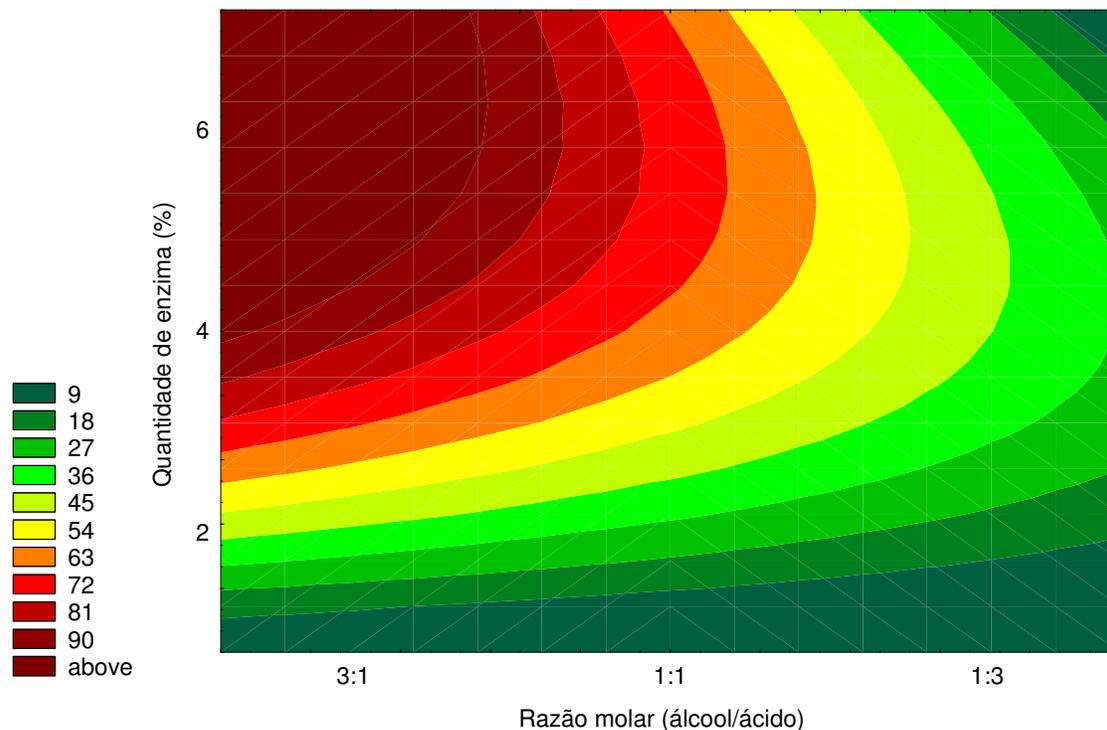


FIGURA 21 – Curva de contorno da síntese de butirato de citronelila por lipase imobilizada

Ao comparar-se estes dados obtidos com os da enzima livre (TABELA 13) chega-se a duas conclusões principais. Inicialmente, nota-se os mesmos perfis de síntese anteriormente observados, ou, melhor atividade catalítica com maior proporção de álcool do que ácido e com maior quantidade de enzima.

O resultado mais importante deste experimento foi o maior rendimento obtido quando comparado com o da enzima livre. A enzima imobilizada apresentou valores de conversão molar que chegaram a 100% em 24 horas, o que representa um aumento de 43,2% na atividade em relação à enzima livre nas mesmas condições de estudo.

5.4.2. Valerato de Citronelila

O modelo codificado para a síntese do valerato de citronelila não pôde ser estatisticamente validado.

Porém, observando-se os valores das TABELAS 19 e 16, constata-se mais uma vez o maior rendimento de catálise quando se utiliza maior proporção de álcool e maior concentração de enzima. Inclusive, sob algumas condições, obteve-se altos valores de conversão molar (de até 100%) em 24 horas. Neste maior valor de rendimento apresentado houve um aumento de 9,29% na esterificação nas mesmas condições.

Embora os estudos da enzima imobilizada tenham sido conduzidos apenas em meio com solvente orgânico, seus resultados são significativos pois numa parte anterior do trabalho foram verificadas as mesmas atividades catalíticas na presença ou ausência de solvente utilizando a enzima livre.

A lipase de *Rhizopus japonicus* foi imobilizada sobre celite por KHARE *et al* (2000). A enzima imobilizada aumentou sua atividade de transesterificação em 6,34 unidades em relação à enzima nativa. Entretanto, não houve melhora na estabilidade térmica da enzima imobilizada.

YADAV e TRIVEDI (2003) estudaram a transesterificação do *n*-octanol com acetato de vinila a 30°C como uma reação modelo para o emprego de diferentes lipases como catalisadores tais como lipase de *Pseudomonas* sp imobilizada sobre diatomite, lipase livre de *Candida rugosa*, Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em macro-poros de resina poliacrílica) e Lipozyme IM-20 (lipase de *Mucor miehei* imobilizada em resina aniônica). Novozym 435 mostrou-se o catalisador mais ativo em heptano como solvente, obtendo-se 82% de conversão em 90 minutos usando quantidades equimolares de reagentes com 0,833 g/L de enzima. A transesterificação de outros álcoois como *n*-decanol, álcool benzílico, álcool cinamílico, 2-etil-1-hexanol, álcool 1-fenil-etílico e álcool 2-fenil-etílico também foram estudadas com acetato de vinila. A ordem da reatividade de transesterificação do acetato de vinila com estes álcoois na presença de Novozym 435 foi: *n*-octanol > *n*-decanol > álcool benzílico > álcool cinamílico > 2-etil-1-hexanol > álcool 2-fenil-etílico > álcool 1-fenil-etílico.

5.5. Avaliação da Reutilização da Enzima Imobilizada

Para se testar a reutilização da enzima imobilizada foi escolhido o ensaio 3 dos planejamentos anteriormente apresentados pois foi o que resultou em melhores rendimentos de esterificação. Este ensaio corresponde à razão molar entre os substratos de 2,41:1 (álcool/ácido) e 6,12% de enzima em relação à massa de reagentes. Cada ciclo (batelada) foi de 24 horas de reação. Foram analisados 6 ciclos de reutilização da preparação da lipase bruta de *Rhizopus* sp e da Lipozyme IM 20 (lipase comercial, marca NOVO) na síntese do butirato e valerato de citronelila. As porcentagens de conversão molar de cada ciclo na síntese dos ésteres pelas lipases mencionadas estão demonstradas nas FIGURAS 22 e 23.

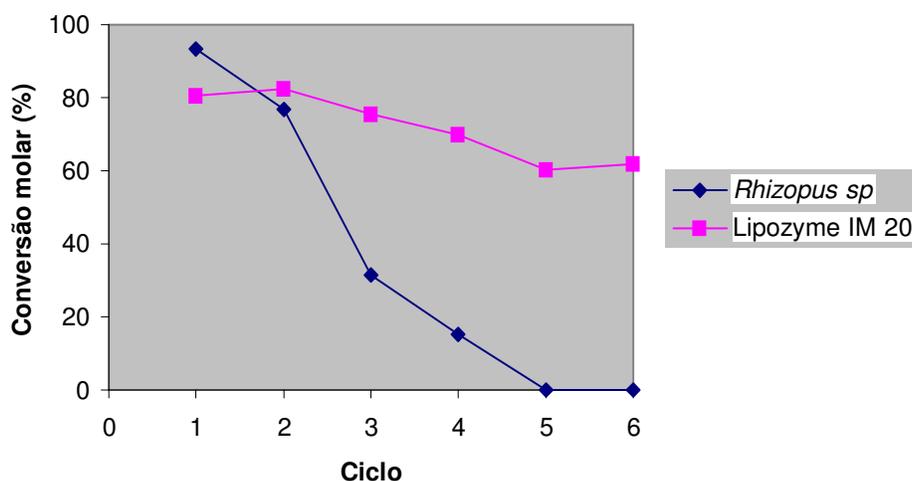


FIGURA 22 – Reutilização da enzima imobilizada na síntese do butirato de citronelila

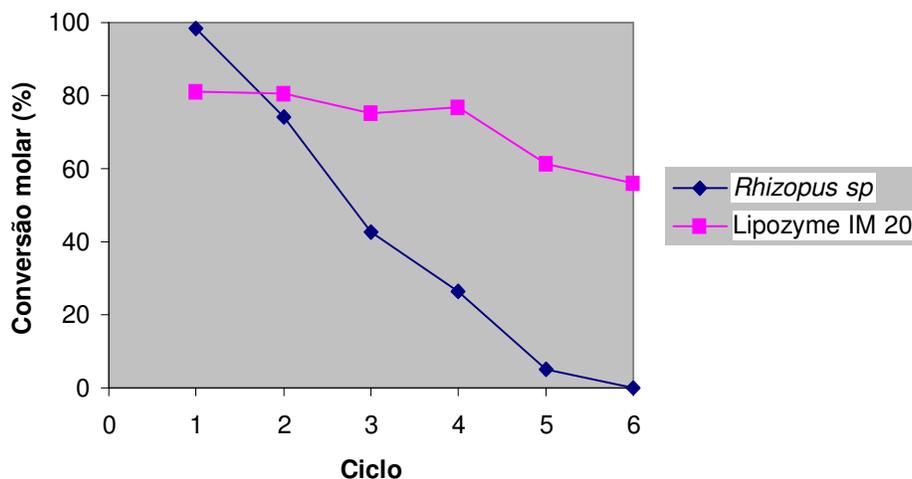


FIGURA 23 – Reutilização da enzima imobilizada na síntese do valerato de citronelila

Estes gráficos nos conduzem à constatação de que a imobilização da lipase de *Rhizopus sp* em celite não apresentou vantagens no que se refere à possibilidade de sua reutilização almejando a diminuição dos custos do processo. Após apenas 3 ciclos de aplicação, a sua atividade caiu para valores em torno de 30 e 40% de esterificação na produção do butirato e do valerato de citronelila, respectivamente.

A preparação de lipase bruta imobilizada de *Rhizopus sp* somente apresentou maior atividade de esterificação do que a Lipozyme IM 20 no primeiro ciclo de uso. Ainda no segundo ciclo, sua atividade foi levemente reduzida mas ainda pode ser comparada com a da lipase comercial. Entretanto, a partir da terceira batelada de aplicação, sua atividade diminui consideravelmente tornando sua utilização insatisfatória.

A Lipozyme IM 20 mostrou possuir mais estabilidade neste tipo de procedimento sendo capaz de catalisar conversões molares de aproximadamente 60% na sua sexta reutilização.

IVANOV *et al* (1997) imobilizaram lipase de *Pseudomonas fluorescens* sobre cinco diferentes carreadores: celite, octil-sílica, aminopropil-sílica, sílica ativada com glutaraldeído e Eupergit C250L. As atividades e estabilidades operacionais dos

catalisadores foram comparadas usando acilação enantioseletiva de (R,S)-1-feniletanol por acetato de vinila como doador acila e éter *t*-butilmetílico como meio de reação com diferentes conteúdos de água (0,038-0,97% v/v). Os carreadores acima forneceram catalisadores com diferentes atividades específicas variando da excelente 25 mmol/h*mg proteína (celite) até 0,07 mmol/h*mg proteína (sílica ativada com glutaraldeído). A lipase imobilizada com Eupergit C250L exibiu a melhor estabilidade operacional entre os catalisadores estudados, retendo 30% da sua atividade inicial depois de 11 ciclos de aplicação, cada um tendo entre 2 e 6 horas de duração.

A lipase PS de *Pseudomonas* sp foi imobilizada por adsorção e testou-se sua habilidade para catalisar a síntese de butirato de citronelila e caproato de geranila por transesterificação em *n*-hexano. Os parâmetros da reação investigados foram: quantidade de enzima, efeito da concentração de substrato, água adicionada, temperatura, tempo, solvente orgânico e reutilização da enzima. Rendimentos altos como 96 e 99% foram obtidos para o butirato de citronelila e para o caproato de geranila, respectivamente, com aproximadamente 15% (p/p) de enzima em relação à massa de reagentes. Quantidades crescentes de álcool terpênico inibiram a atividade da lipase, enquanto excesso de concentração do doador acila (triacilglicerol) aumentou a produção dos ésteres. Os melhores rendimentos foram obtidos em temperaturas de 30 a 50°C em 24 horas de incubação. Alcançou-se rendimentos de 90 e 99% para os ésteres de citronelila e geranila, respectivamente, com 2% de água adicionada. Os solventes com $\log P \geq 2,5$ apresentaram os maiores rendimentos de conversão. A lipase permaneceu ativa após 12 ciclos de uso (YEE *et al*, 1997).

CLAON *et al* (1994) estudaram os parâmetros reacionais que afetam a síntese enzimática do acetato de citronelila por esterificação direta. Os meio de reação foram preparados usando 2 mL de *n*-hexano desidratado, 0,1 M de citronelol, 0,1 M de ácido acético, 10% (p/p) de lipase de *Candida antarctica* SP435, incubada a 30°C e 200 rpm por 24 horas. Obteve-se conversão molar de 98% depois de 14 horas de incubação. Concentrações de ácido acético > 0,30 M, inibiram a atividade de esterificação. A temperatura ótima foi 20°C, gerando um rendimento de 98%. Adição de água ao meio de

reação diminui a atividade de esterificação. Os maiores rendimentos foram observados para solventes com $\log P \geq 0,85$. A enzima foi capaz de apresentar 95,6% de conversão mesmo depois da décima reutilização, demonstrando sua estabilidade e eficiência sob as condições estudadas.

5.6. Estudo da Enantioseletividade da Lipase de *Rhizopus* sp

A preparação bruta de lipase de *Rhizopus* sp foi capaz de esterificar o (R,S)-2-octanol de maneira enantioseletiva. A lipase catalisou o (R)-enantiômero do álcool com maior eficiência do que o (S)-enantiômero tanto em meio livre do solvente orgânico como na presença do solvente hexano (LOZANO, 2001).

Álcoois terciários quirais e seus ésteres representam importantes compostos de aroma. Infelizmente, eles são substratos para poucas lipases/esterases e a enantioseletividade é frequentemente muito baixa. KRISHNA *et al* (2002) relataram a transesterificação altamente enantioseletiva do álcool terciário 2-fenilbut-3-in-2-ol usando lipase A de *Candida antarctica* (CAL-A). Sob condições otimizadas, o acetato correspondente foi obtido com 94% ee em 35% de conversão, apresentando um fator de enantioseletividade de $E=65$. Entretanto, a hidrólise enantioseletiva satisfatória do acetato racêmico não foi possível devido a sua propensão a autohidrólise.

A esterificação do ácido 2-(4-clorofenóxi) propiônico racêmico e n-butanol por lipase de *Candida cylindracea* em diferentes meios de reação apresentou enantioseletividade reversível, pró R-enantiômero, em n-hexano, isooctano, ciclohexano, tolueno e, pró S, em diclorometano, acetona, n-butanol e tetrahidrofurano (WU *et al*, 1991).

CHENG *et al* (2003) obtiveram bons resultados em termos de enantioseletividade enzimática (90% de excesso enantiomérico) na tiotransesterificação catalisada por lipase em isooctano.

Apesar de todos estes exemplos, as enzimas nem sempre apresentam resultados satisfatórios em termos de atividade, estabilidade e, principalmente, enantioseletividade. Estas propriedades podem ser otimizadas pela alteração dos substratos, do meio de reação ou por técnicas de engenharia de proteínas. As bases moleculares da enantioseletividade de uma dada enzima ainda não são completamente entendidas. Especialmente na ausência de dados estruturais, as predições sobre a enantioseletividade são quase impossíveis. É difícil prever como a enantioseletividade irá se comportar quando a sequência de aminoácidos da enzima permanece a mesma mas há mudanças na estrutura do substrato, no suporte de imobilização ou no sistema solvente (BONRSCHUEER, 2002).

A preparação de lipase bruta de *Rhizopus* sp não apresentou qualquer tendência de enantioseletividade nos estudos realizados durante este trabalho. Como todas as análises cromatográficas foram realizadas com uma coluna quiral, foi possível determinar a concentração de cada um dos dois isômeros dos ésteres formados. E em todos os experimentos efetuados não se encontrou nenhum valor de excesso enantiomérico ou enantioseletividade.

Isto significa que, pelo menos nas condições testadas, esta enzima não possui preferência pela esterificação de nenhum dos dois isômeros óticos do álcool terpênico citronelol.

6. CONCLUSÕES

A preparação bruta de lipase de *Rhizopus* sp foi a enzima com maior habilidade de esterificação do citronelol com os ácidos butírico e valérico em isooctano entre todas as lipases estudadas.

Esta enzima mostrou maior capacidade de catalisar a esterificação do álcool terpênico citronelol quanto maior a cadeia carbônica do ácido utilizado. Esta habilidade praticamente não muda em solvente orgânico (isooctano) ou em meio livre de solvente.

O rendimento da reação é maior quando se utiliza maior proporção do álcool (em torno de 3:1) e maior concentração de enzima (em torno de 6% p/p em relação à massa de reagentes).

A lipase bruta de *Rhizopus* sp teve sua atividade catalítica aumentada quando imobilizada sobre celite. Combinando-se a imobilização da enzima com as condições ótimas de razão molar entre os substratos e quantidade de enzima, pode-se atingir conversões molares da ordem de 100%. Apesar disso, esta imobilização não trouxe vantagens em relação à reutilização da enzima pois a mesma perde a sua atividade catalítica em poucos ciclos de aplicação.

A enzima estudada não demonstrou a habilidade de resolver a mistura racêmica do citronelol sendo, portanto, incapaz de fornecer uma das formas enantioméricas do éster com alto excesso enantiomérico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp.. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 32, p. 589-595, 2003.
- ADLERCREUTZ, P. Modes of using enzymes in organic media. In: KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. (Ed.). *Enzymatic reactions in organic media*. 1. ed. London: St Edimburg Press, 1996. p. 9-42.
- AKOH, C. C.; YEE, L. M. Lipase-catalysed transesterification of primary terpene alcohols with vinyl esters in organica media. *Journal of Molecula Catalysis B: Enzymatic*. v. 4, p. 149-153, 1998.
- ALCÁNTARA, A. R.; FUENTES, I. E.; SINISTERRA, J. V. *Rhizomucor miehei* lipase as the catalyst in the resolution of chiral compounds: an overview. *Chemistry and Physics of Lipids*. v. 93, p. 169-184, 1998.
- ANVISA, Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999.
- ARMSTRONG, D. W.; GILLIES, B.; YAMAZAKI, H. Natural Flavors Produced by Biotechnological Processing. In: TERANISHI, R.; BUTTERY, R. G.; SHAHIDI, F. (Ed.). *Flavor Chemistry – Trends and Developments*. ACS Symposium Series 388. American Chemical Society. Washington, DC. 1989. p. 105-120.
- BAUER, Kurt; GARBE, Dorothea. *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses*. 1. ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1985. 213 p.
- BERGER, R. *Aroma Biotechnology*. Springer. Berlin. 1995. 240 p.

- BERGER, R. *et al.* *Biotransformations in the Flavour Industry*. Current Topics in Flavours and Fragrances. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1999.
- BONSCHEUER, U. T. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 13, p. 543-547, 2002.
- BOURG-GARROS, S.; RAZAFINDRAMBOA, N.; PAVIA, A. A. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of (z)-3-hexen-1-yl acetate by direct esterification in hexane and a solvent-free medium. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 22, p. 240-245, 1998.
- CATÁLOGO *Flavors & Fragrances – Featuring Naturals*. Aldrich Chemical Company, Inc. Sigma-Aldrich. 1977.
- CATÁLOGO Fluka. *Reagentes para Laboratório e Reagentes para Análises*. 1999/2000.
- CHEN, J. -P. Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. v. 82, nº 4, p. 404-407, 1996.
- CHENG, Y. -C.; TSAI, S. -W. Effects of water activity and alcohol concentration on the kinetic resolution of lipase-catalyzed acyl transfer in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 32, p. 362-368, 2003.
- CHIANG, W. -D.; CHANG, S. -W.; SHIEH, C. -J. Studies on the optimized lipase-catalyzed biosynthesis of *cis*-3-hexen-1-yl acetate in *n*-hexane. *Process Biochemistry*. v. 38, p. 1193-1199, 2003.
- CHOWDARY, G. V.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis. *Process Biochemistry*. v. 36, p. 331-339, 2000.

- CLAON, P. A.; AKOH, C. C. Enzymatic synthesis of geraniol and citronellol esters by direct esterification in *n*-hexane. *Biotechnology Letters*. v. 15, nº 12, p. 1211-1216, 1993.
- CLAON, P. A.; AKOH, C. C. Effect of reaction parameters on SP435 lipase-catalyzed synthesis of citronellyl acetate in organic solvent. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 16, p. 835-838, 1994.
- COSTA, V. S. R. *Produção, purificação e caracterização bioquímica de lipase de uma nova linhagem de Rhizopus sp.* 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- CROTEAU, R. Biosynthesis of Cyclic Monoterpenes. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. (Ed.). *Biogeneration of Aromas*. ACS Symposium Series 317. American Chemical Society. Washington, DC. 1986. p. 134-156.
- ENGEL, K. H. Lipases: Useful Biocatalysts for Enantioselective Reactions of Chiral Flavor Compounds. In: TERANISHI, R.; GÜNTERT, M.; TAKEOKA, G. R. (Ed.). *Flavor Precursors – Thermal and Enzymatic Conversions*. ACS Symposium Series 490. American Chemical Society. New York. 1991. p. 21-31.
- ENGEL, K. H.; HEIDLAS, J.; ALBRECHT, W.; TRESSL, R. Biosynthesis of Chiral Flavor and Aroma Compounds in Plants and Microorganisms. In: TERANISHI, R.; BUTTERY, R. G.; SHAHIDI, F. (Ed.). *Flavor Chemistry – Trends and Developments*. ACS Symposium Series 388. American Chemical Society. Washington, DC. 1989. p. 8-22.
- ERICKSON, R. Thermal and Enzymatic Conversions of Precursors to Flavor Compounds – An Overview. In: TERANISHI, R.; GÜNTERT, M.; TAKEOKA, G. R. (Ed.).

Flavor Precursors – Thermal and Enzymatic Conversions. ACS Symposium Series 490. American Chemical Society. New York. 1991. p. 1-6.

FENAROLI, Giovanni. *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*. Handbook Editors. The Chemical Rubber Co. Cleveland. 1971. 803 p.

FONTEYN, F.; BLECKER, C.; LOGNAY, G.; MARLIER, M.; SEVERIN, M. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of citronellyl acetate in solvent-free medium. *Biotechnology Letters*. v. 16, n° 7, p. 693-696, 1994.

FOLHA DE S. PAULO, 28 de abril de 2002

GANDOLFI, R.; CONVERTI, A.; PIROZZI, D.; MOLINARI, F. Efficient and selective microbial esterification with dry micelyum of *Rhizopus oryzae*. *Journal of Biotechnology*. v. 92, p. 21-26, 2001.

GATFIELD, I. Generation of Flavor and Aroma Components by Microbial Fermentation and Enzyme Engineering Technology. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. (Ed.). *Biogeneration of Aromas*. ACS Symposium Series 317. American Chemical Society. Washington, DC. 1986. p. 310-322.

GATFIELD, I.; HAARMANN & REIMER GmbH. Enzymatic and Microbial Generation of Flavors. *Perfumer & Flavorist*. v. 20, n° 5, p. 5-14, 1995.

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

- GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOĞLU, Ü. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process Biochemistry*. v. 38, p. 379-386, 2002.
- HAMSAVENI, D. R.; PRAPULLA, S. G.; DIVAKAR, S. Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. *Process Biochemistry*. v. 36, p. 1103-1109, 2001.
- HARTMANN, H.; HAARMANN & REIMER GmbH. Flavors... A Business with Taste! *Perfumer & Flavorist*. v. 20, n° 5, p. 35-42, 1995.
- IVANOV, A. E.; SCHNEIDER, M. P. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 3, p. 303-309, 1997.
- JAEGER, K. -E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Tibtech*. v. 16, p. 396-403, 1998.
- JAEGER, K. -E.; THORSTEN, E. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 13, p. 390-397, 2002.
- JOHNSON-GREEN, Perry. *Introduction to food biotechnology*. 1. ed. New York: CRC Press LLC, 2002. 293 p.
- JUVANCZ, Z.; SZEJTLI, J. The role of cyclodextrins in chiral selective chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 21, n° 5, p. 379-388, 2002.
- KATZ, I. *Biogenesis of Aromas: In Summation*. Biogenesis of Aromas. ACS Symposium Series 317. American Chemical Society. Washington, DC. 1986.

- KANERVA, L. T. Hydrolases-catalysed asymmetric and other transformations of synthetic interest. In: KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. (Ed.). *Enzymatic reactions in organic media*. 1. ed. London: St Edimburg Press, 1996. p. 170-223.
- KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Enzyme immobilization. In: REHM, H. -J.; REED, G. (Ed.). *Biotechnology*. 1. ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1987. v. 7a, p. 347-404.
- KHARE, S. K.; NAKAJIMA, M. Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil. *Food Chemistry*. v. 68, p. 153-157, 2000.
- KRASNOBAJEV, V. *Terpenoids*. Biotechnology – A Comprehensive Treatise in 8 Volumes. Volume 6A (Biotransformations). Verlag Chemie. Weinheim. 1984.
- KRINGS, U.; ABRAHAM, B.; BERGER, R. Plant Impact Volatiles from Higher Fungi: A Biotechnological Perspective. *Perfumer & Flavorist*. v. 20, n° 5, p. 79-86, 1995.
- KRISHNA, S. H. Developments and trends in enzymes catalysis in nonconventional media. *Biotechnology Advances*. v. 20, p. 239-267, 2002.
- KRISHNA, S. H.; PERSSON, M.; BORNSCHEUER, U. T. Enantioselective transesterification of a tertiary alcohol by lipase A from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Asymmetry*. v. 13, p. 2693-2696, 2002.
- LABORET, F.; PERRAUD, R. Lipase-mediated biosynthesis of methyl propionate in modified organic media. In: BIOFLAVOUR 95, 1., 1995, Dijon. Lectures and posters. Paris: INRA Editions, 1995. p. 355.

- LEE, Byong H. *Fundamentals of food biotechnology*. 1. ed. New York: VCH Publishers, 1996. 431 p.
- LINKO, Y. -Y.; LÄMSÄ, M.; WU, X.; UOSUKEINEN, E.; SEPPÄLÄ, J.; LINKO, P. Biodegradable products by lipases biocatalysis. *Journal of Biotechnology*. v. 66, p. 41-50, 1998.
- LOZANO, M. *Estudo da Propriedade de Esterificação Enantioselectiva da Lipase de Rhizopus sp.* 112 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- LUGAY, J. Biogenesis of Aromas: An Industrial Perspective. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. (Ed.). *Biogenesis of Aromas*. ACS Symposium Series 317. American Chemical Society. Washington, DC. 1986. p. 11-17.
- LUTZ, D.; HUFFER, M.; GERLACH, D.; SCHREIER, P. Carboxylester-Lipase-Mediated Reactions – A Versatile Route to Chiral Molecules. In: TERANISHI, R.; GÜNTERT, M.; TAKEOKA, G. R. (Ed.). *Flavor Precursors – Thermal and Enzymatic Conversions*. ACS Symposium Series 490. American Chemical Society. New York. 1991. p. 32-45.
- MACEDO, G. *Síntese de Ésteres de Aroma por Lipases Microbianas em Meio Livre de Solvente Orgânico*. 143 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- MACEDO, G. A.; LOZANO, M. M. S.; PASTORE, G. M. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus sp.* *Electronic Journal of Biotechnology*. v. 6, nº 1, 2003. Disponível em: <http://www.ejb.org/content/vol6/issue1/full/2>

- MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; RODRIGUES, M. I. Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus* sp. lipase with a central composite rotatable design. *Process Biochemistry*. v. (ARTICLE IN PRESS), p. 1-7, 2003.
- MARRIOT, R. Biogenesis of Blackcurrant (*Ribes nigrum*) Aroma. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. (Ed.). *Biogeneration of Aromas*. ACS Symposium Series 317. American Chemical Society. Washington, DC. 1986. p. 184-192.
- NETO, Benício de Barros; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2002. 401 p.
- NISHIO, T.; TAKAHASHI, K.; YOSHIMOTO, T.; KODERA, Y.; SAITO, Y.; INADA, Y. Terpene alcohol ester synthesis by polyethylene glycol-modified lipase in benzene. *Biotechnology Letters*. v. 9, nº 3, p. 187-190, 1987.
- PICKENHAGEN, W. Enantioselectivity in Odor Perception. In: TERANISHI, R.; BUTTERY, R. G.; SHAHIDI, F. (Ed.). *Flavor Chemistry – Trends and Developments*. ACS Symposium Series 388. American Chemical Society. Washington, DC. 1989. p. 151-157.
- POOLE, Colin. *et al. Chromatography Today*. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. 1991. 1026 p.
- SANTANIELLO, E.; FERRABOSCHI, P.; GRISENTI, P. Lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: applications to the preparation of enantiomerically pure compounds. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 15, p. 367-382, 1993.

- SCHARPF, L.; SEITZ, E.; MORRIS, J.; FARBOOD, M. Generation of Flavor and Odor Compounds through Fermentation. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. (Ed.). *Biogeneration of Aromas*. ACS Symposium Series 317. American Chemical Society. Washington, DC. 1986. p. 323-346.
- SCHREIER, P.; WINTERHALTER, P. Precursors of Papaya (*Carica papaya*, L) Fruit Volatiles. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. (Ed.). *Biogeneration of Aromas*. ACS Symposium Series 317. American Chemical Society. Washington, DC. 1986. p. 85-98.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; WU, X.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. v. 19, p. 627-662, 2001.
- SHAW, J. -F.; WU, H. -Z.; SHIEH, C. -J. Optimized enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate by direct esterification. *Food Chemistry*. v. 38, p. 1193-1199, 2003.
- SHELDON, R. Chirotechnology: Designing Economic Chiral Synthesis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 67, p. 1-14, 1996.
- SOSTMANN, K.; SCHREIER, P. Esterification in non-aqueous medium by porcine pancreatic extract: which enzymes are responsible? In: BIOFLAVOUR 95, 1., 1995, Dijon. Lectures and posters. Paris: INRA Editions, 1995. p. 351.
- SOULTANI, S.; ENGASSER, J. -M.; GHOUL, M. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatica*. v. 11, p. 725-731, 2001.

- STOFBERG, J. Legislative and Consumer Perception of Biologically Generated Aroma Chemicals. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. (Ed.). *Biogeneration of Aromas*. ACS Symposium Series 317. American Chemical Society. Washington, DC. 1986. p. 2-10.
- STRAUSS, C.; WILSON, B.; GOOLEY, P.; WILLIAMS, P. Role of Monoterpenes in Grape and Wine Flavor. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. (Ed.). *Biogeneration of Aromas*. ACS Symposium Series 317. American Chemical Society. Washington, DC. 1986. p. 222-242.
- SUPELCO (Application). Note 114. *Chiral Gas Chromatography of Citronellal, β -Citronellol and Linalool on β -DEX™ 225 Column*. Sigma-Aldrich Co. 1998.
- SUPELCO. Bulletin 877. *Chiral Cyclodextrin Capillary GC Columns*. Sigma-Aldrich Co. 1998.
- TAN, S.; APENTEN, R. K. O. Low temperature organic phase biocatalysis using psychrotroph derived lipase. In: BIOFLAVOUR 95, 1., 1995, Dijon. Lectures and posters. Paris: INRA Editions, 1995. p. 361.
- TALON, R.; ROUCHON, P.; DENOYER, M. C.; MONTEL, M. C. BERDAGUE, J. L. Production of esters by immobilized lipase of *Staphylococcus warneri*. In: BIOFLAVOUR 95, 1., 1995, Dijon. Lectures and posters. Paris: INRA Editions, 1995. p. 365.
- TORRES, C.; BERNABÉ, M.; OTERO, C. Two enzymatic procedures for the selective synthesis of malic acid monoesters. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 25, p. 753-761, 1999.

- TWEDDELL, R. J.; KERMASHA, S.; COMBES, D.; MARTY, A. Esterification and interesterification activities of lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in three different types of organic media: a comparative study. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 22, p. 439-445, 1998.
- VIEIRA, M. *Estudos da Obtenção de Ésteres por Lipase de Rhizopus sp LB-FEA-14*. Campinas. 99 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 1999.
- VULFSON, E. N. Enzymatic synthesis of food ingredients in low-water media. *Trends in Food Science & Technology*. v. 4, p. 209-215, 1993.
- VULFSON, E. N.; GILL, I.; SARNEY, D. B. Productivity of Enzymatic catalysis in non-aqueous media: new developments. In: KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. (Ed.). *Enzymatic reactions in organic media*. 1. ed. London: St Edimburg Press, 1996. p. 244-265.
- WU, S. -S.; CHU, F. -Y.; WANG, K. -T. Reversible enantioselectivity of enzymatic reactions by media. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 1, n° 7, p. 339-342, 1991.
- WU, X. Y.; JÄÄSKELÄINEN, S.; LINKO, Y. -Y. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 19, p. 226-231, 1996.
- YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases. *Biochemical Engineering Journal*. v. 16, p. 245-252, 2003.

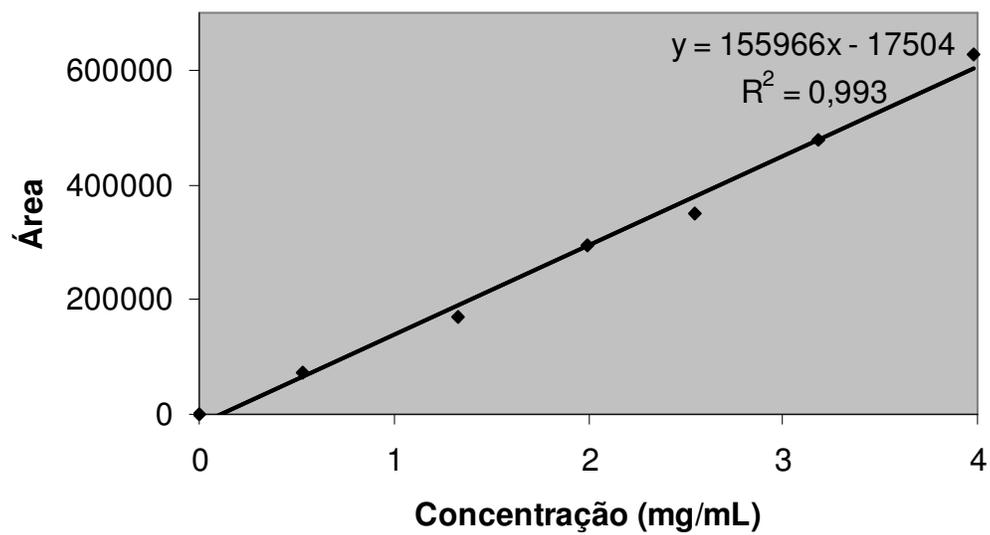
YADAV, G. D.; TRIVEDI, A. H. Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of *n*-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 32, p. 783-789, 2003.

YEE, L. N.; AKOH, C. C.; PHILLIPS, R. S. Lipase PS-catalyzed transesterification of citronellyl butyrate and geranyl caproate: effect of reaction parameters. *Journal of American Organic Chemistry Society*. v. 74, n° 3, p. 255-260, 1997.

YEE, L. N.; AKOH, C. C.; PHILLIPS, R. S. Terpene ester synthesis by lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnology Letters*. v. 17, n° 1, p. 67-70, 1995.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – Curva de Calibração Externa do (S)-(-)- β -Citronelol



ANEXO 2 – Cromatogramas obtidos

