



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



RUBENS BISATTO

POLIÉSTERES VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA HETEROGÊNEA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Prof. Dr. Cesar Petzhold

Orientador

Porto Alegre, Setembro de 2012

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre março/2010 e setembro/2012, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor Cesar Liberato Petzhold. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Rosane Angélica Ligabue
Curso de Química
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Dimitrios Samios
Instituto de Química
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Marly Antonia Maldaner Jacobi
Instituto de Química
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold

Rubens Bisatto

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade na execução da tese de mestrado.

À família pelo apoio e compreensão.

Ao orientador Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold.

Ao apoio do Prof. Dr. Luis Joaquim Pina da Fonseca da Universidade de Lisboa.

Aos colegas Ana Carolina Pfluck e Diego Miotto Zanolla pelo vasto apoio na execução dos experimentos.

À todos colegas do laboratório K215.

Ao Silmar Balsamo Barrios, cujos resultados prévios do seu trabalho possibilitaram a dissertação desta tese.

À Killing.

À banca.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	06
LISTA DE TABELAS	09
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 ENZIMAS	14
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS	17
2.3 MECANISMO DE ATUAÇÃO	18
2.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA	19
2.5 MECANISMO DE REAÇÃO PARA MAIS DE UM SUBSTRATO	21
2.6 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA	22
2.6.1 Efeito do pH	22
2.6.2 Efeito da temperatura	23
2.7 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA	24
2.7.1 Inibição reversível	24
2.7.2 Inibição irreversível	25
2.8 IMOBILIZAÇÃO	26
2.8.1 Métodos que envolvem interação química enzima – suporte	27
2.8.2 Métodos de “confinamento” ou encapsulação	28
3 LIPASES	28
3.1 <i>CANDIDA ANTARTICA</i> LIPASE B E A NOVOZYM 435	29
3.2 BIOCATALÍSE NÃO CONVENCIONAL	32
3.3 POLIÉSTERES A PARTIR DE ENZIMAS	33
4 POLIÉSTERES E RESINAS ALQUÍDICAS	36
5 OBJETIVOS	39
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
6 PARTE EXPERIMENTAL	40
6.1 ATIVIDADE BIOCATALÍTICA	40
6.2 REAÇÕES DE ALCOÓLISE	43

6.3 REAÇÕES DE POLICONDENSAÇÃO ENZIMÁTICA	43
6.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	45
6.4.1 Acidez e Conversão.....	45
6.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	46
6.4.3 Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC).....	46
6.4.4 Titulação por Karl Fischer	47
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
7.1 ATIVIDADE BIOCATALÍTICA.....	47
7.2 REAÇÕES DE POLICONDENSAÇÃO.....	48
7.2.1 Influência do solvente.....	52
7.2.2 Influência do poliol.....	56
7.2.3 Influência do monômero ácido e teor de enzima.....	59
7.2.4 Avaliação das condições de processo.....	62
7.2.4.1 Sistema Fechado.....	62
7.2.4.2 Sistema Aberto.....	65
8 CONCLUSÕES	68
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Participação anual em milhões de dólares no mercado mundial de enzimas por segmento.	12
Figura 2: Diagrama de reação comparando uma reação catalisada por enzima e outra não catalisada.	14
Figura 3: Formação de ligação peptídica entre dois α -aminoácidos.	15
Figura 4: Representação dos dois tipos de estrutura secundária frequentemente encontrada em enzimas e proteínas.	16
Figura 5: Estrutura tridimensional da lipase obtida a partir do microorganismo <i>Pseudomonas cepacia</i> .	16
Figura 6: Representação de dois modelos de mecanismo catalítico: Modelo chave fechadura (a) e Modelo de ajuste induzido (b). A letra E designa a enzima; S o substrato; P ₁ e P ₂ os produtos formados.	19
Figura 7: Perfil cinético enzimático das lipases. V _{max} representa a velocidade máxima do sistema; Km representa a concentração de substrato necessária para que a velocidade seja a metade de V _{max} .	20
Figura 8: Ilustração de uma faixa de pH ótimo de uma enzima imobilizada genérica, semelhante ao comportamento observado com a Novozym 435.	23
Figura 9: Processo de inibição enzimática competitiva.	24
Figura 10: Processo de inibição enzimática anticompetitiva.	25
Figura 11: Processo de inibição enzimática mista ou não competitiva.	25
Figura 12: Mecanismo de reação de (trans)esterificação ou hidrólise das lipases.	29
Figura 13: Estrutura cristalográfica da lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> , que se assemelha a CAL B.	30
Figura 14: Microscopia eletrônica da partícula da Novozym 435 (A) e sua seção transversal (B), imobilizada através de adsorção física.	31
Figura 15: Monômero dihidroxietilhexametileno-bis-carbamato utilizado na síntese de poliuretanos.	35
Figura 16: Esquema de reação de policondensação entre diol e diácido.	36
Figura 17: Cromatograma obtido experimentalmente de um polímero alquídicico por cromatografia de exclusão por tamanho.	38

Figura 18: Esquema de reação que ilustra a hidrólise da tributirina em água, catalisada pela Novozym 435.	40
Figura 19: Indicador vermelho de fenol utilizado nas reações de hidrólise enzimática da tributirina. (I) Estrutura predominante em pH alcalino; (II) Estrutura predominante em pH ácido.	40
Figura 20: Equipamento utilizado na medição da atividade biocatalítica.	41
Figura 21: Curvas de calibração obtidas a 560 nm em função da transmitância e pH, a partir de diferentes concentrações de ácido butírico no meio.	43
Figura 22: Estrutura química de alguns dos alcoóis polifuncionais utilizados nas reações de esterificação enzimática.	44
Figura 23: Principais monômeros carboxilados utilizados nas reações de policondensação.	44
Figura 24: Cromatograma obtido por CLAE do polioli sintetizado através da reação da Glicerina com Óleo de Soja na presença de t-Butanol, catalisada pela Novozym 435.	46
Figura 25: Gráfico da atividade biocatalítica da Novozym 435 normalizada em função do tempo para diferentes solventes a 55°C.	48
Figura 26: Imagem da Novozym 435 exposta a solventes por 24 horas a 55°C. (a) Ciclohexano; (b) THF (tetrahidrofurano).	49
Figura 27: Influência dos monômeros ácido adípico (20 mmol) e 1,10-decanodiol (20 mmol) na atividade da Novozym 435 nos diferentes tipos de solvente ao longo do tempo, a 55°C.	50
Figura 28: Reação de alcoólise de triglicerídeos com glicerol e os diferentes produtos obtidos.	51
Figura 29: Resultados de conversão e massa molar (Mn) das reações de policondensação enzimática realizadas em diferentes solventes.	55
Figura 30: Variação de temperatura e proporção de solventes na reação entre ácido adípico e 1,10-decanodiol com a Novozym 435 para 7,5 mmol de monômeros. RE108de: 60°C e mistura 5:1 entre ciclohexano/THF; RE108de2: 60°C e mistura 10:1 entre ciclohexano/THF; RE108de3: 80°C e mistura 5:1 entre ciclohexano/THF; RE108de4: 60°C e mistura 3:1 entre ciclohexano/THF.	56
Figura 31: Reações de esterificação variando o monômero hidroxifuncional e os resultados de Massa Molar e Conversão.	58
Figura 32: Cromatogramas da RE208cd e o monômero Pripol utilizado.	61

Figura 33: Reações de esterificação realizadas com Pripol® e as respectivas massas molares e conversões.	62
Figura 34: Sistema reacional utilizando vaso fechado.	62
Figura 35: Índice de acidez e teor de água da RE108de avaliada ao longo do tempo.	63
Figura 36: Avaliação da conversão da RE108de e concentrações de monômeros e água, pelo procedimento “Feed Batch”, em até 48 horas de reação. Peneira molecular foi adicionada após 24 horas de reação.	64
Figura 37: Sistema (aberto) de destilação utilizado na RE108de.	65
Figura 38: Conversão e concentração dos monômeros e água da RE108de em sistema aberto, em até 48 horas de reação.	66
Figura 39: Cromatogramas obtidos por SEC da RE108de realizado em diferentes condições: (a) Sistema aberto a 80° C por “Feed Batch”; (b) Sistema fechado a 60° C por “Feed Batch”; (c) Sistema fechado a 60° C.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Vantagens e desvantagens das enzimas frente a catalisadores convencionais.	14
Tabela II: Efeito do solvente orgânico na conversão de oleatos de <i>n</i> -pentila e <i>n</i> -propila utilizando lipase de <i>Pseudomonas sp.</i>	33
Tabela III: Exemplos de trabalhos da literatura que utilizaram a biocatálise não convencional (meio não aquoso) na síntese de poliésteres e seus resultados parciais obtidos.	35
Tabela IV: Identificação numérica dos principais monômeros e solventes utilizados nas reações de policondensação enzimática.	45
Tabela V: Reações de policondensação enzimática entre poliol/1,10decanodiol e ácido adípico variando o solvente.	53
Tabela VI: Resultados das reações de esterificação variando o monômero hidroxifuncional.	57
Tabela VII: Reações de policondensação utilizando Pripol® em THF/5-hexen-1-ol.	60

RESUMO

Esta dissertação de mestrado apresenta o estudo da utilização de enzimas na síntese de poliésteres, através do uso de catálise enzimática na transesterificação de diácidos carboxílicos com polióis. O objetivo principal foi estudar a viabilidade na síntese de poliésteres a partir de diácidos carboxílicos como o ácido adípico e o Pripol[®] e polióis como: glicerol, trimetilolpropano, pentaeritritol, 1,10-decanodiol e polioli vegetal (este oriundo da reação de alcoólise entre óleo de soja e glicerol). A enzima utilizada para o processo foi a Novozym 435, obtida comercialmente. Esta se enquadra na classificação como uma hidrolase do tipo EC 3.1.1.3, mais comumente chamadas de *lipases*. Como vantagens no emprego de tais enzimas podemos destacar o menor consumo de energia e sustentabilidade ambiental no processo. Também foi avaliada a toxicidade do sistema frente às reações enzimáticas. A mistura ciclohexano/THF se mostrou a mais efetiva. Nas reações de policondensação, foi avaliada a influência do monômero hidroxilado e do monômero carboxílico, sendo que reações com ácido adípico e Pripol[®] na presença de solventes como ciclohexano/THF e THF/5-hexen-1-ol propiciaram a formação de poliésteres com massa molar numérica média (M_n) superior a 4000 Da.

ABSTRACT

This work presents the synthesis of polyesters by enzymatic catalysis for the transesterification of carboxylic diacids with polyols. The main objective was to study the feasibility for the synthesis of polyesters from carboxylic diacids as adipic acid and PRIPOL[®], and polyols such as glycerol, trimethylolpropane, pentaerythritol, 1,10-decanediol and polyol (from the enzymatic alcoholysis reaction between soybean oil and glycerol). The enzyme used in the process was the commercial Novozym 435, which is classified as hydrolase EC 3.1.1.3, more commonly called lipases. The advantages in the use of such enzymes are the lowest energy consumption and environmental sustainability in the process. We also evaluated the enzymatic toxicity in the presence of the reagents and solvents. The mixture cyclohexane / THF was the most effective. The influence of the hydroxylated and carboxylic acid monomers in the polycondensation reactions was investigated, and the reaction with adipic acid and PRIPOL[®] in the presence of solvents such as cyclohexane / THF and THF/5-hexen-1-ol enabled the formation of polyesters with mass molar number average (M_n) higher than 4000 Da.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são macromoléculas naturais, produzidas através de células vivas, cuja função é viabilizar os processos metabólicos através de sua ação catalítica.

Assim, o emprego de enzimas na síntese de materiais surge como alternativa em processos industriais. É o que já tem sido observado na preparação via processo enzimático de antibióticos semi-sintéticos, edulcorantes, tensoativos, cosméticos, lubrificantes, biodiesel, polímeros, dentre outros ^{1,2}.

A estimativa de crescimento na utilização de enzimas fez com que o mercado movimentasse em torno de US\$ 2,4 bilhões no ano de 2009. Na figura 1, pode-se avaliar a evolução nos anos de 2002, 2003 e 2004 ³. O segmento de aplicações técnicas envolve principalmente as áreas de química fina, farmacêutica, analítica.

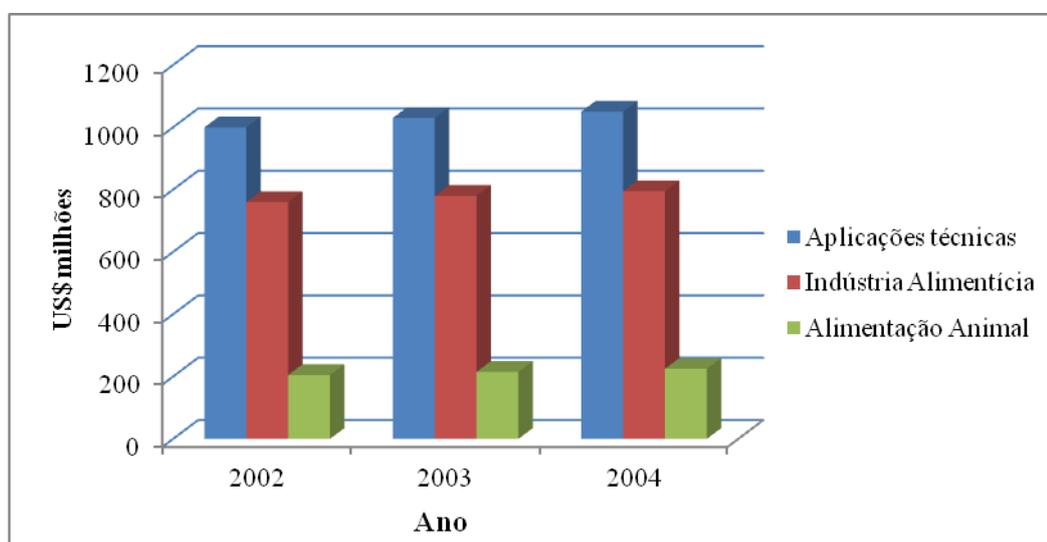


Figura 1: Participação anual em milhões de dólares no mercado mundial de enzimas por segmento ³.

As lipases são enzimas que compreendem a subclasse das hidrolases (E.C.3.1.1.3 triacilglicerol éster hidrolases) capazes de executar reações de hidrólise em grupos funcionais como ésteres ^{4,5}. Também é possível utilizá-las para reações de esterificação e transesterificação na obtenção de ésteres e poliésteres.

Apesar do ambiente natural e biológico das lipases ser o meio aquoso, esta classe de enzimas vem sendo amplamente estudada devido ao potencial de execução de reações em solventes não-aquosos (biocatálise não convencional). Apresentam alta habilidade catalítica em solventes orgânicos, disponibilidade comercial e possibilidade de utilização em larga escala de pH e temperatura (na faixa de 20 a 70°C) ⁶.

Assim, as lipases atuando como biocatalisadores surgem como alternativa para processos industriais visando menor consumo energético, maior especificidade, menor contaminação final do produto, dentre outros.

Na obtenção de polímeros, uma das possíveis aplicações das resinas de poliéster é na indústria de tintas. Estes polímeros são obtidos através de reações de policondensação de dióis com diácidos. No processo de síntese, é necessária a utilização de metais de transição para acelerar a reação. Octoatos de lítio são utilizados na alcoólise enquanto que octoatos de estanho são utilizados na etapa da policondensação como catalisadores de transesterificação. Também se faz necessário o emprego de alta temperatura para que as reações ocorram. As condições reacionais utilizadas geralmente estão na faixa de 210 a 240°C, variando de 8 a 10 horas de reação para se obter um polímero de massa molecular adequada. Assim, a temperatura elevada causa degradação parcial do polímero formado além do grande consumo energético.

Polímeros alquínicos (que são uma derivação dos poliésteres) também são obtidos de forma similar nas mesmas condições reacionais. O processo inicia na transesterificação do óleo vegetal com glicerol (geralmente é uma mistura de alcoóis tri e tetra funcionais) produzindo mono e digliceróis. Esta etapa é denominada alcoólise. A partir desta etapa, o poliálcool formado irá reagir com diácidos carboxílicos formando o polímero alquílico. Este apresenta alta polidispersão (por ser um material altamente ramificado), o que lhe confere propriedades características como dureza, brilho e boa aderência sobre madeira e metal.

Assim, as enzimas surgem como possibilidade na obtenção de materiais poliméricos para a aplicação em tintas, utilizando matérias primas renováveis e com redução do consumo energético.

O presente trabalho buscou desenvolver novas metodologias para a obtenção de poliésteres a partir do óleo de soja, ácidos dicarboxílicos ou ésteres bifuncionais e polióis, via catálise enzimática. A enzima utilizada no desenvolvimento do trabalho foi a Novozym 435, obtida comercialmente da empresa Novozymes®.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENZIMAS

Enzimas são proteínas que desempenham um papel fundamental na integridade e funcionalidade de sistemas biológicos. Suas massas molares variam de 12.000 a 1.000.000 Daltons. São eficientes biocatalisadores principalmente em reações com alta especificidade. As enzimas tem a sua atividade maximizada quando são utilizadas em condições reacionais brandas (temperatura, solvente, tipo de substrato) ⁷.

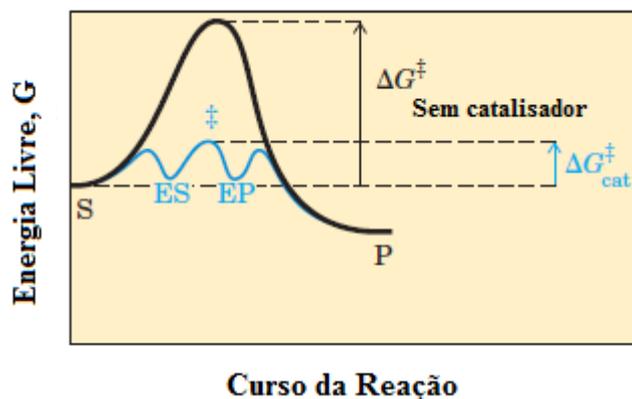


Figura 2: Diagrama de reação comparando uma reação catalisada por enzima e outra não catalisada ⁷.

No caso da utilização de enzimas, a barreira energética existente entre o substrato e o estado de transição é inferior ao processo sem catálise, devido a ação biocatalítica, conforme figura 2.

No decorrer da transformação de substrato em produto, existe a formação de dois intermediários: enzima-substrato (ES) e enzima-produto (EP).

Na tabela I estão elencadas algumas vantagens e desvantagens na utilização de enzimas em processos biocatalíticos. O “turnover number” presente na tabela I, pode ser definido como o número máximo de moléculas de substrato que a enzima pode converter a produto por sítio catalítico e por unidade de tempo.

Tabela I: Vantagens e desvantagens das enzimas frente a catalisadores convencionais ⁹.

Vantagens	Desvantagens
Alta especificidade	Alta complexidade molecular
Alta atividade em condições moderadas	Alto custo de produção
Alto turnover number	Fragilidade intrínseca
Biodegradabilidade	
Oriundo de fonte renovável	

Novos estudos surgem com o intuito de aumentar a estabilidade enzimática visando a utilização nos mais diversos processos industriais. Algumas destas estratégias visando a melhoria nas propriedades são: modificação química, imobilização em matrizes sólidas, cristalização, agregação e utilização de técnicas da engenharia genética para mutagênese ⁸.

A maioria das características catalíticas de uma enzima deriva de sua estrutura molecular. As enzimas são proteínas formadas pela interação entre cadeias de polipeptídeos. Estes são oriundos pela combinação de aproximadamente 20 aminoácidos, ligados através de ligações peptídicas (ligação covalente) formadas a partir de um grupo carboxila e um grupo amina, conforme figura 3 ⁹. Dependendo do tipo e tamanho do substituinte presente na cadeia peptídica o aminoácido pode ter comportamento polar ou apolar na sua distribuição ao longo da proteína, podendo determinar seu comportamento frente às condições reacionais.

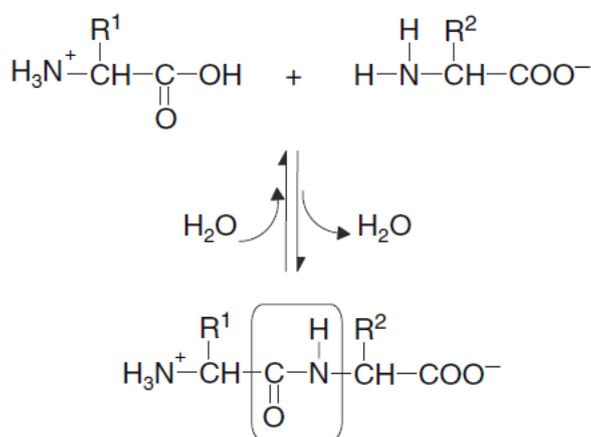


Figura 3: Formação de ligação peptídica entre dois α -aminoácidos ⁹.

Estas cadeias de aminoácidos formadas podem interagir entre si através de ligações de hidrogênio, formando estruturas secundárias na forma de α -hélice e β -folhas, conforme figura 4

10

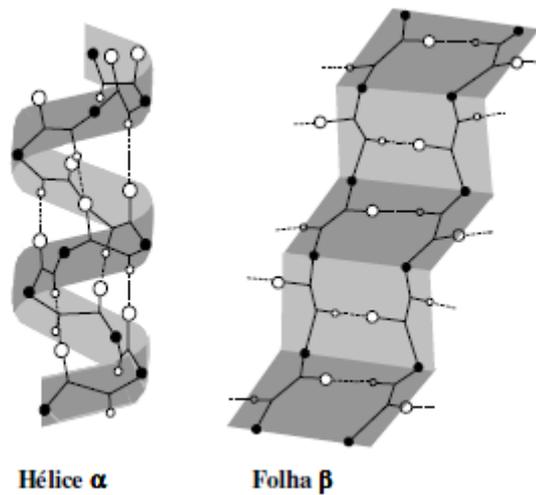


Figura 4: Representação dos dois tipos de estrutura secundária frequentemente encontrada em enzimas e proteínas.

A partir das estruturas secundárias, outros tipos de interações surgem, formando a estrutura terciária, figura 5. São elas: forças de van der Waals (do tipo dipolo - dipolo induzido), interações hidrofóbicas (entre moléculas apolares e substituintes aromáticos), pontes de dissulfeto (ligações covalentes entre átomos de enxofre) e ligações iônicas (resultante de forças atrativas entre estruturas de cargas opostas) ⁸.

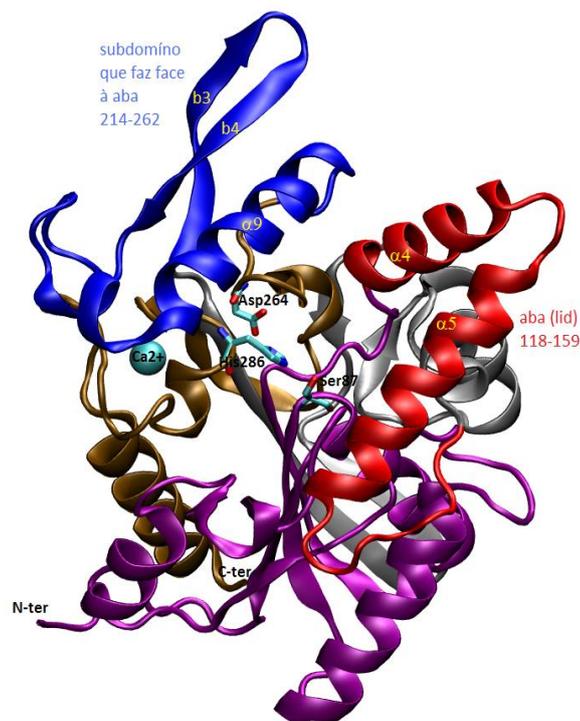


Figura 5: Estrutura tridimensional da lipase obtida a partir do microorganismo *Pseudomonas cepacia* ¹³.

A catálise ocorre numa pequena parte da enzima, chamada de centro ativo, que geralmente é formada por resíduos de aminoácidos específicos.

Para que sejam biocataliticamente ativas, muitas enzimas requerem um componente químico adicional, chamado de cofator ou coenzima. Os cofatores são íons inorgânicos, tais como: Fe^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , dentre outros, que também estão associados a estabilidade da estrutura terciária das enzimas^{9, 10}. A enzima pode conter um ou mais cofatores. As coenzimas são complexos orgânicos ou organometálicos que facilitam o transporte de elétrons ou determinados grupos funcionais. Se coenzimas ou cofatores estiverem ligados permanentemente à enzima, então podem ser chamados de grupos prostéticos.

Assim, grupos prostéticos podem ser: carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos, íons metálicos ou complexos organometálicos ligados de forma reversível ou irreversível à enzima, atuando em conjunto no sítio ativo. Ou seja, existem determinados tipos de enzima que dependem destes grupos prostéticos para que possuam atividade biocatalítica.

Dessa forma as enzimas são classificadas em três principais grupos. São eles:

- as que não requerem moléculas adicionais para efetuarem processos biocatalíticos;
- as que necessitam de cofatores para realizar os processos biocatalíticos;
- e finalmente as que necessitam de coenzimas.

Por definição, a parte proteica de uma enzima é chamada de apoenzima. Já a enzima cataliticamente ativa em conjunto com a coenzima ou cofator é denominada holoenzima.

2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

As enzimas são classificadas em seis famílias de acordo com o tipo de reação que é catalisada, segundo critérios do Comitê da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (sigla em inglês *IUBMB*). Por definição, a identificação inicia com as letras EC (*Enzyme Commission*) seguida por quatro números, exemplo: EC X.X.X.X. Os quatro dígitos que as caracterizam foram definidos da seguinte forma: o primeiro relaciona com a família; o segundo refere-se a subclasse dentro da família e denota qual grupo químico a enzima atua; o terceiro refere-se ao subgrupo dentro da subclasse, e especifica o grupo envolvido na reação e o quarto é o número correlativo de identificação dentro de um subgrupo^{8, 9, 10,11}. As seis famílias são:

1. Oxidoredutases: São enzimas que catalisam reações de oxidação/redução envolvendo transferência de elétrons, átomos de hidrogênio ou oxigênio. Existem 22 subclasses de oxidoredutases. Estas enzimas apresentam uma grande importância tecnológica. As oxidoredutases estão envolvidas nas vias metabólicas centrais das células. Elas requerem coenzimas, atuando de forma intracelular.

2. Transferases: Enzimas que catalisam a transferência de um grupo funcional de um doador para um possível aceptor. Existem nove subgrupos de transferases. Estas enzimas são de fundamental importância para o metabolismo celular. Requerem coenzimas e são estritamente intracelulares.

3. Hidrolases: Enzimas que catalisam reações de hidrólise. Existem 12 subgrupos de hidrolases. Estas enzimas são importantes para o catabolismo celular. Muitas das enzimas pertencentes a esta família não necessitam de coenzimas e algumas atuam extracelular. Como exemplo, podemos citar as lipases EC 3.1.1.3. Assim, o primeiro dígito 3 corresponde a classe das hidrolases (EC 3); que atuam sobre ligações éster (EC 3.1); de ácidos carboxílicos (EC 3.1.1); hidrolisando triglicerídeos (EC 3.1.1.3).

4. Liases: Enzimas que catalisam reações de clivagem não oxidativa e não hidrolítica de ligações químicas. Estão divididas em 7 subgrupos, de acordo com o tipo de ligação que atuam. Estas enzimas não estão apenas envolvidas no catabolismo celular, mas também em biossíntese. A maioria das liases atua intracelular e algumas não necessitam de coenzimas. Uma das enzimas mais utilizadas é a aldolase que atua na formação da ligação C-C pela reação reversa.

5. Isomerase: Enzimas que catalisam reações de conversão de um substrato em seu isômero. Existem 6 subgrupos de isomerase dependendo do tipo de isômero produzido. A maioria das isomerases é intracelular e grande parte necessita de cofatores. São muito utilizadas na produção de xaropes de frutose.

6. Ligases: Enzimas que catalisam a formação de ligações covalentes entre duas moléculas. São responsáveis pelo anabolismo celular. Executam também reações de síntese essenciais no interior das células. São classificadas em 6 grupos de acordo com o tipo de ligação formada. Geralmente, necessitam de coenzimas para atuar.

2.3 MECANISMO DE ATUAÇÃO

De acordo com o modelo proposto por Emil Fischer em 1894, conhecido como modelo chave fechadura (figura 6 a), para que ocorra a reação biocatalítica, o substrato deve ter a mesma geometria do sítio ativo da enzima. Desta forma o modelo explica a especificidade das reações biocatalíticas.

Mais tarde a teoria de indução por ajuste (Koshland 1958) propôs que o substrato induz uma mudança na conformação enzimática após a interação com o sítio ativo, orientando o grupo catalítico numa posição que facilite a reação subsequente (figura 6 b) ⁹.

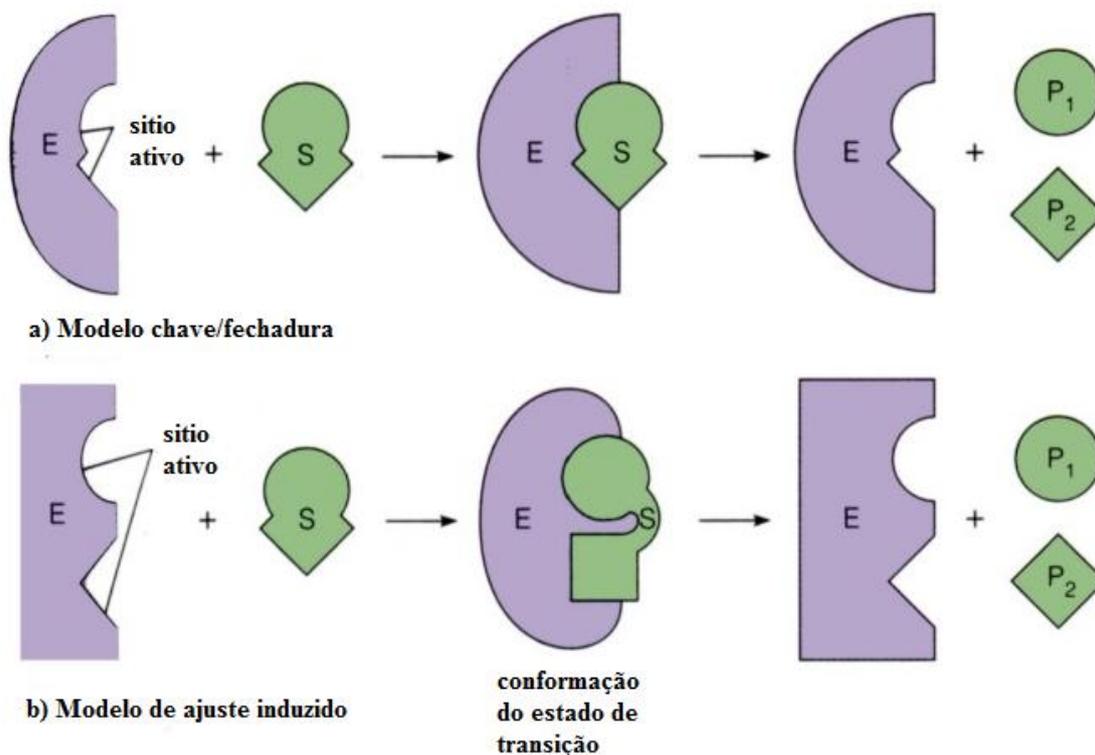
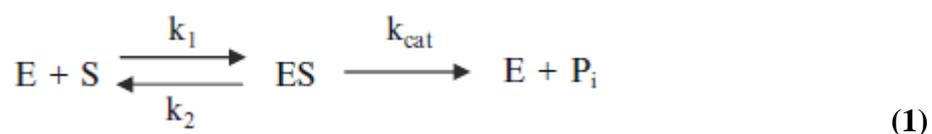


Figura 6: Representação de dois modelos de mecanismo catalítico: Modelo chave fechadura (a) e Modelo de ajuste induzido (b). A letra E designa a enzima; S o substrato; P₁ e P₂ os produtos formados ¹².

2.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA

No início do século XX, Henri propôs que a conversão do substrato a produto envolve uma reação reversível entre enzima e substrato formando um intermediário ativo, que se rompe, levando a formação do produto. A partir desta ideia surge a proposta catalítica de reação por Michaelis e Menten (1913): na primeira etapa o substrato é capturado pela enzima no sítio ativo; na segunda etapa o resíduo de aminoácido presente no substrato faz o processo químico de transformação do substrato a produto ^{7,9}.

Assim, esquematicamente pode-se representar a reação biocatalítica da seguinte forma:



onde E é enzima, S, o substrato e P, o produto. Também estão representadas as constantes k₁ e k₂ (referentes a formação e rompimento do intermediário enzima-substrato) e a constante k₃ ou k_{cat}.

De acordo com o pseudo-equilíbrio proposto por Michaelis-Menten, a etapa limitante do processo é a formação do produto através do complexo ES (enzima –substrato), sendo nesta etapa determinada a constante de equilíbrio reacional (k_{cat})^{7,9,11}.

A equação hiperbólica de Michaelis-Menten representa a cinética enzimática em função da concentração de substrato:

$$v = k_{cat} C_E \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

onde $k_{cat} \cdot C_E$ (C_E é a concentração da enzima no meio) é definida como a velocidade máxima (V_{max}) quando o centro activo da enzima está saturado com moléculas do substrato, S é a concentração do substrato e K_M é a constante de saturação de Michaelis-Menten, que equivale à concentração de substrato no ponto onde a velocidade atinge a metade de V_{max} .

É importante salientar que nem todas as enzimas seguem o modelo cinético de Michaelis – Menten. As lipases, (mais especificamente CAL B) objetivo de estudo do trabalho, seguem as equações de Michaelis-Menten onde a velocidade de catálise não indica uma resposta linear face ao aumento do substrato^{9,14}. Uma certa linearidade é observada apenas a baixas concentrações, no início da reação, conforme figura 7.

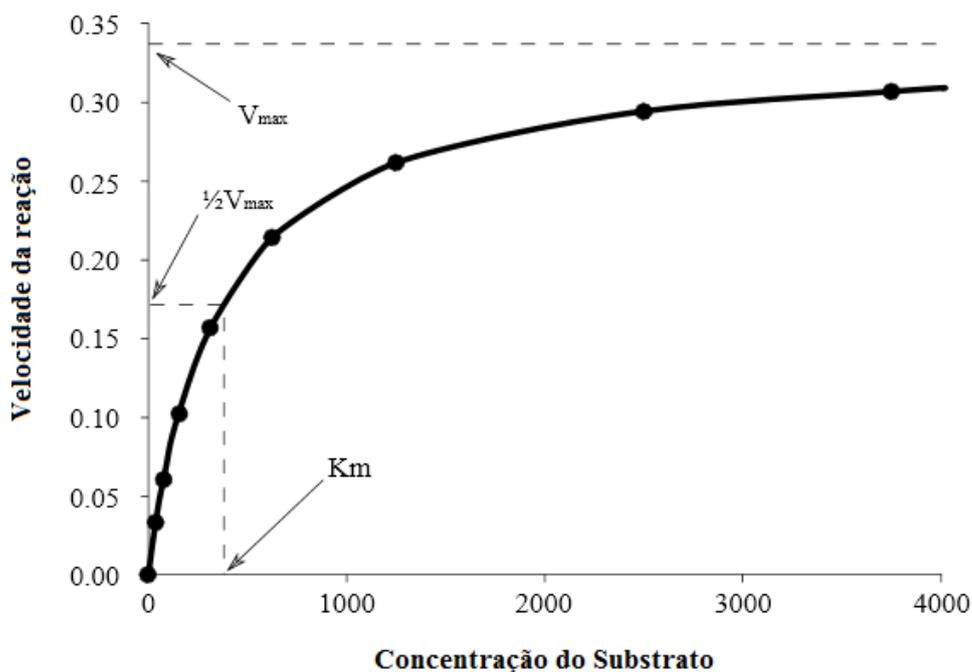
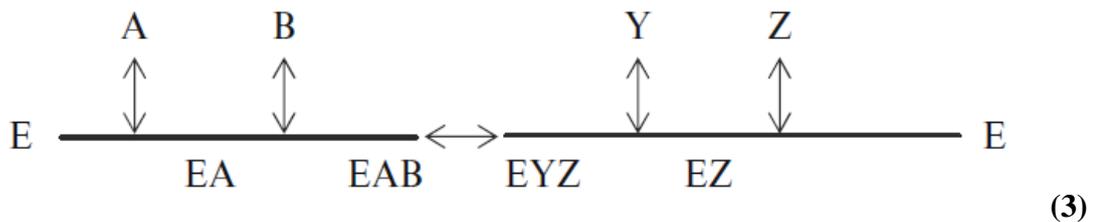


Figura 7: Perfil cinético enzimático das lipases. V_{max} representa a velocidade máxima do sistema; K_m representa a concentração de substrato necessária para que a velocidade seja a metade de V_{max} ¹⁴.

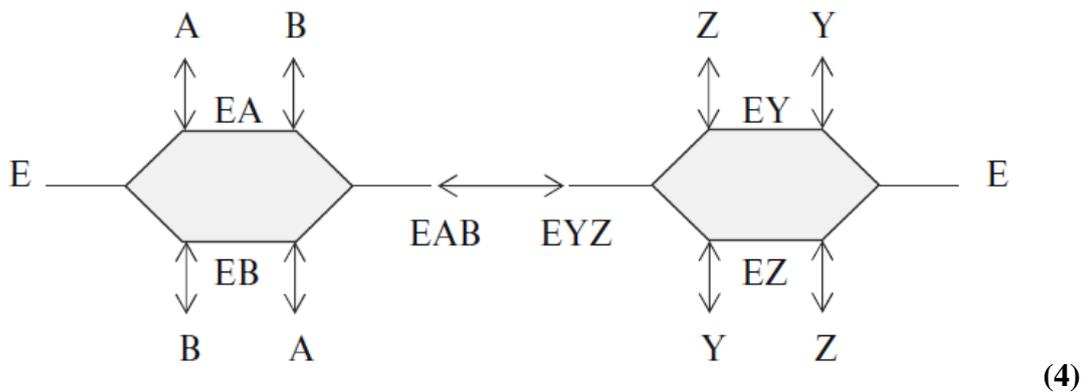
2.5 MECANISMO DE REAÇÃO PARA MAIS DE UM SUBSTRATO

O mecanismo de reação para mais de um substrato pode ser do tipo sequencial ou Ping-pong. No mecanismo sequencial, todos os substratos devem interagir com a enzima antes que a reação ocorra. Este é subdividido em ordenado e randômico.

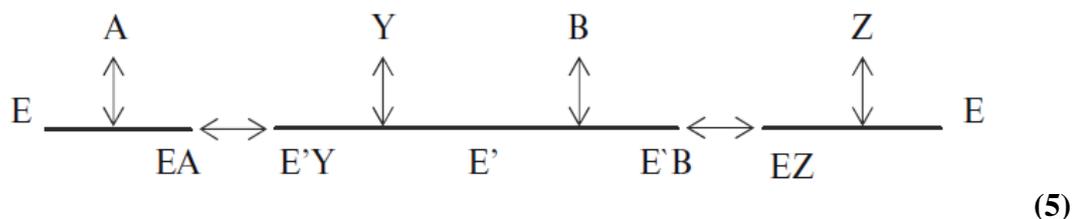
No ordenado, supondo uma reação entre os substratos A e B, a formação do produtos (Y e Z) só irá ocorrer a partir do intermediário E-A, ou seja, não existe na enzima um sítio ativo que permita a formação do complexo E-B^{8,9,11}.



Já no randômico, pode existir a formação do complexo E-A e E-B que levará a formação de produtos.



No mecanismo Ping-pong o produto é formado antes que todo o substrato tenha interagido com a enzima. Neste caso a enzima existe em duas formas cataliticamente ativas onde cada uma das formas reconhece um substrato e transforma em produto, enquanto ocorre a transformação para outra espécie catalítica. O mecanismo Ping-pong é usado para explicar reações de produção de biodiesel e hidrólise de triacilgliceróis com lipases^{8,9,11}.



O mecanismo Ping-pong também explica reações na indústria farmacêutica e química fina com oxi-redutases ^{8,9}.

As equações cinéticas que regem as reações que envolvem mais de um substrato tem como equação básica a hiperbólica de Michaelis – Menten (2). Porém, a inclusão de novas variáveis é necessária pela existência de novos equilíbrios envolvidos.

2.6 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

2.6.1 Efeito do pH

As enzimas são polímeros poli-iônicos. Como consequência disto, a alteração no pH pode ocasionar a mudança na distribuição de cargas, tanto no sítio ativo da enzima, como também em toda a sua estrutura ⁹.

Para explicar a variação da atividade catalítica em função do pH, Michaelis e Davidsohn propuseram algumas teorias levando em consideração a ionização dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo. A existência destas espécies ionizáveis é fundamental para a atividade catalítica, sendo dependentes do pH do meio ^{9, 10, 11}.

Assim, duas ou três unidades de pH fora do ponto isoelétrico da enzima podem causar uma inativação reversível.

As enzimas podem apresentar um único pH em que possuem sua atividade biocatalítica máxima, ou uma faixa de pH ótimo em que elas mantêm sua atividade. Esta faixa de pH ótimo é observada geralmente em enzimas imobilizadas, como a Novozym 435.

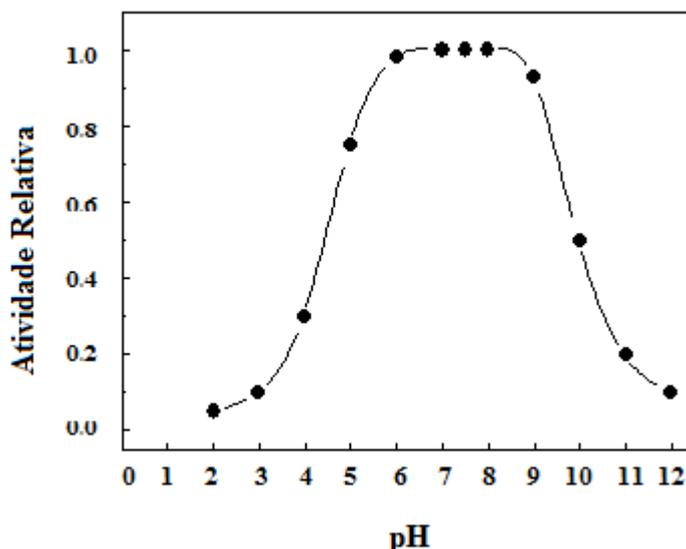


Figura 8: Ilustração de uma faixa de pH ótimo de uma enzima imobilizada genérica, semelhante ao comportamento observado com a Novozym 435.

2.6.2 Efeito da temperatura

A temperatura é uma das variáveis mais relevantes em sistemas biológicos. Com o aumento da temperatura, aumenta a velocidade de reação, mas ocorre também o aumento da inativação. Sob condições moderadas de temperatura (próximas a 30° C), e curtos períodos de tempo, a taxa de inativação é insignificante e a velocidade inicial aumenta com o aumento da temperatura. Em altas temperaturas, a atividade da enzima decresce no decorrer da reação, pela desnaturação, e a taxa de inativação é predominante^{9, 10, 11}.

De acordo com o equilíbrio cinético de Michaelis-Menten, equação (1), a temperatura também pode afetar a interação enzima-substrato, favorecendo o rompimento do intermediário ES para E (enzima) e S (substrato). Igualando a constante cinética da reação envolvida com a energia livre de Gibbs-Helmholtz, obtem-se a equação 6, onde a temperatura é inversamente proporcional a reação, sendo K igual a k_2/k_1 .

$$K = K_0 \cdot \exp\left(\frac{\Delta H^0}{R \cdot T}\right) \quad (6)$$

A inativação térmica da enzima está relacionada com o rompimento das interações intermoleculares responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional, levando a redução da atividade biocatalítica. A inativação também pode envolver a ruptura de ligações covalentes ou não-covalentes.

2.7 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

A inibição é causada por uma substância que interage com o centro ativo da enzima reduzindo o seu potencial biocatalítico. Os inibidores são classificados de acordo com a etapa do processo biocatalítico em que eles participam. A inibição pode ser dividida em inibição reversível ou irreversível ¹¹.

2.7.1 Inibição reversível

O inibidor competitivo compete com o sítio ativo da enzima, impedindo a ligação entre enzima e substrato. Muitos inibidores competitivos são compostos que se assemelham ao substrato e se combinam com a enzima, mas sem que ocorra a reação catalítica ⁷.

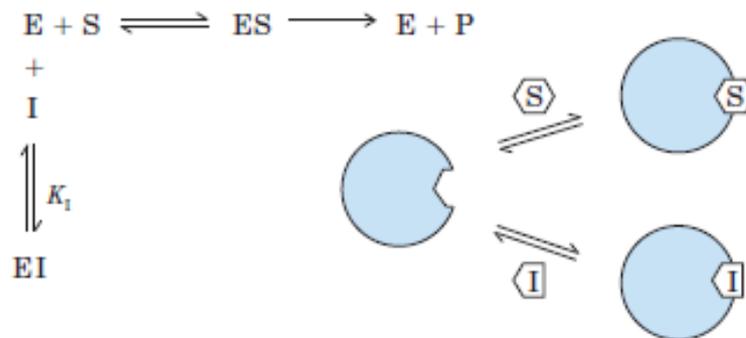


Figura 9: Processo de inibição enzimática competitiva ⁷.

Assim, neste tipo de inibição, as substâncias afetam a primeira etapa da catálise, prejudicando a interação do substrato com o sítio ativo da enzima, mas sem interferir na transformação do produto ⁹.

Por ser uma inibição reversível, a adição de mais substrato minimiza a probabilidade de formação do complexo enzima inibidor.

Outros dois tipos de inibição são a mista ou não competitiva e anticompetitiva. Na inibição anticompetitiva, ocorre uma interação enzima inibidor no estado de transição em algum sítio da enzima que não seja o sítio ativo. Neste caso existe uma redução do V_{max} e K_m .

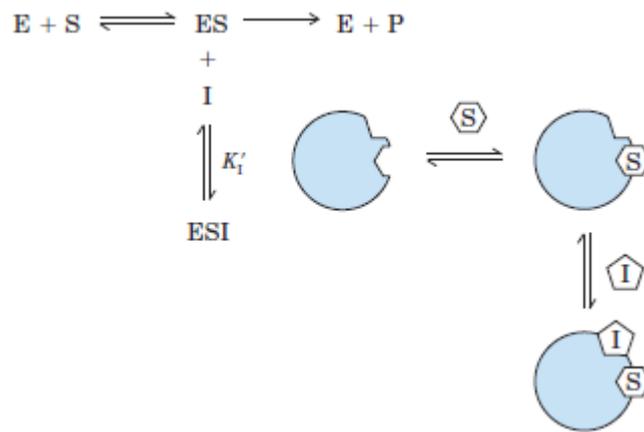


Figura 10: Processo de inibição enzimática anticompetitiva ⁷.

A inibição mista também ocorre em um sítio que difere do sítio ativo da enzima. A diferença é que este inibidor pode interagir com a enzima ou com o intermediário enzima-substrato.

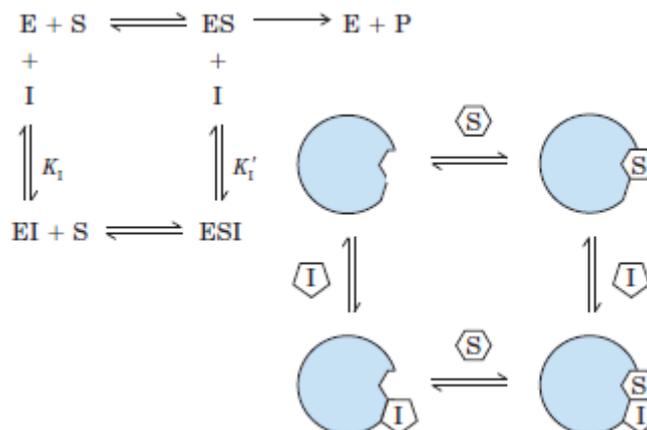


Figura 11: Processo de inibição enzimática mista ou não competitiva ⁷.

Assim, a inibição não competitiva é ocasionada por substâncias que afetam a segunda etapa da catálise, isto é, não interferem na formação do complexo enzima-substrato, mas interferem na transformação do produto final.

2.7.2 Inibição irreversível

Os inibidores irreversíveis são aqueles que se ligam covalentemente ou destroem grupos funcionais que tenham essencial relevância para a atividade enzimática.

A desnaturação até pode ser reversível desde que não tenham ocorrido alterações químicas na proteína. A desnaturação que ocasiona alteração química na proteína (desnaturação irreversível) é também denominada inativação ^{7, 11}.

Geralmente, as enzimas atuam de forma eficiente em condições moderadas, temperaturas próximas a 30° C e pH próximo a neutralidade. Condições adversas como aumento da temperatura, variação do pH, solventes, utilização de agentes caotrópicos (estes aumentam a solubilidade de substâncias apolares na água, rompendo interações hidrofóbicas, tais como: ureia, tiocianatos, guanidina, etc), metais pesados, e agentes quelantes, reduzem a atividade catalítica das enzimas pela distorção da configuração geométrica do sítio ativo ⁹.

A estabilidade enzimática depende fundamentalmente de sua conformação tridimensional. Assim, a perda da estrutura tridimensional prejudica a cadeia de aminoácidos responsáveis pela atividade biocatalítica.

2.8 IMOBILIZAÇÃO

As enzimas tem um grande potencial de utilização na indústria química, como química fina, alimentícia e analítica. Isto devido suas excelentes propriedades funcionais (tais como, atividade, seletividade, especificidade). Porém, a dificuldade de utilização em escala industrial se dá devido a sua instabilidade sob condições adversas (principalmente devido a condições de temperatura e pH divergentes das presentes em condições fisiológicas). As enzimas também são inibidas muitas vezes pelos substratos e produtos formados na reação. Na forma livre são solúveis em água, o que muitas vezes inviabiliza sua reutilização ^{9, 10, 11}.

Por questões técnicas e econômicas, muitos processos biocatalíticos necessitam da reutilização da enzima, ou que sua utilização seja realizada por longos períodos reacionais. Com o intuito de aumentar a estabilidade enzimática, a imobilização surge como alternativa para a aplicação industrial de processos biocatalíticos. Porém, a imobilização da enzima influi na natureza do processo biocatalítico que passa a ser heterogêneo, uma vez que o processo catalítico ocorre na superfície ou dentro da estrutura sólida onde a enzima está localizada, enquanto os substratos e produtos estão no meio reacional.

Como restrição, a imobilização enzimática pode induzir a efeitos conformacionais e de micro ambiente que podem afetar a atividade biocatalítica. Efeitos conformacionais referem-se a trocas estruturais ocasionadas na enzima como consequência da imobilização. A alteração da estrutura nativa tridimensional e efeitos estéreis causados pela proximidade da enzima à superfície do suporte são alterações conformacionais que podem alterar o comportamento cinético em relação a enzima livre. Já os efeitos de micro ambiente se referem às limitações da transferência de massa e partição. A partição está relacionada à existência de substratos e produtos na mesma fase da enzima. O transporte de massa está relacionado ao transporte dos substratos, do meio reacional ao biocatalisador, e também do transporte do produto formado no biocatalisador ao meio reacional. Estes parâmetros podem afetar a cinética reacional ⁹.

Muitas vezes estes efeitos conformacionais e de microambiente surgem como estratégia para o aumento da enantioseletividade enzimática, para enzimas que já atuam de forma distinta em substratos quirais.

A imobilização enzimática pode ser dividida em métodos que envolvem a interação da enzima com a matriz sólida (geralmente através de ligação e/ou interação química) e métodos que retêm a enzima no seu interior pela presença de espaços vazios.

Serão abordadas de forma resumida, algumas destas metodologias de imobilização.

2.8.1 Métodos que envolvem interação química enzima – suporte

Neste tipo de imobilização (que envolve interação entre enzima e suporte), existem as que são realizadas com a presença de uma matriz sólida (interação do tipo covalente ou não covalente) e as que são livres da matriz sólida, tais como os agregados ou cristais de enzima reticuladas.

1) Imobilização covalente: A ligação covalente é estabelecida entre o grupo funcional do suporte e os resíduos de aminoácidos da enzima, tais como: – OH, – SH, – NH₂ e – COOH. Sílica, poliacrilamida e celulose são alguns exemplos de suportes utilizados na imobilização de enzimas. No caso da sílica, muitas vezes se faz necessária a ativação da superfície, que consiste na remoção da água superficial e formação de grupos silanóis. Estes irão reagir com resíduos de aminoácidos da enzima ou modificados com moléculas orgânicas para posterior interação com a enzima^{9,10,11}.

2) Imobilização não-covalente: envolve interações do tipo van der Waals, mas também interações mais fortes como interação hidrofóbica e ligação iônica. Nestes casos, muitas vezes o que ocorre é a adsorção da enzima. Variações no meio reacional podem levar a sua dessorção, principalmente em sistemas aquosos.

A troca iônica é um método muito efetivo na imobilização de enzimas visto que a maioria das proteínas adsorve muito rápido em resinas trocadoras aniônicas ou catiônicas. Polímeros como polietilenoimina e Dextran sulfato são utilizados com o intuito de aumentar a força iônica e, conseqüentemente, a interação entre a proteína e o suporte^{9,10,11}.

3) Agregados de enzima reticuladas: Do inglês “*cross-linked enzyme aggregate*” ou CLEA, este tipo de imobilização ocorre livre da matriz sólida. Neste caso, as enzimas são reagidas com reagentes bifuncionais, como glutaraldeído, tornando a enzima insolúvel no meio pela formação de agregados reticulados com as proteínas presentes. Desta forma, é aumentada a atividade biocatalítica do sistema sem a necessidade da presença de um suporte inerte. Ou seja, neste caso, as próprias enzimas atuam como suporte. Este tipo de imobilização pode gerar enzimas com elevada estabilidade sob condições adversas (temperatura, pH,

solventes orgânicos) e alta atividade. Porém, para este tipo de imobilização, a formação dos cristais requer uma alta pureza das enzimas, impactando significativamente no custo final do biocatalisador^{9, 10, 11}.

2.8.2 Métodos de “confinamento” ou encapsulação

Estes métodos de imobilização utilizam uma matriz sólida como suporte, onde o “confinamento” da enzima no interior de uma matriz polimérica orgânica ou inorgânica altamente reticulada é que mantém a enzima imobilizada. Aqui, a imobilização ocorre pela polimerização da solução monomérica na qual a enzima está dissolvida. Polímeros como poliacrilamida e poliuretanos são utilizados neste caso⁹.

A encapsulação sol-gel também pode ser empregada para a imobilização de enzimas através da hidrólise ácida ou básica do tetraalquilsilano e posterior condensação com formação de uma estrutura tridimensional de baixa porosidade.

3 LIPASES

As lipases (triacilglicerol hidrolases – E.C. 3.1.1.3) são um grupo versátil de enzimas capazes de sintetizar ou hidrolisar uma gama variada de ésteres insolúveis em água.

Pertencem a classe das α/β – hidrolases, que contém as estearases, acetilcolinerases, cutinases, carboxilestearases e epóxi hidrolases. As α/β – hidrolases conservam semelhanças entre si, como o sítio catalítico¹⁵.

As lipases podem ser originadas de distintas fontes. Dentre as mais utilizadas se destaca a lipase PPL (obtida a partir do pâncreas do porco). Existem também as lipases obtidas a partir de fungos: *Candida antartica* (CA), *Candida rugosa* (CR) *Candida cylindracea* (CC), *Aspergillus niger* (AN), *Penicillium roqueforti* (PR), *Rhizopus delemar* (RD) e *Rhizomucor miehei* (RM). E as obtidas a partir de bactérias, como a *Pseudomonas cepacia* (PC), *Pseudomonas fluorescens* (PF), *Pseudomonas species* (PS), dentre outras¹⁶.

O modelo catalítico dinâmico de ajuste induzido é o que melhor se enquadra para estas enzimas. Mesmo que a conformação do sítio ativo não exiba previamente uma perfeita complementaridade ao substrato, este, ao interagir com a enzima, pode induzir modificações conformacionais que orientam adequadamente os grupos, otimizando o encaixe. Quanto a cinética, as lipases se adéquam ao modelo de Michaelis – Menten.

O mecanismo de reação das lipases envolve os aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (Asp)/ácido glutâmico. Primeiramente, o grupo ácido ou éster liga-se covalentemente ao resíduo de serina (catalisado pelos demais aminoácidos Asp e His).

Posteriormente é que ocorre o ataque do nucleófilo e a consequente inserção na cadeia ^{14,17}.

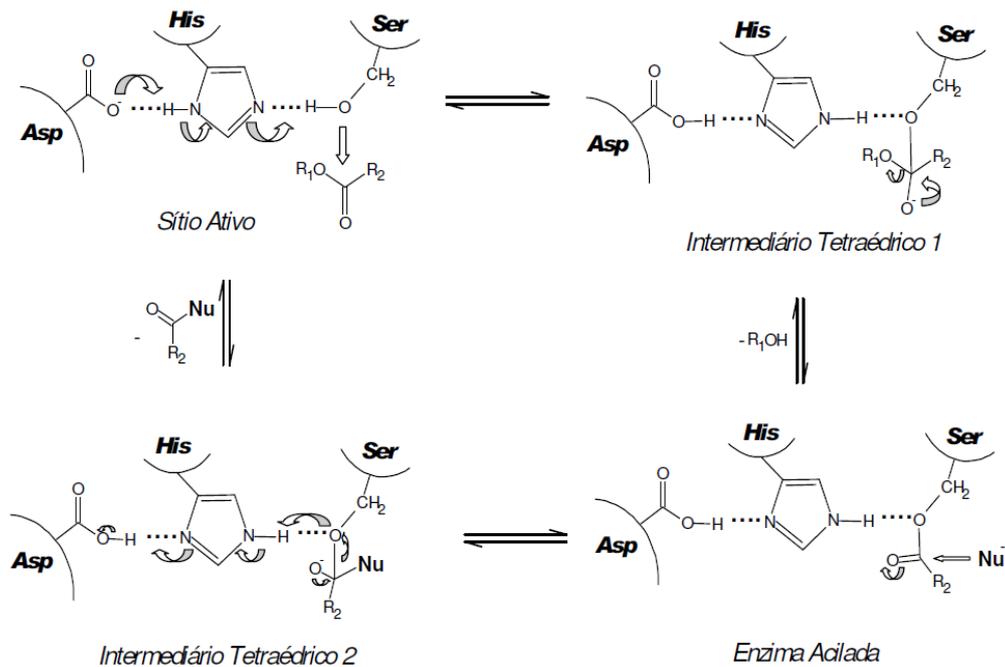


Figura 12: Mecanismo de reação de (trans)esterificação ou hidrólise das lipases ¹⁴.

3.1 CANDIDA ANTARTICA LIPASE B E A NOVOZYM 435

Uma das lipases mais utilizadas comercialmente é a obtida a partir do fungo *Candida Antartica*. Isto devido a facilidade industrial de obtenção do meio de cultura e devido a versatilidade da enzima obtida, podendo ser utilizada em diversas reações em sistema de catalíticos convencionais (em fase aquosa) ou não convencionais (em solventes orgânicos).

A *Candida Antartica* apresenta dois tipos de Lipases. A Lipase B (também conhecida como CAL B) é um versátil e bem caracterizado biocatalisador em diversas sínteses orgânicas e biotransformações, apresentando similaridade aos demais α/β – hidrolases. Já a Lipase A possui propriedades biocatalíticas únicas, como boa estabilidade térmica, resistência a faixas de pH ácidas, e capaz de aceitar alcoóis terciários. Porém a sua estrutura impede o acesso ao sítio ativo pelo substrato, o que reduz drasticamente a sua atividade ¹⁵.

Conforme representado na figura 13, as lipases apresentam um enovelamento α,β hidrolase, que consiste de oito fitas β paralelas conectadas por α -hélices, e um sítio ativo com a tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (Asp) ou glutamato (Glu). No caso da CAL B, os resíduos de aminoácidos do sítio ativo estão nas seguintes posições: Ser 105, Asp 187 e His 224 ^{13, 18}.

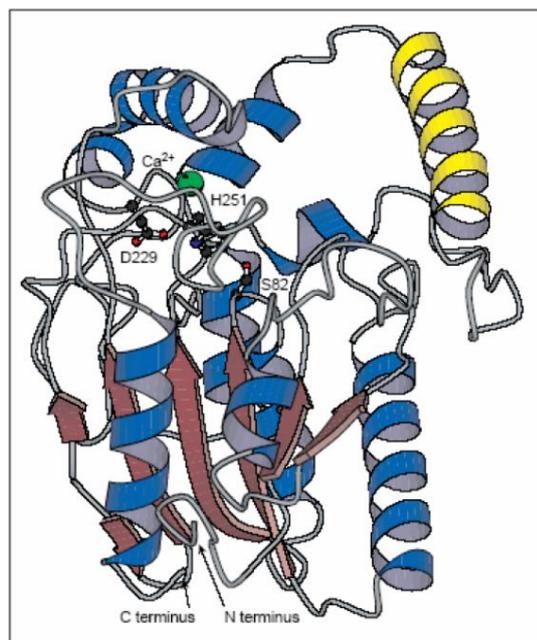


Figura 13: Estrutura cristalográfica da lipase de *Pseudomonas cepacia*, que se assemelha a CAL B.

A CAL B é composta por 317 aminoácidos com massa molar de 33273 Da. Valina, leucina, isoleucina, glicina e alanina correspondem a 40,1% da sequência proteica. Serina e treonina constituem 18,3% do total de aminoácidos. O restante dos aminoácidos consistem em 15,8% de ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glutamina; 9,46% de prolina; 7,6% de triptofano, tirosina e fenilalanina; 5,6% de arginina, lisina e histidina; e finalmente 3,15% correspondem à cisteína e metionina ¹⁹.

Existe uma série de inibidores existentes da CAL B que prejudicam sua atividade biocatalítica. Agentes quelantes como o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), compostos fluorados, acetona, alguns cátions metálicos (Hg^{2+} , Ag^{+} , dentre outros), são alguns exemplos. O efeito inibidor pode ser maximizado na presença de tensoativos, como Triton X100, dentre outros, desde que a concentração do tensoativo esteja acima do limite crítico. Tais inibidores podem ligar-se covalentemente ou se adsorver as α -hélices ou β -fitas prejudicando a conformação ativa da enzima ²⁰.

Quanto às condições de temperatura e pH, a CAL B apresenta condições favoráveis de trabalho em faixas de pH entre 6,0 a 8,0 e temperaturas que variam de 25°C a 50°C (sendo que a CAL B apresenta trabalhos de utilização como enzima imobilizada a temperaturas até acima de 70°C) ²⁰.

Uma das formas mais utilizadas da CAL B é através da imobilização em polímero acrílico macroporoso. Desta forma, é conhecida comercialmente como Novozym 435.

Existem duas formas encontradas na literatura da Novozym 435 onde ela pode estar ligada covalentemente à resina acrílica macroporosa ou adsorvida fisicamente ^{21,22}.

No caso da ligação covalente entre enzima e suporte, geralmente o copolímero acrílico macroporoso é obtido por polimerização em suspensão dos monômeros 2,3-epoxipropil metacrilato (GMA) e etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA), sistema abreviado como poli-(GMA-co-EGDMA). A presença de grupos epóxi proporciona uma boa reatividade a distintos substratos. Assim a funcionalização da superfície com diaminas (ex.: 1,4-diaminobutano) propicia posteriormente a imobilização de enzimas ²¹.

A funcionalização destes copolímeros acrílicos com diaminas e posteriormente com glutaraldeído aumenta a atividade enzimática, se comparado a imobilização direta da enzima sem pré-tratamento, provavelmente pela distância maior entre enzima-suporte, que facilita a difusão de monômeros.

Outra variação da Novozym 435 avaliada é a que utiliza a *Candida Antartica* Lipase B adsorvida na resina macroporosa denominada Lewatit VP OC 1600, conforme mostrado na figura 14. Este polímero é sintetizado a partir do ácido metacrílico e divinilbenzeno, formando um material reticulado, onde a enzima encontra-se adsorvida fisicamente ²².

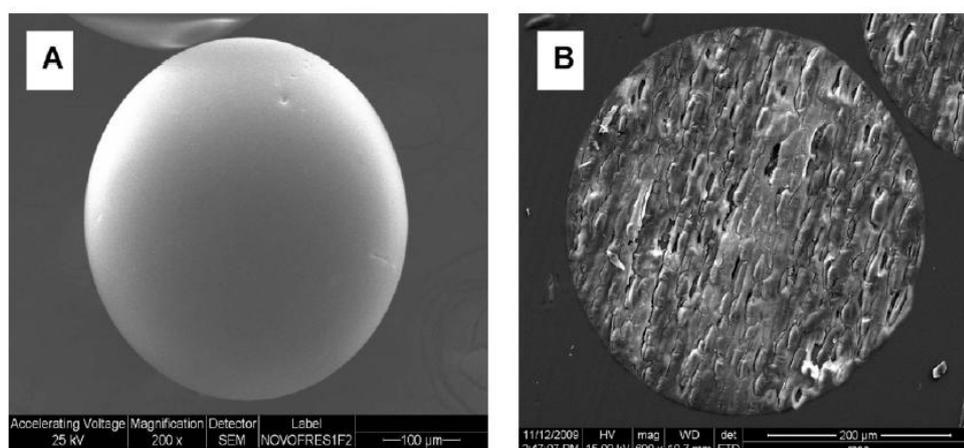


Figura 14: Microscopia eletrônica da partícula da Novozym 435 (A) e sua seção transversal (B), imobilizada através de adsorção física ²².

Um parâmetro importante avaliado tanto em enzimas livres como nas imobilizadas é a atividade biocatalítica. Esta pode ser monitorada através da formação dos produtos (medição no UV, HPLC, fluorescência, alteração da atividade óptica).

A atividade enzimática é expressa em unidades de atividade. A União Internacional da Bioquímica definiu o IU como a unidade de medida. Um IU é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato por minuto sob condições padrão de temperatura, pH e concentração de substrato. Existe também a medição do sistema

internacional em que a atividade biocatalítica é mensurada pela taxa de transformação do substrato em produto em mol/segundo.

3.2 BIOCATÁLISE NÃO CONVENCIONAL

A possibilidade de utilização das lipases em sistema de biocatálise não convencional (solventes orgânicos) surge como oportunidade para uma série de reações químicas. Podemos destacar a produção de biodiesel e monoglicerídeos, como exemplo em reações de esterificação e transesterificação ^{14, 23}.

Como as lipases de forma geral apresentam uma boa estabilidade em meio apolar surge a oportunidade na execução de reações que não seriam possíveis em meio aquoso. Mesmo no sistema não convencional é importante que exista água no meio. Esta água irá ajudar na manutenção da camada de hidratação facilitando a mobilidade da estrutura enzimática. Já a água em excesso pode formar múltiplas ligações de hidrogênio que restringem a mobilidade estrutural da conformação ativa. Assim, é observado que o tipo de solvente utilizado, pH, temperatura e concentração da água no meio podem alterar a atividade enzimática ^{24, 25}.

De forma geral, os efeitos dos solventes orgânicos na atividade biocatalítica surgem pela ação direta sobre a conformação nativa da enzima, ou interagindo com a água essencial da camada de hidratação. Solventes hidrofílicos ou solventes polares são os que geralmente apresentam alguma inibição enzimática.

Para classificar o solvente quanto a sua hidrofiliicidade e verificar seu efeito sobre a atividade catalítica, o parâmetro log P é o mais utilizado. A letra P representa o coeficiente de partição do solvente em análise em uma mistura *n*-octanol/água.

Como exemplo da influência do solvente, a tabela II mostra os resultados de conversão na formação de oleato de *n*-pentila e oleato de *n*-propila com diferentes solventes. A enzima utilizada foi uma lipase *Pseudomonas sp.* a 35° C em 24 horas de reação. Foram utilizados 5 mmol de ácido oleico e 5 mmol do álcool correspondente para cada reação ⁶.

Tabela II: Efeito do solvente orgânico na conversão de oleatos de *n*-pentila e *n*-propila utilizando lipase de *Pseudomonas sp* ⁶.

Solvente	Log P	Conversão %	
		Oleato de <i>n</i> -pentila	Oleato de <i>n</i> -propila
<i>n</i> -heptano	4,00	58	53
<i>n</i> -hexano	3,50	24	55
Ciclohexano	3,20	31	60
Tolueno	2,50	39	n.d.*
Diclorometano	1,50	6	n.d.*
<i>t</i> -butanol	1,45	8	10
Éter metil <i>t</i> -butílico	1,43	8	35
Éter etílico	0,83	n.d.*	n.d.*
Acetona	-0,23	8	n.d.*
Acetonitrila	-0,33	17	35

*n.d. não detectado

É observado que para este caso as maiores conversões foram alcançadas com solventes que apresentam logaritmo do coeficiente de partição positivo e acima de 2.

3.3 POLIÉSTERES A PARTIR DE ENZIMAS

Poliésteres são polímeros de condensação amplamente difundidos no mercado mundial, conforme será abordado no capítulo 4.

A utilização das lipases em catálise não convencional surge como alternativa na produção de poliésteres, visando a redução no consumo energético e a possibilidade de utilizar materiais oriundos de fontes renováveis.

Um dos métodos mais abordados para a síntese de poliésteres via enzimática é através da polimerização de lactonas não substituídas por abertura de anel em solventes orgânicos como tolueno e hexano ^{28, 29}.

É observada a maior atividade em lactonas como δ -valerolactona (δ -VL) com anel de 6 membros e ϵ -caprolactona (ϵ -CL) com anel de 7 membros. Porém existe a possibilidade de serem obtidos poliésteres com lactonas de quatro até dezessete membros. Compostos cíclicos maiores possuem menor tensão anelar, o que lhes confere menor reatividade se comparado a ϵ -caprolactona, por exemplo ³⁰.

A massa molecular também depende da família da enzima. Com as lipases *Pseudomonas* (lipases PC e PF) é possível obter polímeros com massa molecular de até $1,2 \times$

10^4 , na polimerização com lactonas.

Na obtenção de poliésteres também é possível realizar a polimerização com diácidos e seus derivados com dióis ou polióis. Experimentos com 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol e 1,8-octanodiol na presença ácido adípico ou adipato de dietila levaram a obtenção de polímeros com razoável massa molecular. Dióis e diácidos com cadeia carbônica maior também podem ser utilizados, desde que seja possível manter os monômeros do meio reacional na mesma fase. Resultados obtidos na literatura reportam a obtenção de polímeros com massa molar ponderal média (M_w) de até 4×10^4 Daltons em até uma semana de reação³⁰.

Massas molares (M_w) superiores a 4×10^4 Daltons foram obtidas através de ésteres como adipato de dietila e sebacato de dietila utilizando o 1,4-dianidrosorbitol como diol, em temperaturas de até 80°C em até uma semana de reação³¹. O solvente utilizado foi a mistura ciclohexano/benzeno, onde o etanol formado na reação de policondensação forma um azeótropo com o solvente, sendo removido por destilação ou através da utilização de peneira molecular.

Assim, a água ou alcoóis formados no processo de policondensação podem desfavorecer o curso da reação, por serem terminadores de cadeia ou por efetuarem a reação de hidrólise do material formado. A massa molecular tende a aumentar com a utilização de vácuo ou remoção deste tipo de solvente.

Geralmente, a catálise enzimática utilizando lipases inviabiliza a utilização de monômeros aromáticos^{30, 32}. O volume espacial ocupado por anéis aromáticos impede que a parte reativa da molécula fique acessível ao sítio ativo da enzima. Portanto, é esperada uma deficiência quanto às propriedades químicas e físicas do material formado a partir de processos enzimáticos, quando comparados à dos polímeros sintetizados industrialmente, uma vez que monômeros aromáticos conferem boas propriedades mecânicas, dentre outras.

A imobilização das enzimas em suportes orgânicos (principalmente em resinas acrílicas macroporosas) aumenta de forma significativa a estabilidade das enzimas, possibilitando a redução da sua concentração no meio reacional e recuperação no decorrer do processo. Um exemplo deste tipo de enzima é a Novozym 435, já explorada amplamente em trabalhos científicos^{33,14,31}.

Na tabela III, são apresentados, de forma resumida, alguns dos principais trabalhos envolvendo a síntese de poliésteres via catálise enzimática.

Tabela III: Exemplos de trabalhos da literatura que utilizaram a biocatálise não convencional (meio não aquoso) na síntese de poliésteres e seus resultados parciais obtidos.

AUTOR	ANO	ENZIMA	TEMP.	SOLVENTE	MONÔMEROS	TEMPO DE REAÇÃO	CONVERSÃO	Mn	SISTEMA
⁵⁸ Kobayashi e colaboradores	2001	Lipase PC, PPL e PS	60 a 80° C	Sem solventes e tolueno	Crolactona, valerolactona, dentre outras	Até 200 horas	50 a 98%	10.000 a 50.000	Batelada
³² Uyama, Kobayashi e colaboradores	2003	Novozym 435	60° C	Tolueno, isooctano, ciclohexano	Derivados de anidridos e 1,8-decanodiol, 1,10-decanodiol	24 horas	40 a 60 %	Até 5.000	Batelada
¹⁶ Kumar e colaboradores	2003	Novozym 435	70 a 90°C	Sem solvente	Sorbitol, glicerol, 1,8-octanodiol, ácido adípico	42 horas	Acima de 95%	17.000 a 100.000	Batelada Vácuo de 40 mmHg
⁴ Kulshrestha, Gross e colaboradores	2007	Novozym 435	70° C	Sem solvente	Trimetilolpropano, 1,8-decanodiol e ácido adípico	42 horas	80 a 90%	Até 14.000	Batelada Vácuo de 40 mmHg
³¹ Catalani e colaboradores	2010	Novozym 435	65° a 80° C	Ciclohexano, tolueno e benzeno	Isosorbídeo, dietilsebacato e dietiladipato	Até 200 horas	70 a 90%	Até 25.000	Batelada com vácuo de 2 mmHg ou destilação zeotrópica
⁶¹ Gastaldi e colaboradores	2012	Novozym 435	80°C	Sem solvente	Diésteres, diaminas e amino-ésteres	240 horas	Até 90%	2.000 a 5.000	Batelada Vácuo de 10 mBar

Poliuretanos também surgem como alternativa em processos enzimáticos. Uma das vantagens encontradas foi a síntese de poliuretanos sem o uso de isocianatos. Utilizando o monômero dihidroxietilhexametileno-bis-carbamato (0,025 mol) com ácido adípico (0,274 mol) e 1,6-hexanodiol (0,252 mol), foi possível a obtenção de poliuretanos ¹⁰.

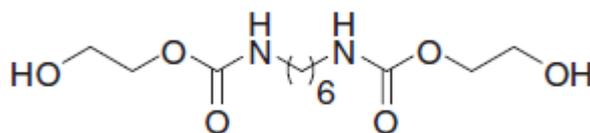


Figura 15: Monômero dihidroxietilhexametileno-bis-carbamato utilizado na síntese de poliuretanos

O sistema foi estudado com e sem solvente a 60°C com a Novozym 435, numa concentração de 3% em massa sobre o monômero ácido. Pressão reduzida foi utilizada em todos os processos para a retirada de água. Massa molar ponderal média Mw de aproximadamente 9000 Da foi obtida no sistema sem solvente em tempos de até 48 horas ¹⁰.

Com éter de difenila como solvente, massas molares Mw de até 35.000 Da e Mn de até 20.000 Da foi obtida em tempos de até 48 horas, com polidispersidade de 1,7.

Outro experimento realizado foi substituindo o solvente éter de difenila por *n*-heptano, que forma azeótropo com a água com ponto de ebulição mínimo a 83°C. Com o auxílio de vácuo, esta temperatura pode ser diminuída. Mn de 9000 e Mw de 25000 foram obtidos em tempos reacionais de 48 horas, com polidispersidade na faixa de 2,5. Neste caso as concentrações de monômero utilizadas foram similares as do sistema sem solvente ¹⁰.

Poliésteres alifáticos foram obtidos quando 1,6-hexanodiol e ácido adípico foram reagidos a 70°C em tolueno, sob pressão reduzida com a Novozym 435 a 3% em massa em relação ao monômero ácido. Mw de 37000 foi obtido e polidispersidade aproximada de 2 em tempos de 48 horas ¹⁰.

4 POLIÉSTERES E RESINAS ALQUÍDICAS

Poliésteres são polímeros de condensação amplamente utilizados na indústria do plástico (como exemplo podemos citar o PET ou polietilenotereftalato), têxtil (fibras para tecidos e cordas), indústria de tintas e vernizes, e na síntese de tensoativos ^{34,35}.

A reação de policondensação acontece pelo ataque nucleofílico do monômero diol ou polioli à carbonila do monômero diácido. Este tipo de reação é possível com o ajuste adequado da temperatura do processo. Catalisadores metálicos também podem ser utilizados neste processo. Se a água em excesso não for removida do meio, é provável que a reação de hidrólise também possa ocorrer ³⁴.

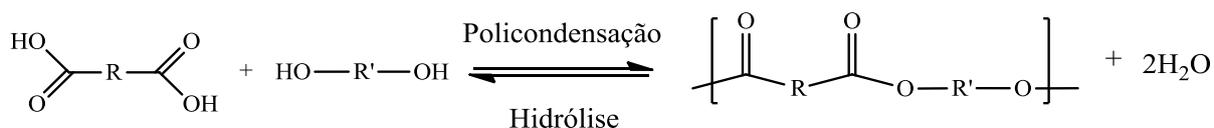


Figura 16: Esquema de reação de policondensação entre diol e diácido ³⁴.

Poliésteres também são largamente utilizados na indústria de tintas e vernizes. Uma das vantagens na utilização destas resinas é a sua versatilidade. É possível combiná-la com resinas acrílicas, fenólicas, hidrocarbônicas, resinas de silicone, epóxi e poliuretanos ³⁴.

Um dos tipos de poliésteres mais utilizados são as resinas alquídicas, que utilizam em grande parte óleos vegetais na sua composição. Dependendo da quantidade de óleo utilizada as resinas alquídicas podem ser classificadas em curta, média e longa em óleo. Quanto maior o teor de óleo vegetal na composição, maior será o tempo de secagem. Porém, menor será o

custo da resina, além propiciar boa aplicabilidade em tintas a pincel e rolo que são sistemas muito utilizados no setor imobiliário ³⁵.

A reação básica de formação de uma resina alquídica envolve a presença de um diol (ou polioliol) com um diácido, que na presença ou não de catalisadores metálicos a temperaturas que variam de 180 a 210°C, iniciam o processo de policondensação. A água formada é removida do processo pela destilação azeotrópica com o solvente apropriado (geralmente xileno) ³⁵.

Como monômeros diácidos geralmente são utilizados derivados do ácido ftálico e anidridos (anidrido ftálico, ácido isoftálico, anidrido maleico, anidrido succínico, dentre outros).

Com a utilização de monômeros hidroxilados com funcionalidade maior do que dois como pentaeritritol (funcionalidade 4) e trimetilolpropano (funcionalidade 3), maior será a ramificação e reticulação do material, formando polímeros com boa estabilidade térmica e resistência mecânica. Assim, as ramificações conferem maior dureza ao polímero em virtude da possibilidade de maior número de ligações cruzadas ³⁵.

Diversos óleos vegetais podem ser utilizados na formulação de resinas alquídicas (por exemplo óleo de soja, milho e linhaça). Estes são submetidos previamente a reações de alcoólise com monômeros hidroxifuncionais (transesterificação) gerando mono e diacilgliceróis. Além de diminuir o custo do produto, os óleos conferem boas propriedades de adesão em substratos como madeira e metal. Além disso, as insaturações conjugadas da fração óleo presente possibilitam a formação de reticulações através da oxidação pelo oxigênio do ar, a qual é facilitada pela adição de secantes (catalisadores) na composição das tintas ³⁵.

O embasamento teórico para a polimerização segue os princípios de Carothers, que deduziu uma relação entre o ponto de gel do polímero e a extensão da reação ³⁶. Esta relação foi obtida através da funcionalidade média dos monômeros envolvidos (f_{avg}),

$$f_{avg} = \frac{\sum N_i f_i}{\sum N_i} \quad (7)$$

onde N_i é o número de moléculas de monômero com funcionalidade f_i ³⁶.

Em sistemas que contém o mesmo número de equivalentes de monômero, a extensão da reação ou p_{gel} é dada pela equação

$$p = 2(N_0 - N)/N_0 f_{avg} \quad (8)$$

onde N_0 é o número de mols de monômero presentes no início da reação. Como N tende a ser zero no final da reação (contanto que não haja monômero livre), a expressão pode ser resumida da seguinte forma ³⁶

$$p = 2/f_{avg} \quad (9)$$

A partir da extensão da reação p , é possível calcular o grau de polimerização D_p ,

$$D_p = 1/(1 - p) \quad (10)$$

Com o grau de polimerização D_p , é possível calcular a massa molar numérica média teórica M_n ,

$$M_n = M_0 \cdot D_p \quad (11)$$

onde M_0 é a média das massas molares dos monômeros envolvidos ³⁶.

Para o cálculo de reações, usa-se o valor de p_{gel} calculado próximo a 1,0, visto que é esta a condição para que mais de 95% dos monômeros reajam a fim de formar um polímero com a maior massa molecular possível.

A massa molar numérica média (M_n) de um polímero alquídicico pode variar de 2000 a 5000 g/mol, aproximadamente. Já a polidispersão (M_w/M_n) pode variar de 20 a 50, como mostra a figura 17.

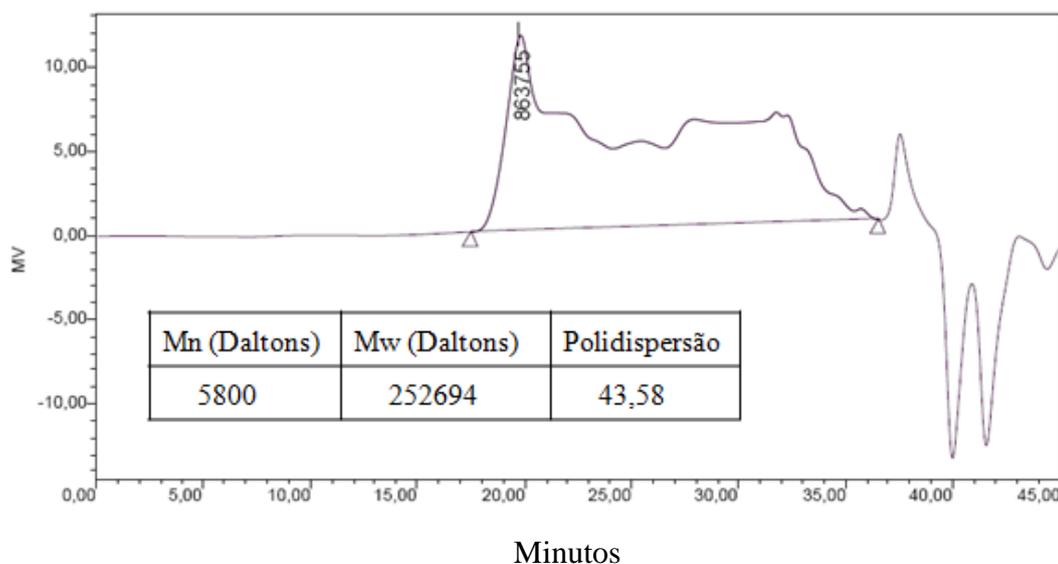


Figura 17: Cromatograma obtido experimentalmente de um polímero alquídicico por cromatografia de exclusão por tamanho.

5 OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é sintetizar poliésteres a partir da reação de diácidos carboxílicos (como o ácido adípico e Pripol®) ou ésteres bifuncionais (como o adipato de dietila) com polióis (como monoglicerídeos do óleo de soja, glicerina, trimetilolpropano, pentaeritritol, 1,10-decanodiol) via catálise enzimática heterogênea em meio não convencional (solventes orgânicos).

A enzima utilizada foi a Novozym 435, obtida comercialmente da empresa Novozymes®. A enzima foi selecionada frente a trabalhos anteriores realizados pelo grupo do Prof. César Petzhold¹⁴.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a atividade biocatalítica da Novozym 435 frente as condições do meio, verificando a toxicidade do solvente e se existe alguma inibição ocasionada pelos monômeros envolvidos.

b) Avaliar a síntese de poliésteres frente a reações de esterificação e transesterificação com e sem solventes, utilizando os reagentes descritos anteriormente. Dentre os solventes investigados estão: tolueno, ciclohexano, t-butanol, tetrahydrofurano (THF), acetonitrila, dimetilsulfóxido (DMSO) e 5-hexen-1-ol.

c) Avaliar as condições do processo para obtenção de poliésteres; em relação ao sistema de remoção de água (deslocamento de equilíbrio) e adição dos reagentes.

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 ATIVIDADE BIOCATALÍTICA

As medições da atividade biocatalítica da Novozym 435 foram baseadas na hidrólise da tributirina em água, conforme figura 18.

Primeiramente a enzima foi submetida a condições como: temperatura, solventes orgânicos e a monômeros. Após decorrido o tempo de exposição aos agentes agressivos, a enzima foi isolada e então submetida a reação de hidrólise da tributirina em água.

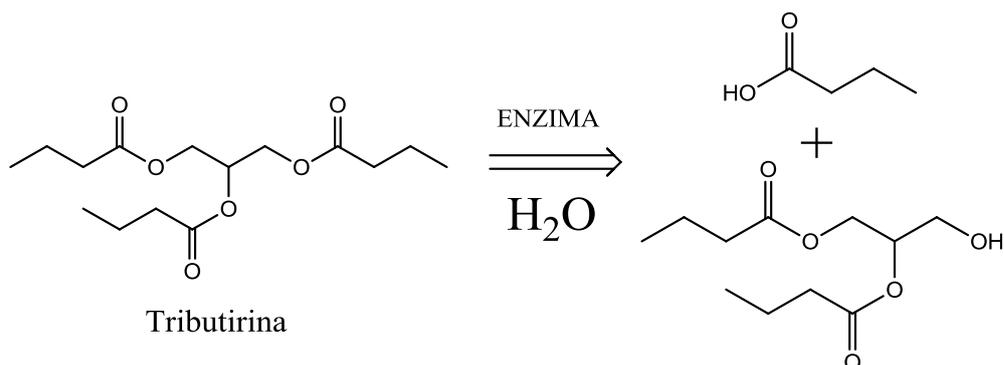


Figura 18: Esquema de reação que ilustra a hidrólise da tributirina em água, catalisada pela Novozym 435.

Assim, quanto maior a reação de hidrólise, maior será a formação de ácido butírico, e consequentemente maior a atividade da enzima, que é expressa por quantidade de ácido butírico formado por minuto, por grama de enzima imobilizada³⁷.

A formação de ácido butírico no meio pode ser visualizada pela presença do indicador vermelho de fenol. Dependendo do pH do meio, a coloração do indicador muda do vermelho (pH alcalino) para amarelo (pH ácido) e a intensidade no vermelho depende diretamente do valor de pH menos alcalino e, logo, diretamente proporcional ao ácido butírico formado.

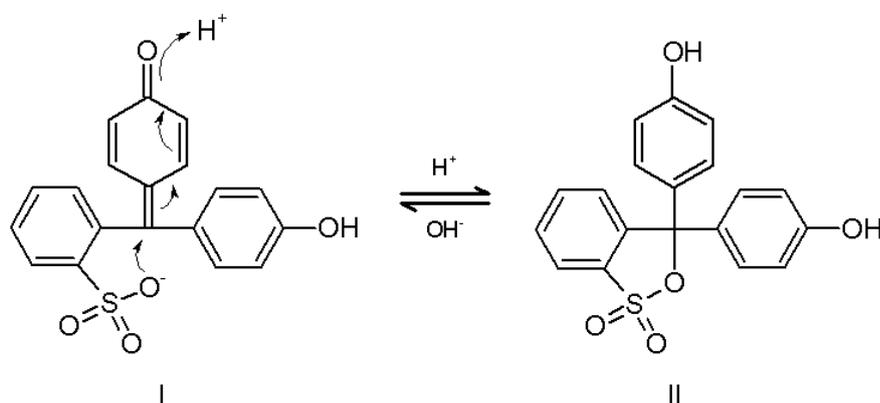


Figura 19: Indicador vermelho de fenol utilizado nas reações de hidrólise enzimática da tributirina. (I) Estrutura predominante em pH alcalino; (II) Estrutura predominante em pH ácido.

Assim, este indicador apresenta uma coloração vermelha em pH acima de 8,2 (apresentando o máximo de absorvância em 560 nm), que vai mudando a medida que diminui o pH até tornar-se completamente amarelo em pH 6,8 (máximo de absorvância em 430 nm)^{38, 39}.

A medição da variação de cor da solução reativa, assim como a atividade biocatalítica da Novozym 435 foi determinada em espectrofotômetro Varian Carry 100, com sonda acoplada e mergulhada na solução analítica, conforme mostrado na figura 20.

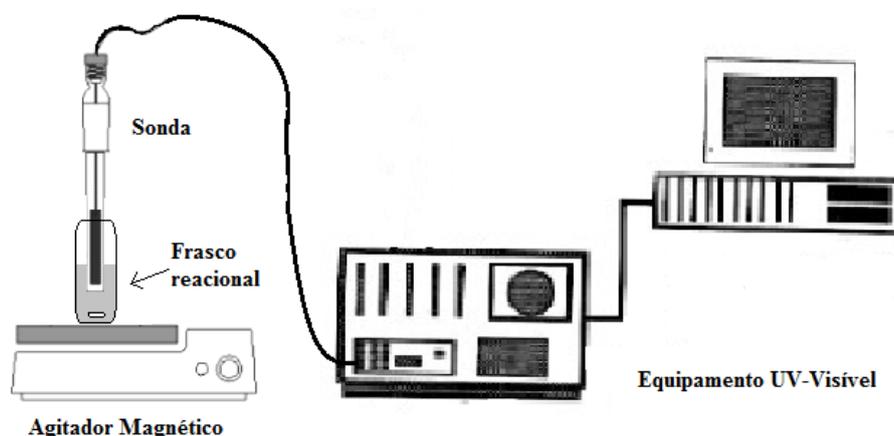


Figura 20: Equipamento utilizado na medição da atividade biocatalítica.

Para a solução reativa, primeiramente foi preparada uma solução tampão fosfato 50 mM e ajustado o pH da solução em 8,2 com hidróxido de potássio. Uma parte desta solução tampão foi utilizada para solubilizar o indicador vermelho de fenol (a uma concentração de 0,02% w/v).

À outra parte da solução tampão foram agregados 30 mM de tributirina, 100 mM de cloreto de sódio e 3,5 % de Triton X-100. A mistura foi submetida a agitação magnética por 15 minutos e posteriormente por 10 minutos no Turrax a 10.000 rpm. Após este procedimento a solução tornou-se transparente, fator fundamental para obter leituras reprodutíveis de valores de absorvância e proporcional ao ácido butírico formado.

Para a medição da atividade enzimática, a solução de tributirina e solução de vermelho de fenol foram misturadas na proporção 20:1 em volume em tubos de vidro contendo massas conhecidas da Novozym 435. Após, a sonda foi mergulhada ao tubo sob agitação magnética e medidos os valores de absorvância ao longo do tempo.

Optou-se analisar a redução da absorvância em 560 nm visto que houve menor influência da matriz se comparada a banda de 430 nm.

A redução da absorvância a 560 nm foi monitorada em intervalos de tempo de 1, 3 e 5 minutos, sendo que as medições em tempos de 3 minutos apresentaram resultados mais coerentes. Para cada tempo avaliado, as análises foram realizadas em triplicata.

Para as medições da atividade enzimática, a Novozym 435 foi inicialmente submetida a diferentes solventes e monômeros, em tempos de 30 minutos, 2 e 24 horas. Todas as amostras foram introduzidas na incubadora a 55°C em sistema fechado e submetidos a agitação de 180 rpm.

Após o tempo decorrido na incubadora, a enzima foi removida da solução (no caso da presença dos monômeros) ou do solvente e seca a temperatura ambiente. Para a retirada do excesso de monômero, quando presente, as enzimas foram lavadas com a mesma composição do solvente reacional. Após foi testada a atividade biocatalítica frente a hidrólise da tributirina.

Para a avaliação da influência dos solventes, foram utilizados: THF (tetrahidrofurano), ciclohexano, isooctano e uma mistura ciclohexano/THF 80:20 (v/v).

Para a avaliação da influência dos monômeros, uma solução contendo 10% dos monômeros ácido adípico e 1,10-decanodiol foram misturados aos solventes em análise e na relação estequiométrica. Neste caso o percentual da Novozym 435 adicionado foi de 2% em relação ao monômero ácido.

Para as medições da atividade biocatalítica da enzima, primeiramente foi realizada a construção de uma curva de calibração com diversas concentrações de ácido butírico, conforme figura 21. A solução de tampão fosfato foi ajustada a pH 8,2. Adicionou-se uma alíquota do indicador vermelho de fenol e após sucessivas adições de ácido butírico mediu-se o aumento da transmitância a 560 nm. Da mesma forma o pH foi determinado mostrando uma correlação linear decrescente.

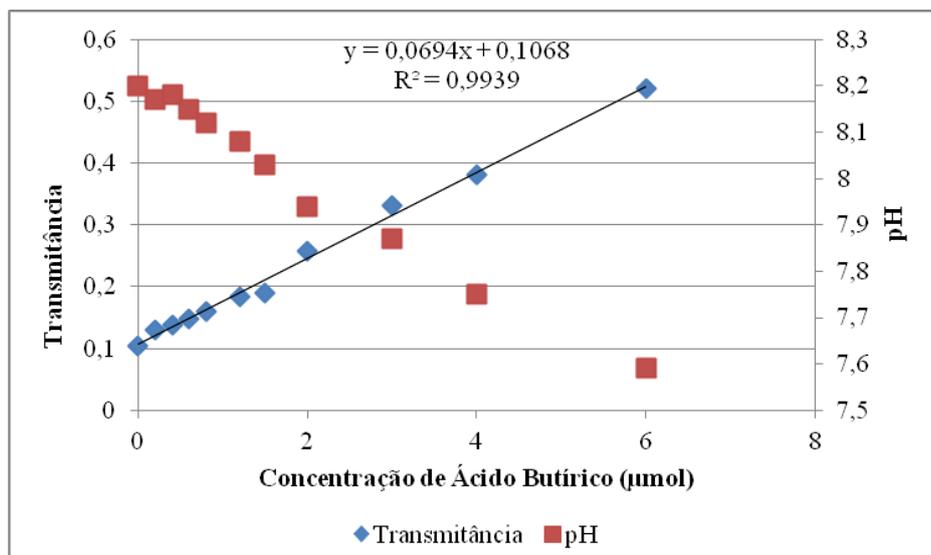


Figura 21: Curvas de calibração obtidas a 560 nm em função da transmitância e pH, a partir de diferentes concentrações de ácido butírico no meio.

6.2 REAÇÕES DE ALCOÓLISE

As reações de alcoólise (transesterificação) foram realizadas a partir do óleo de soja refinado e glicerina PA, conforme as condições estabelecidas por Barrios ¹⁴.

Nesse processo foi utilizada a Novozym 435 (imobilizada em resina acrílica macroporosa) e temperatura de 60°C. As reações foram executadas em balão de 100 mL, com agitação mecânica. O tempo total de reação foi de 8 horas. Foi adicionado ao sistema t-butanol como solvente. Após cada reação a enzima foi removida do produto através de filtração utilizando papel filtro com diâmetro de poro de 8 micrômetros.

Nas reações de alcoólise, o percentual mássico de enzima utilizado foi de 1% em relação ao óleo. O produto foi caracterizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

6.3 REAÇÕES DE POLICONDENSAÇÃO ENZIMÁTICA

Nesta etapa, os poliésteres foram sintetizados a partir de diversos alcoóis polifuncionais como glicerol, trimetilolpropano, pentaeritritol e 1,10-decanodiol e isosorbida (figura 22), além do polioli obtido de acordo com o método descrito por Barrios ¹⁴.

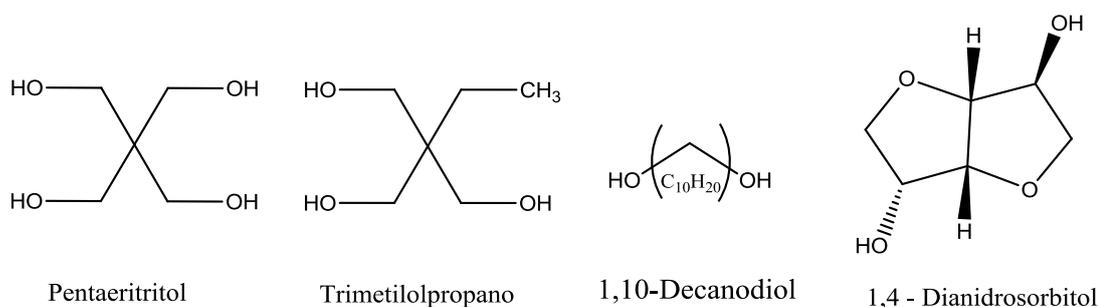


Figura 22: Estrutura química de alguns dos alcoóis polifuncionais utilizados nas reações de esterificação enzimática.

Diácidos carboxílicos (como ácido adípico e Pripol[®]) e diésteres (como adipato de dietila) foram utilizados como monômeros. O Pripol[®] foi adquirido da empresa Croda. A síntese do Pripol[®] está associada à dimerização de ácidos graxos que podem facilitar as reações de policondensação enzimática pela distância entre os grupos funcionais ácido carboxílico (figura 23). A massa molar determinada experimentalmente por SEC do Pripol[®] é de 1030 g/mol.

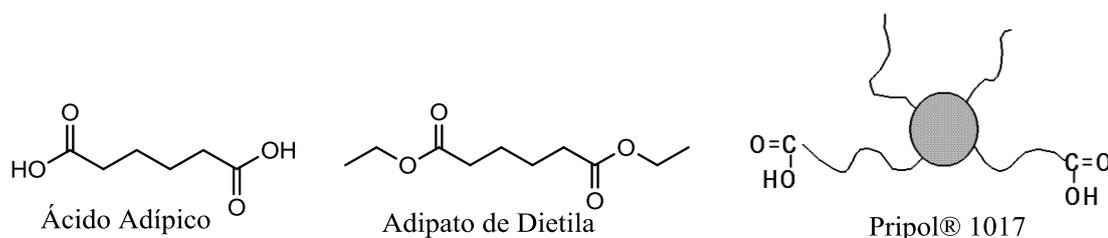


Figura 23: Principais monômeros carboxilados utilizados nas reações de policondensação.

Todos as reações foram realizadas com a Novozym 435 e executadas em balão de 100 mL, com agitação magnética. Para as reações, foram utilizados sistema fechado, sistema a pressão atmosférica e a pressão reduzida. Os tempos reacionais foram em média de até 48 horas. Os principais solventes avaliados foram: t-butanol, tolueno, ciclohexano, THF, acetonitrila e 5-hexen-1-ol. O sistema reacional foi avaliado também sem solvente. O percentual de enzima utilizada nas reações foi em média de 1 e 2% em massa em relação o grupo carboxílico presente.

Para as reações, todos os reagentes foram adicionados no meio reacional e submetidos a agitação até a solubilização total. Após atingir o equilíbrio da temperatura de trabalho a enzima foi adicionada. Em sistemas em que não houve uma solubilização efetiva dos monômeros (pelo baixo volume de solventes ou baixo poder de solvência) foi utilizado o Turrax[®] em tempos de até 15 minutos, para formar uma dispersão, antes da adição da enzima.

Para a identificação das reações foi utilizada uma sequência numérica, onde cada número corresponde a um monômero utilizado, conforme tabela IV.

Tabela IV: Identificação numérica dos principais monômeros e solventes utilizados nas reações de policondensação enzimática.

Monômeros Ácidos		Monômeros Hidroxilados		Solventes	
1	Ácido Adípico	4	Poliol Vegetal	a	t-Butanol
2	Pripol® 1017	5	Glicerol	b	Tolueno
3	Adipato de dietila	6	Trimetilolpropano	c	5-Hexen-1-ol
		7	Pentaeritritol	d	Tetrahidrofurano
		8	1,10-Decanodiol	e	Ciclohexano
		9	1,4 - Dianidrosorbitol		

As siglas iniciais RE designam que a reação de esterificação foi efetuada em solução (com ou sem solvente). O dígito zero irá dividir o monômero ácido do monômero hidroxilado. Por exemplo, uma reação entre ácido adípico e poliol vegetal será designada por RE104. Uma reação entre ácido adípico, glicerol e trimetilolpropano será designada por RE1056. Uma reação entre ácido adípico, Pripol e 1,10-decanodiol será a RE1208. A letra ao final da identificação indicará o tipo de solvente utilizado ou mistura entre eles, por exemplo: ácido adípico e 1,10-decanodiol na mistura 5-hexen-1-ol/tetrahidrofurano (THF) será designado por RE108cd.

Os polímeros obtidos foram analisados por SEC (cromatografia de exclusão por tamanho) a fim de determinar a massa molar e a conversão reacional foi calculada através do índice de acidez.

6.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

6.4.1 Acidez e Conversão

As conversões das reações foram calculadas através da análise inicial e final da acidez pelo AOCS Official Method Te 3a-64. O método consiste na titulação em triplicata do ácido remanescente com hidróxido de sódio de molaridade conhecida utilizando fenolftaleína como indicador. As alíquotas são dissolvidas em uma solução éter/etanol (2:1) e a acidez, bem como a conversão foram calculadas com as seguintes equações:

$$\text{Índice de acidez (mgKOH / g)} = \frac{V.N.56,1}{m} \quad \text{Conversão} = \left(\frac{\text{Acidez final}}{\text{Acidez inicial}} \right) \cdot 100 \quad (12)$$

Onde:

V : Volume gasto de hidróxido de sódio

N : Normalidade do hidróxido de sódio

m : massa da amostra

56,1: massa molar do KOH

6.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para as reações de alcoólise realizadas a partir do óleo de soja e glicerina, o percentual de mono, di e triglicerídeos foi determinado através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O equipamento utilizado foi um Shimadzu LC-20AT com detector UV 254 nm modelo SPD-M20A, interface modelo CBM-20A e coluna Ascentis TM C18 (150 x 4.6 mm D.I.) obtida da Supelco. Os solventes utilizados foram: água, acetonitrila, isopropanol e a mistura isopropanol/hexano (5:4, v/v). A metodologia foi baseada naquela utilizada por Dall'Alba ⁴⁰. Os tempos de retenção foram verificados através da corrida de padrões de glicerídeos onde monoglicerídeos variam de 5-14 minutos, diglicerídeos de 22-32 minutos e triglicerídeos acima de 35 minutos. O percentual dos produtos foi calculado pela divisão das áreas correspondentes (mono, di e triacilgliceróis) e pela da soma das respectivas áreas.

Na figura 24 é mostrado um cromatograma obtido de uma das reações de alcoólise com a Novozym 435 e os respectivos tempos de retenção dos mono, di e triglicerídeos.

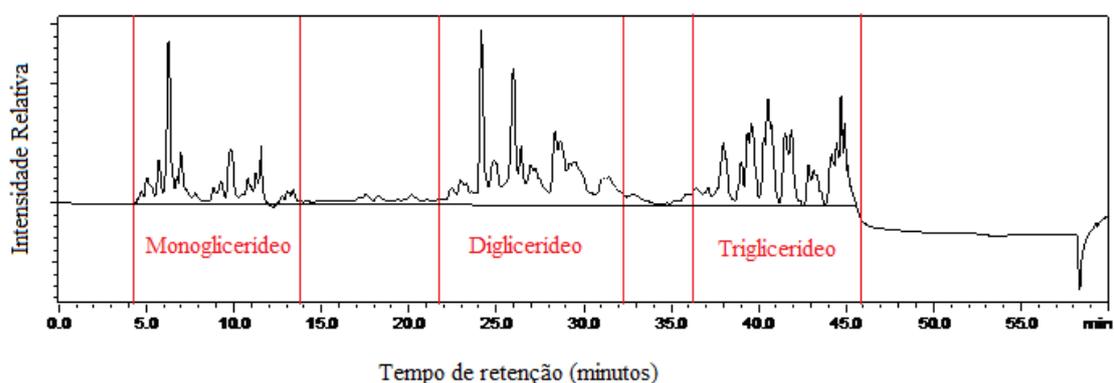


Figura 24: Cromatograma obtido por CLAE do poliálcool sintetizado através da reação da Glicerina com Óleo de Soja na presença de t-Butanol, catalisada pela Novozym 435.

6.4.3 Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC)

A cromatografia de exclusão por tamanho foi realizada no equipamento Viscotek VE 2001 utilizando THF como eluente, a temperatura de 45°C. O detector utilizado para as

análises foi o de índice de refração. O equipamento dispõe de quatro colunas reticuladas de poliestireno/divinilbenzeno em série com tamanhos de poro que variam de 500, 10^3 , 10^4 e 10^5 Å. O equipamento foi calibrado com padrões de poliestireno.

6.4.4 Titulação por Karl Fischer

O teor de água foi determinado pela titulação Karl Fischer baseado no método de determinação volumétrica. O equipamento utilizado foi 870 Titrino plus. As análises foram realizadas em triplicata. A quantidade de amostra titulada foi de aproximadamente 0,1 gramas, sendo o resultado expresso em ppm (partes por milhão) de água por grama de amostra.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 ATIVIDADE BIOCATALÍTICA

Uma das principais metodologias para a medição da atividade biocatalítica no caso da Novozym 435 é a quantidade de laurato de *n*-propila formado, ou do inglês “*Propyl Laurate Units*” da sigla PLU, onde é verificada a conversão do éster através da reação entre 1-propanol e ácido láurico, a 60° C por 15 minutos ²².

Neste caso em específico, a metodologia empregada na caracterização da atividade biocatalítica da Novozym 435 não é o abordado na literatura para enzimas imobilizadas. É um método aplicado a hidrolases do grupo EC 3.5.1.11 ^{37, 38}. Este método foi utilizado devido a disponibilidade de equipamento e reagentes do laboratório.

A atividade enzimática, simbolizada pelas letras U ou A (esta, utilizada neste trabalho) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de ácido butírico, a partir da hidrólise da tributirina, por minuto a 25°C.

Para interpretação dos dados, os valores de atividade obtidos foram normalizados com os resultados de atividade da enzima no tempo zero (A0), ou seja, referente a atividade da enzima não exposta ao meio agressivo. Quanto mais próximos os valores de A/A0 de 1, menos agressivo foi o meio à enzima, ou seja, maior a atividade.

A escolha dos solventes para avaliação da atividade biocatalítica da Novozym 435 foi realizada em função de reações preliminares e dados da literatura. Ciclohexano e isooctano apresentam altos valores de coeficientes de partição octanol/água, sendo muito indicados para processos enzimáticos em meio não convencional. Porém apresentam uma baixa solubilidade dos monômeros envolvidos no processo (como ácido adípico e 1,10-decanodiol), podendo dificultar o processo de policondensação enzimática. Por outro lado a baixa solubilidade pode

auxiliar na manutenção da atividade biocatalítica ao longo do tempo pois os monômeros podem apresentar toxicidade à enzima. Quanto mais solúveis estiverem no meio, maior pode ser o efeito inibitório envolvido. Porém com baixa solubilidade, a difusão do monômero para o interior do suporte macroporoso pode ser prejudicado.

O solvente THF (tetrahydrofurano) foi utilizado, pois proporciona uma boa solubilidade dos monômeros envolvidos. Porém devido ao baixo valor de coeficiente de partição octanol/água, não o torna um bom solvente para processos enzimáticos.

Na figura 25 é avaliada a atividade catalítica da enzima (A/A0) ao longo de 24 horas com quatro diferentes solventes: THF, ciclohexano, isooctano e a mistura ciclohexano/THF na proporção 5:1 em volume.

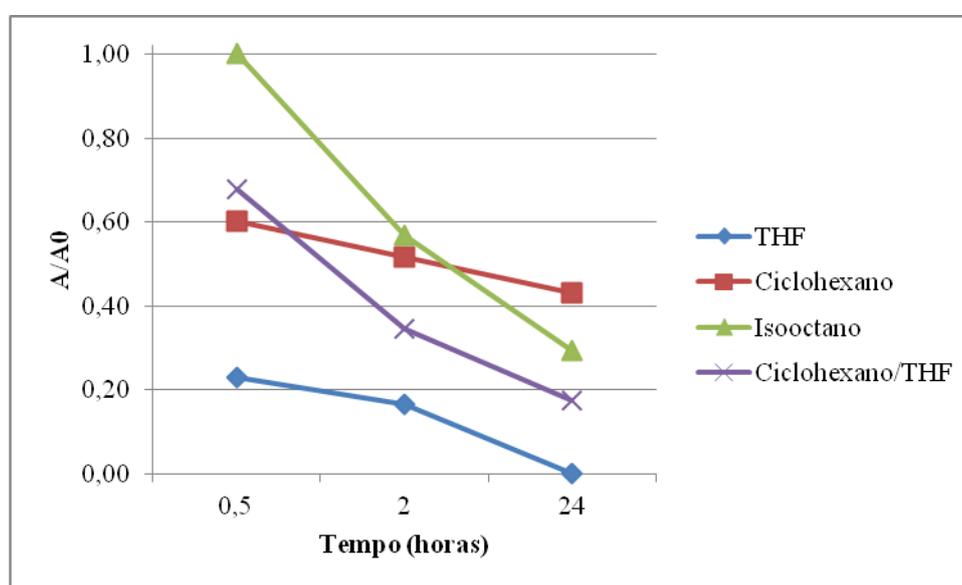


Figura 25: Gráfico da atividade biocatalítica da Novozym 435 normalizada em função do tempo para diferentes solventes a 55°C.

O efeito mais danoso a enzima é observado no solvente THF. Em 15 minutos de reação a atividade cai drasticamente e decai praticamente a zero em 24 horas de exposição. Outro comportamento observado em THF foi a mudança na morfologia das partículas da Novozym 435, em tempos de até 24 horas de exposição, conforme observado na figura 26, onde é comparada a enzima exposta a THF e a ciclohexano. Provavelmente o solvente THF esteja modificando estruturalmente parte do polímero acrílico que compõe o suporte.

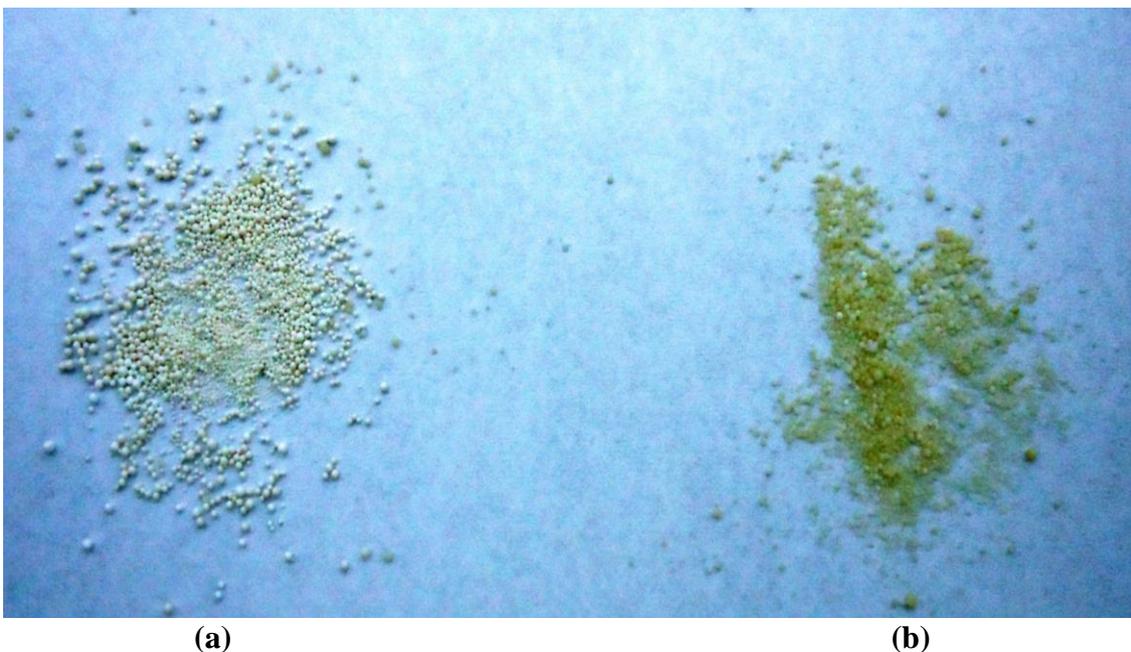


Figura 26: Imagem da Novozym 435 exposta a solventes por 24 horas a 55°C. (a) Ciclohexano; (b) THF (tetrahidrofurano)

A atividade biocatalítica da enzima em isooctano não é afetada até o tempo de 30 min, mas a atividade decai para 60% em 2 horas e após 24 h para menos de 30%. O melhor solvente avaliado foi o ciclohexano, que apresentou o maior tempo de meia vida, ou seja, maior estabilidade ao longo do tempo. A mistura de solventes ciclohexano/THF 5:1 também foi avaliada e mostrou-se melhor atividade catalítica em comparação ao THF puro, e comportamento inferior ao ciclohexano puro ao longo do tempo.

Na figura 27 é apresentado o gráfico da atividade biocatalítica à exposição aos monômeros ácido adípico (20 mmol) e 1,10-decanodiol (20 mmol) avaliada em três diferentes solventes: ciclohexano, isooctano e ciclohexano/THF. Este último é que mantém a atividade biocatalítica da enzima com a menor variação ao longo do tempo. É importante salientar que a única composição de solventes que solubilizou totalmente os monômeros envolvidos foi a que utilizou ciclohexano/THF. A relação 5:1 foi definida como a menor concentração de THF necessária para solubilização dos monômeros. Na composição ciclohexano/THF 5:1, é verificar a baixa solubilidade inicial dos monômeros, principalmente do ácido adípico. O sistema torna-se solúvel apenas a 60°C e a medida que a reação vai se processando, observa-se que o meio reacional fica solúvel mesmo a temperatura ambiente, devido a formação de ésteres, mais solúveis que o ácido para este sistema.

Nos demais solventes isto não acontece, havendo a presença de monômero insolúvel em todo momento.

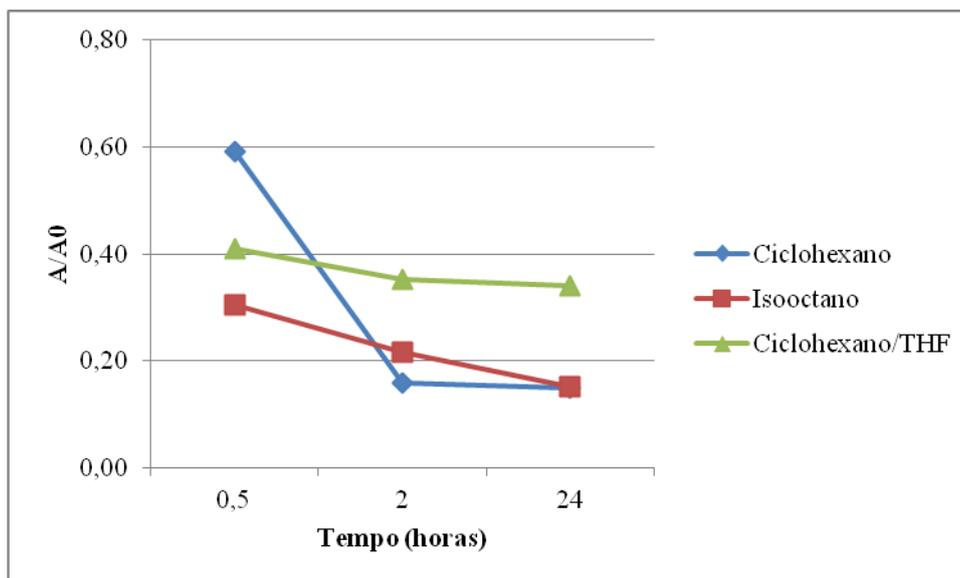


Figura 27: Influência dos monômeros ácido adípico (20 mmol) e 1,10-decanodiol (20 mmol) na atividade da Novozym 435 nos diferentes tipos de solvente ao longo do tempo, a 55°C.

Pela cinética de Michaelis – Menten, era esperado que tanto nas avaliações com os diferentes solventes assim como na avaliação com os monômeros uma correlação linear entre a taxa de reação (ou atividade A) com a concentração de enzima no meio. Ou seja, dobrando a concentração de enzima no meio, seria esperado o dobro da atividade. Porém tal fenômeno não ocorreu. Este fenômeno pode estar associado a alta atividade biocatalítica da Novozym 435, que já em 1 minuto de reação ultrapassou a zona de linearidade esperada. Para permanecer na zona de linearidade, é importante que a tributirina fosse substituída por um triglicerídeo de cadeia carbônica maior como a tripalmitina, por exemplo. Assim a velocidade inicial seria menor possibilitando a sua medição reprodutível com o mesmo peso de Novozym 435 (1 a 3 mg) ou com a tributirina se fosse possível pesar e usar frações reprodutíveis, inferiores a 1 mg de biocatalisador.

Considerando esta avaliação inicial da atividade catalítica da Novozyme 435, o sistema que apresentou melhor resultado na presença dos reagentes foi aquele empregando a mistura 5:1 entre os solventes ciclohexano/THF e portanto, será empregado para as reações de condensação.

7.2 REAÇÕES DE POLICONDENSAÇÃO

No processo de policondensação enzimática, foram empregados diferentes monômeros e métodos para a obtenção de poliésteres. Em todos os casos as reações de policondensação foram realizadas utilizando a Novozym 435 como biocatalisador.

As seguintes variáveis foram investigadas: solventes, concentração da Novozym 435 e

monômeros (polióis e ácidos dicarboxílicos), visando obter polímeros com massa molar numérica média (Mn) entre 2000-7000 Da, ideais para preparação de resinas alquídicas.

Devido a isto, um dos polióis de maior interesse na investigação são aqueles obtidos através da reação de alcóólise de triglicerídeos com glicerina, os quais foram sintetizados de acordo com a metodologia de Barrios¹⁴, a partir da reação de transesterificação de óleo de soja com glicerol, numa razão estequiométrica 1:2,4 respectivamente, empregando a enzima Novozym 435 1% (m/m) sobre o óleo.

Na alcóólise com a Novozym 435 (*Candida antarctica*) pode ocorrer a formação de 4 distintos produtos (1,2-diglicerídeo, 1,3-diglicerídeo, 2-monoglicerídeo e 3-monoglicerídeo) visto que a enzima não possui especificidade frente a hidroxilas primárias ou secundárias (figura 28). Segundo o autor¹⁴ o t-butanol aumenta a seletividade da reação levando a maior formação de monoglicerídeos, que constituem o produto de maior interesse para a posterior síntese de poliésteres, tendo em vista a presença da bifuncionalidade. Foram obtidos valores maiores que 50% em monoglicerídeos determinados por CLAE e de acordo com resultados já descritos na literatura¹⁴.

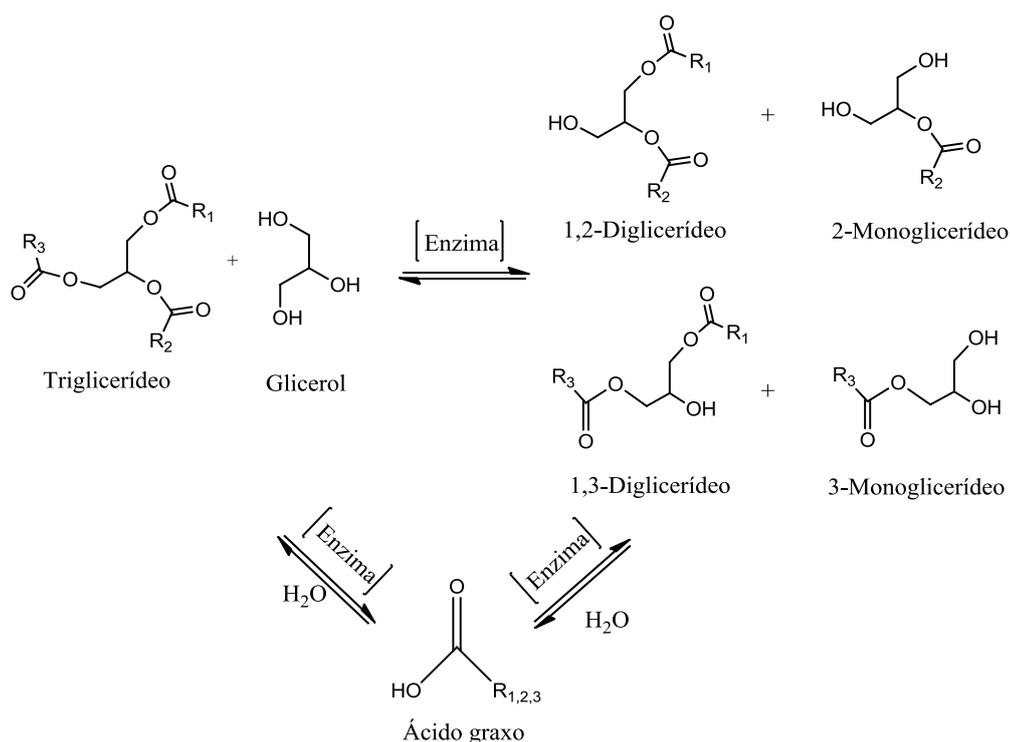


Figura 28: Reação de alcóólise de triglicerídeos com glicerol e os diferentes produtos obtidos.

A presença de água no sistema pode acarretar na formação de ácido graxo livre, porém valores muito baixos de ácido graxo livre foram obtidos, ficando na faixa de 5%.

Vale salientar que para a etapa da policondensação, o polioliol obtido através deste processo é uma mistura de mono, di e triglicerídeos, além do ácido graxo livre e será

denominado simplesmente de poliol vegetal. Para as reações de policondensação, é fundamental um alto teor de monoglicerídeos, já que diglicerídeos e ácido graxo livre são agentes terminadores de cadeia (monômeros monofuncionais).

7.2.1 Influência do solvente

Apesar da influência do solvente sobre a atividade e seletividade biocatalítica da enzima ter sido avaliada na seção 7.1, foram realizados experimentos de policondensação enzimática variando o solvente do meio reacional.

Primeiramente foram avaliadas reações entre poliol vegetal (mistura de mono, di e triacilgliceróis e ácido graxo livre) e ácido adípico: RE104 (sem solvente), RE104a (t-butanol), RE104b (tolueno) e RE104c (5-hexen-1-ol).

Nesta série de reações, o percentual da Novozym 435 foi mantido constante em 1% sobre a massa do monômero ácido e a relação entre ácido adípico e poliol vegetal mantida em 55,5 mmol e 60 mmol, respectivamente. A conversão foi determinada após 24 e 48 horas de reação via índice de acidez e, para a maioria dos experimentos, ocorreu aumento da conversão com o tempo indicando que não foi atingido o equilíbrio da reação. Porém, na sequência avaliada (das reações RE104), a baixa solubilidade do ácido adípico pode ter prejudicado a formação do polímero por questões difusionais, como pode ser verificado no sistema em t-butanol, onde a conversão após 48h foi de aproximadamente 20%.

Além disso, a alta concentração do ácido adípico envolvido também pode estar prejudicando o desempenho biocatalítico da enzima. Conforme avaliado na seção 7.1 para iso octano e ciclohexano, os próprios monômeros apresentam toxicidade à enzima. O ácido adípico em alta concentração também pode alterar o pH da água presente da camada de hidratação da enzima. Se o pH estiver a valores muito baixos (inferiores a pH 4), pode ocasionar inibição reversível ou mesmo inativação da enzima. Entretanto, mesmo reduzindo a concentração do ácido à metade não houveram bons resultados de conversão.

Quanto ao cálculo da massa molar numérica média teórica (M_n), são previstas massas próximas a 5100 g/mol na série com poliol vegetal (série RE104), e valores próximos a 3500 g/mol utilizando 1,10-decanodiol (série RE108), com conversões próximas a 95% em ambos os sistemas. Os valores teóricos podem divergir dos resultados obtidos experimentalmente devido a construção da curva de calibração do equipamento de cromatografia de exclusão por tamanho, que utiliza padrões de poliestireno obtidos através de polimerização aniônica. Estes padrões possuem volume hidrodinâmico diferente aos polímeros sintetizados.

Tabela V: Reações de policondensação enzimática entre poli(1,10-decanodiol) e ácido adípico variando o solvente.

Reação	Solvente	Mn	Mw/Mn	Conversão	
		g/mol		48 h	48 h
RE104	Sem solvente	1200	2,0	37	42
RE104a	t-Butanol	1300	3,0	9	21
RE104b	Tolueno	700	2,0	26	32
RE104c	5-hexen-1-ol	700	5,0	27	35
RE108d	THF seco	660	2,0	45	46
RE108cd	THF/5-Hexen-1-ol (5:2)	3300	1,5	43	41
RE108de	Ciclohexano/THF (5:1)	4700	1,3	83	88

O 5-hexen-1-ol foi o álcool primário utilizado como solvente visando a melhoria da solubilidade. Na literatura o 5-hexen-1-ol é indicado como iniciador na policondensação enzimática de lactonas (efetua o ataque nucleofílico à carbonila do anel ocasionando a sua abertura)⁵⁸. Observou-se uma maior conversão na utilização do 5-hexen-1-ol quando comparado com t-butanol. Porém inferior a reação sem solvente, o que pode estar associado à incorporação do álcool primário à cadeia, agindo como um terminador. Outro ponto que pode estar relacionado a baixa conversão é que o poli(1,10-decanodiol) vegetal também possui uma certa porcentagem de monômeros monofuncionais como: ácido graxo livre e diglicerídeos. Como estes monômeros são terminadores de cadeia, causam a redução da conversão. O poli(1,10-decanodiol) sintetizado apresentou concentrações similares às encontradas na literatura, sendo os valores obtidos próximos a: 50% de monoglicerídeos, 25% de diglicerídeos, 20 de triglicerídeos e 5% de ácido graxo livre.

Com o intuito de melhorar a conversão, passou-se a avaliar o efeito do solvente em reações de policondensação empregando como monômero hidroxifuncional o 1,10-decanodiol (série RE108).

Conforme já abordado, outro fator observado foi a baixa solubilidade do ácido adípico nas primeiras quatro tentativas da RE104. As reações subsequentes de ácido adípico com 1,10-decanodiol foram realizadas empregando THF, apesar da toxicidade conhecida. Na série de reações RE108 houve uma boa solubilidade de ambos os reagentes e aumento das conversões. Na RE108d em que foi utilizado THF seco com sódio metálico (tratamento não realizado com os demais solventes), apesar do aumento da conversão, não houve incremento em massa molar, se comparado às reações anteriores com poli(1,10-decanodiol) vegetal, o que pode estar relacionado com a menor massa do 1,10-decanodiol. É importante salientar que as massas molares são determinadas via SEC, na qual são empregadas curvas de calibração com padrões de PS, o

qual apresenta volume hidrodinâmico diferente aos poliésteres sintetizados, e que apresenta influência também do tipo de solvente utilizado no sistema reacional.

A remoção excessiva da água dos solventes (como o tratamento via sódio metálico utilizado na RE108d) pode prejudicar a atividade enzimática. A água presente no sistema também é importante para a manutenção da camada de hidratação da enzima, possibilitando assim a mobilidade das estruturas secundárias próximas ao sítio ativo. O teor de água necessário varia conforme o tipo de solvente. Dependendo do coeficiente de partição octanol/água o solvente disponibilizará mais ou menos água livre no sistema, que será adsorvido pela enzima. Quantidades maiores de água adsorvida pela enzima podem também prejudicar a mobilidade de estruturas secundárias, prejudicando a atividade biocatalítica.

Houve incremento em massa molar na RE108cd, em que utilizou-se ácido adípico e 1,10-decanodiol na mistura de solventes THF/5-hexen-1-ol na proporção 5:2 em volume. É importante observar que nesta reação não foi realizado tratamento dos solventes para remoção da água. Isto indica a necessidade da presença de água no sistema para manutenção da atividade enzimática. Entretanto, o excesso de água formada na reação pode adsorver na superfície da enzima dificultando a mobilidade estrutural da conformação ativa ou até mesmo efetuando a hidrólise do material formado, prejudicando o andamento da reação.

Na RE108de foi utilizada a mistura de solventes ciclohexano/THF na relação 5:1 em volume, também na presença de ácido adípico e 1,10-decanodiol. Houve um incremento significativo na conversão (88%) e massa molar (4700 g/mol), indicando que ambos os fatores como: presença de água, solubilidade dos monômeros no meio reacional e ausência de impurezas monofuncionais são decisivos para obter poliésteres via enzimática.

Na figura 29 são apresentadas de forma esquemática as reações de policondensação enzimática realizadas nos diferentes solventes.

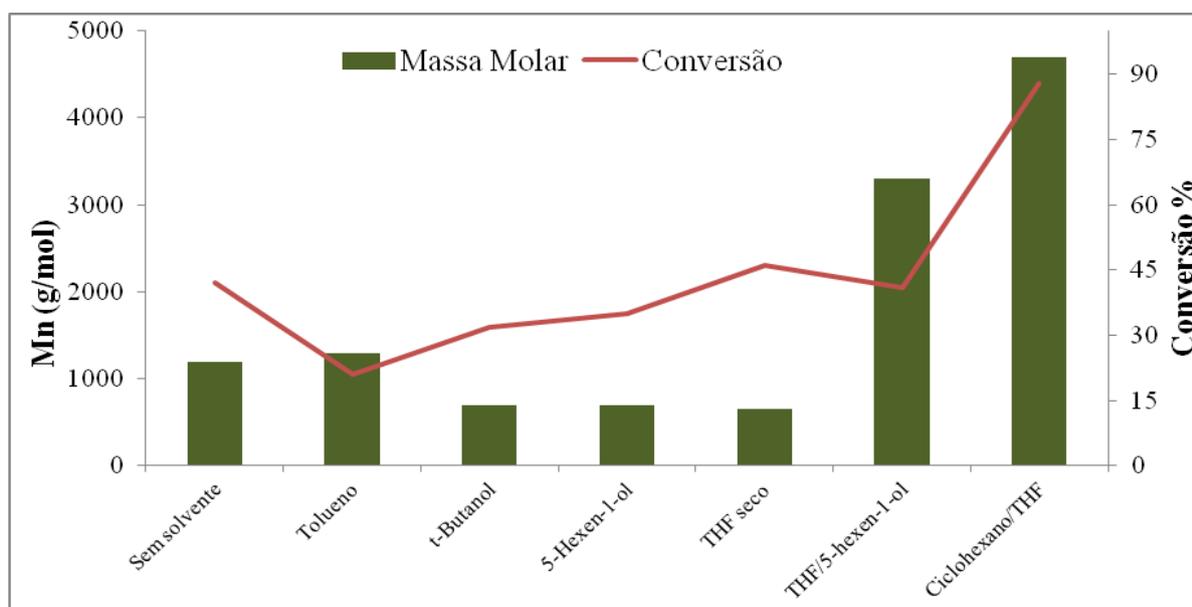


Figura 29: Resultados de conversão e massa molar (Mn) das reações de policondensação enzimática realizadas em diferentes solventes.

Os melhores resultados foram os obtidos com a utilização dos solventes ciclohexano/THF, onde ocorre menor perda de atividade enzimática ao longo do tempo, conforme já observado na seção 5.1. Porém, a escolha do monômero hidroxifuncional também influenciou no incremento de massa molar e conversão.

Devido a possível toxicidade dos monômeros à enzima, foi reduzida a concentração de monômeros para 7,5 mmol auxiliando assim também a melhoria da solubilidade.

Na série de reações RE108de, RE108de2, RE108de3, RE108de4, foi verificada a influência da temperatura e a relação entre os solventes ciclohexano e tetrahydrofurano. Os monômeros utilizados foram o ácido adípico e 1,10-decanodiol, mantidos a 7,5 mmol cada. O percentual de enzima foi de 3% em massa sobre o monômero ácido. As reações foram realizadas em volume de 30 mL da mistura de solventes e as massas molares determinadas em tempos de 48 horas.

Em comparação a RE108de realizada a 60° C, a RE108de3 foi realizada a 80°C. Houve redução na conversão e massa molar, indicando desnaturação da enzima a temperaturas maiores. Na RE108de2 e RE108de4, foi avaliada a influência da composição do solvente, onde foi utilizada a relação 10:1 e 3:1 em volume de ciclohexano:THF, respectivamente. Também neste caso não houve melhoria na conversão e massa molar, indicando que a solubilidade dos monômeros é mais importante que a desativação da enzima frente ao THF ou aos reagentes.

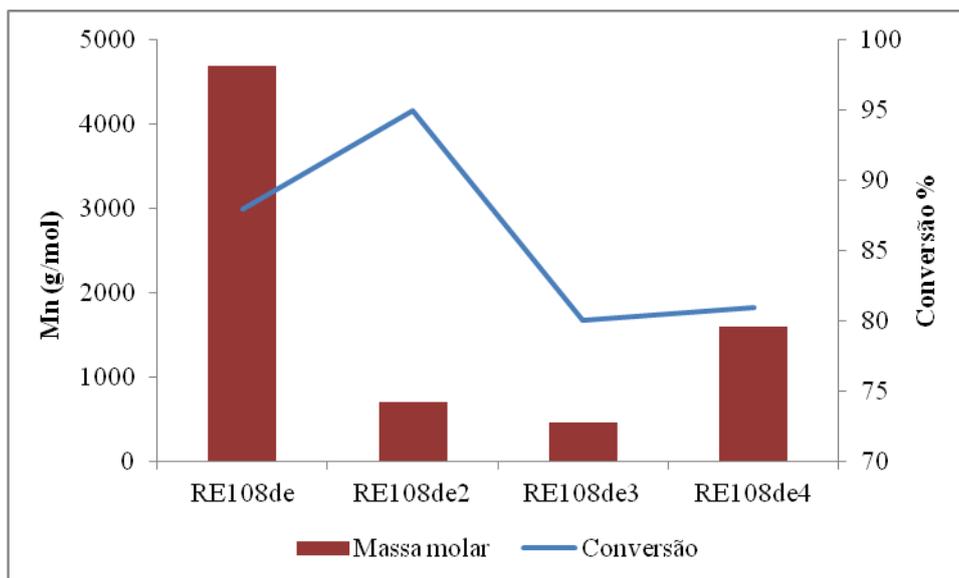


Figura 30: Variação de temperatura e proporção de solventes na reação entre ácido adípico e 1,10-decanodiol com a Novozym 435 para 7,5 mmol de monômeros. RE108de: 60°C e mistura 5:1 entre ciclohexano/THF; RE108de2: 60°C e mistura 10:1 entre ciclohexano/THF; RE108de3: 80°C e mistura 5:1 entre ciclohexano/THF; RE108de4: 60°C e mistura 3:1 entre ciclohexano/THF.

Solventes polares com baixo coeficiente de partição como dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrila e acetonitrila/água 9:1 em volume também foram avaliados. Para o dimetilsulfóxido houve uma boa solubilidade dos monômeros envolvidos. Porém sua toxicidade à enzima não possibilitou formação de produtos. Bons resultados de solubilidade foram atingidos com acetonitrila, mas também não possibilitaram a formação de produtos, apesar da acetonitrila ser empregada por diversos autores na obtenção de poliésteres via catálise enzimática.

7.2.2 Influência do polioli

Para entender a influência dos monômeros hidroxifuncionais, diversos polióis foram avaliados em reações de policondensação enzimática empregando a Novozym 435. Nesta seção também foram empregados monômeros polifuncionais com o intuito de obter poliésteres ramificados e ou reticulados e verificar a atividade enzimática. Na tabela VI estão os resultados destas reações de policondensação.

Para esta série, o solvente utilizado foi o t-butanol e o percentual da Novozym 435 de 1% sobre a massa do monômero ácido.

Vale lembrar que esta série foi desenvolvida em paralelo ao estudo da atividade enzimática da seção 7.1, não sendo utilizada a composição de solventes que originam os melhores resultados. Porém, importantes informações puderam ser obtidas.

Tabela VI: Resultados das reações de esterificação variando o monômero hidroxifuncional.

Reação	Mmol de diácido/adipato		Mmol de diol/poliol			Mn g/mol	Mw/Mn	Conversão	
	Ácido Adípico	Adipato de dietila	Poliol	1,10-decanodiol	Gli/TMP/Penta	48 horas		24 horas	48 horas
RE105a	137	0	0	0	137/0/0	320	2,0	-	32
RE1057a	137	0	0	0	68/0/68	420	>100	13	14
RE1056a	137	0	0	0	68/69/0	300	2,0	11	15
RE104a	55	0	60	0	0	1250	3,3	9	21
RE1046a ¹	46	0	50	0	0/20/0	410	2,5	10	17
RE108a	68	0	0	81	0	2400	2,0	62	85
RE1048a	68	0	25	65	0	1200	2,5	61	52
RE305a	0	50	0	0	50/0/0	200	4,0	40	50

OBS 1: Policondensação executada imediatamente após a alcoólise, no mesmo balão reacional.

Na RE105a o monômero hidroxil funcional utilizado foi o glicerol puro, que apresenta funcionalidade três ($f = 3$) e grupos hidroxilas de diferentes reatividades (OH primários e secundários). Na RE1057a foi utilizada uma relação mássica 6:4 entre pentaeritritol e glicerol, que representa uma f_m (funcionalidade média) = 3,5. Já na RE1056a foi utilizada uma relação mássica 6:4 entre trimetilolpropano e glicerol, com f_m igual a 3. Comparando as reações, nota-se que ocorreu uma diminuição na conversão com a utilização dos monômeros pentaeritritol e trimetilolpropano, os quais apresentam somente OH primários mais reativos que os secundários. Além disso, a reação com pentaeritritol (RE1057a) levou a um aumento abrupto na polidispersão. Este fato pode ser explicado pela baixa solubilidade em t-butanol dos monômeros dificultando sua incorporação. Estes monômeros são de fundamental importância para o aumento das ramificações e, conseqüentemente, da formação de ligações cruzadas do polímero que propiciam aumento da resistência química e física. Nestas reações a dosagem excessiva de monômeros também pode ter contribuído para a baixa conversão.

Trimetilolpropano (TMP) e pentaeritritol também foram reagidos com ácido adípico sob as mesmas condições de temperatura e biocatalisador utilizando a composição de solventes ciclohexano/THF 5:1 em volume. Novamente as conversões foram baixas (menores que 10%) e parte dos monômeros ainda restou insolúvel no meio. Para o TMP (que é altamente higroscópico), foi realizada a sua recristalização em acetonitrila e posteriormente secagem sob vácuo, antes da reação de policondensação. Assim, para estas condições reacionais, a Novozym 435 não mostrou boa atividade em relação a monômeros com funcionalidade três ou superior.

A reação RE104a foi conduzida com ácido adípico e poliol vegetal, este último totalmente solúvel em t-butanol, e levou a um aumento da massa molar e conversão, porém ainda baixa. A adição de trimetilolpropano (RE1046a) ocasionou uma redução na conversão e na massa molar. Nesta reação RE1046a, a policondensação foi efetuada imediatamente após a síntese do poliol (mistura de mono, di e triglicerídeos, além do ácido graxo livre) no mesmo balão reacional.

Na reação RE108a foi utilizado 1,10-decanodiol ($f = 2$) como monômero hidroxilado. Neste caso obteve-se uma conversão superior a 85% em 48h de reação e uma massa molar superior a 2000Da. Este resultado confirma os dados da literatura, isto é, a utilização de monômeros lineares com espaçadores carbônicos maiores como o 1,10-decanodiol contendo somente hidroxilas primárias são favorecidas na reação com lipases^{16, 30}. Na RE1048a, foi adicionado, além do 1,10-decanodiol, poliol vegetal, resultando em uma diminuição da conversão e da massa molar. Este redução da conversão pode estar associada ao baixo percentual de monoglicerídeos do poliol, ou a repulsão estérea causada pelo poliol ao sítio ativo, dificultando a inserção na cadeia polimérica.

A figura 31 mostra o quadro geral da influência do tipo de monômero na preparação do poliéster via enzimática. O melhor resultado (conversão e massa molar) foi obtido para o monômero 1,10-decanodiol (RE108).

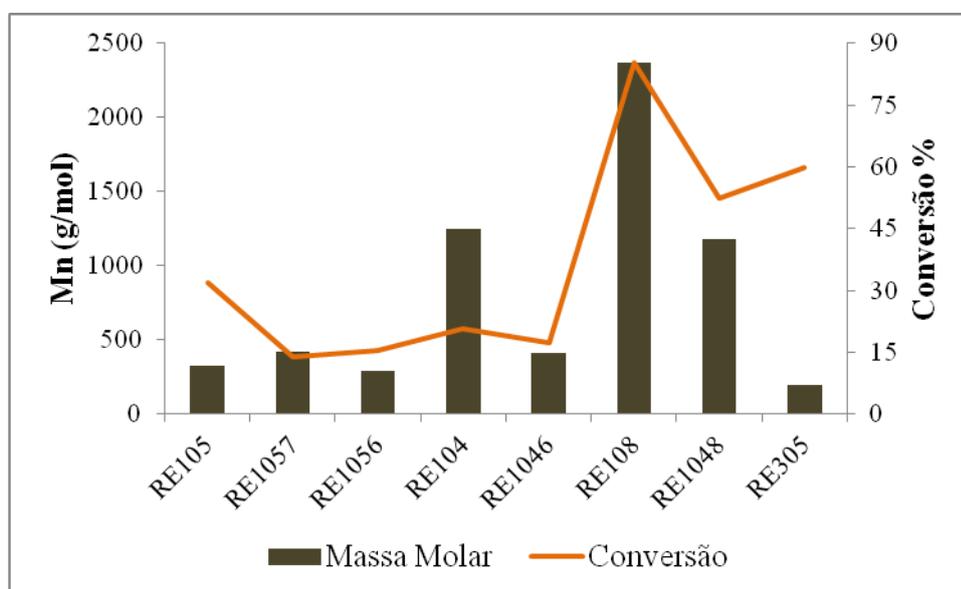


Figura 31: Reações de esterificação variando o monômero hidroxifuncional e os resultados de Massa Molar e Conversão.

Com o intuito de avaliar outros monômeros hidroxifuncionais, o 1,4-dianidrosorbitol ou também conhecido como isosorbida foi reagido com ácido adípico. O 1,4-dianidrosorbitol,

é um monômero obtido da frutose. Sua estrutura (conforme figura 22) pode conferir maior rigidez ao poliéster formado, melhorando propriedades físicas. Assim, o isosorbida foi reagido com ácido adípico na presença da Novozym 435 em duas composições distintas de solventes: ciclohexano/tolueno 5:1 em volume e ciclohexano/THF na proporção 5:1, também em volume. Em ambos os casos não houve resultados positivos em conversão e massa molar, o que pode estar relacionado a repulsão estérea causada pela isosorbida ao sítio ativo, dificultando a inserção na cadeia polimérica.

Para obter um polímero ramificado, pentaeritritol e trimetilolpropano também foram utilizados em reações com ácido adípico, seguindo as condições da RE108de, porém baixas conversões foram atingidas.

7.2.3 Influência do monômero ácido e teor de enzima

Inicialmente, com o intuito de melhorar a solubilização dos reagentes, foi realizada uma reação (RE305a – Tabela VI) substituindo o ácido adípico por adipato de dietila, e reagido com glicerol. Neste caso, a determinação da conversão foi realizada por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Houve redução da massa molar do polímero quando utilizado o adipato de dietila, apesar do aumento da conversão. Mesmo com a maior solubilidade do adipato, a presença do grupo etila deve estar dificultando o acesso ao sítio ativo da enzima. A formação de etanol no meio também deve prejudicar o aumento da massa molar visto que o etanol pode atuar como terminador de cadeia.

Adipato de dietila e poliol vegetal foram reagidos a 60 °C e a 80 °C na presença de vácuo com o intuito de remover o etanol formado. Porém não foram obtidos bons resultados em conversão e massa molar. Não foi utilizado solvente neste caso, pois os monômeros encontram-se no estado líquido e miscíveis entre si nas temperaturas de trabalho.

Malonato de dietila, ftalato de dibutila e ácido ftálico também foram avaliados em reações enzimáticas com o poliol vegetal, porém não foram obtidos resultados relevantes em conversão e massa molar. Nos dois últimos a baixa conversão está associada a presença de anel aromático. Na utilização do malonato de dietila, a dificuldade está na proximidade dos grupos carbonila que dificulta a reação de condensação.

Como a substituição de ésteres no lugar de ácidos carboxílicos não surtiu efeito na polimerização enzimática, foi investigada a utilização do Pripol® 1017, dímero do ácido oléico, que ao contrário do ácido adípico, apresenta uma boa solubilidade em diferentes solventes. Na Tabela VI I são apresentados os resultados de conversão e massa molar das reações de esterificação empregando Pripol® (RE208 e RE204) e 1,10-decanodiol, ou poliol,

utilizando a Novozym 435 em diferentes proporções.

Na reação RE208ad foi utilizada uma mistura entre os solventes THF/t-butanol, e nas demais da série RE208 utilizou-se THF/5-hexen-1-ol para solubilizar o 1,10-decanodiol. Todas as reações levaram a formação de um polímero com massa molar superior a 3000 Da, em 24h de reação. Houve variação significativa em relação à massa molar e à conversão para o tempo de 48h. Observou-se que quanto maior o teor de enzima, maior é a conversão para o mesmo tempo de reação, porém mesmo com concentração de enzima inferior (1%) atingiu-se uma conversão superior a 50% a tempo de reação longo (168h).

Tabela VII: Reações de policondensação utilizando Pripol® em THF/5-hexen-1-ol.

Reação	% da Novozym 435	Solvente e relação utilizada		Mmol de diácido/adipato		Mmol de diol/poliol		Mn g/mol		Mw/Mn	Conversão	
				Ácido Adípico	Pripol®	Poliol	1,10-decanodiol	24 horas	48 horas		24 horas	48 horas
RE208ad	2,0%	THF/t-Butanol	2:1	0	3	0	17,2	2700	3000	1,2	51	52
RE208cd ¹	2,0%	THF/5-hexen-1-ol	5:2	0	4,6	0	17,2	2600	3400	1,4	46	49
RE208cd ²	1,0%	THF/5-hexen-1-ol	5:2	0	3	0	8,6	3600	3500	1,5	44	49
RE208cd ³	1,0%	THF/5-hexen-1-ol	5:2	0	4,6	0	17,2	3700	3600	1,4	39	42
RE108cd	4,0%	THF/5-hexen-1-ol	5:2	22	0	0	20	3300	4000	1,3	58	59
RE204a	2,0%	t-Butanol		0	6,1	30,8	0	1500	1550	2,2	18	24

OBS 3: Reação acompanhada até 168 horas (conversão final: 53,5%).

A figura 32 apresenta o cromatograma obtido por SEC da RE208cd sobreposto com o do Pripol ilustrando bem o perfil cromatográfico dos polímeros sintetizados. Nota-se o aparecimento de novos picos em tempos de retenção inferiores ao do Pripol, indicando a formação de frações poliméricas de maior massa molar.

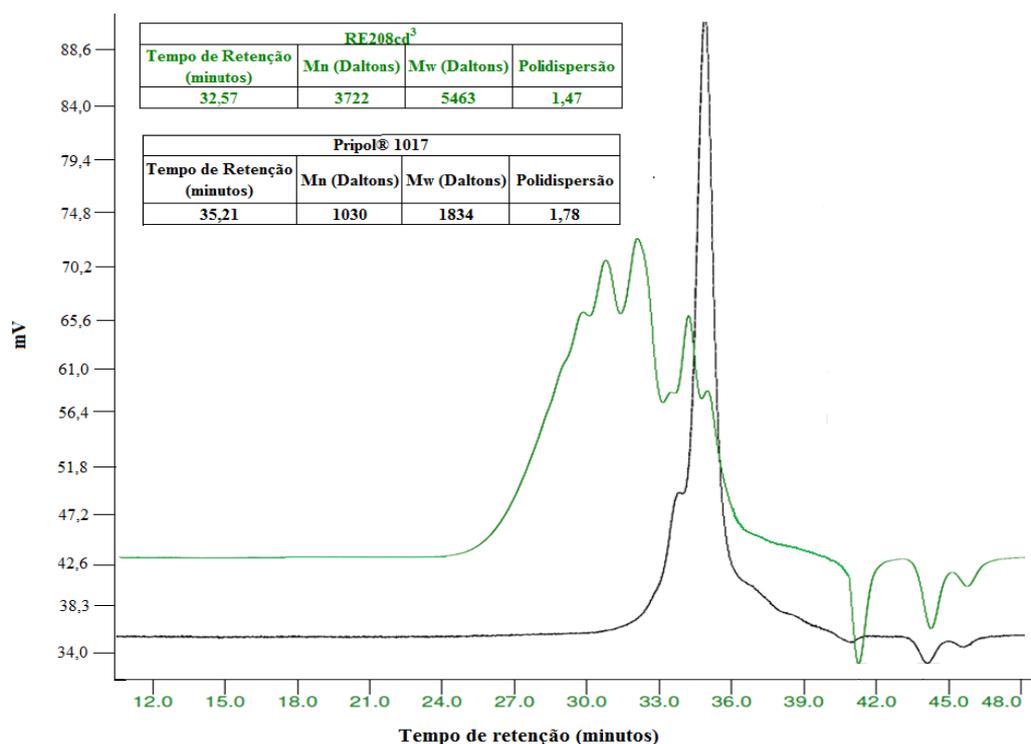


Figura 32: Cromatogramas da RE208cd e o monômero Pripol utilizado.

A reação RE204a foi executada com polioli vegetal e Pripol em t-butanol. Foi observada a redução da conversão e massa molar, provavelmente devido ao baixo teor de monoglicérides presentes no polioli.

A figura 33 ilustra a série de reações avaliadas. Na utilização do Pripol, o resultado mais eficiente em relação à massa molar foi obtido na RE208cd³ na qual foi utilizada a proporção de 2,5/1 entre Pripol/dioli. A substituição de Pripol por ácido adípico (RE108cd) resultou em aumento na massa molar e conversão. Este comportamento pode ter sido somado ao aumento do percentual de enzima em relação às demais reações.

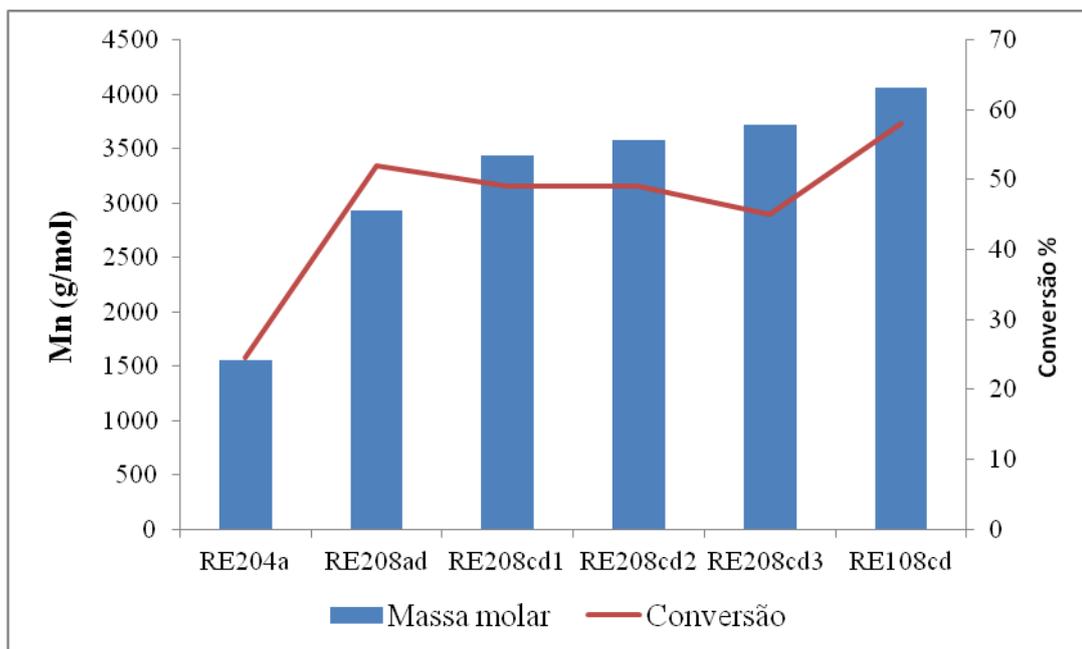


Figura 33: Reações de esterificação realizadas com Pripol® e as respectivas massas molares e conversões.

7.2.4 Avaliação das condições de processo

7.2.4.1 Sistema Fechado

O sistema fechado foi o mais utilizado nas reações de policondensação enzimática devido a alta volatilidade dos solventes, como THF, ciclohexano, etc.

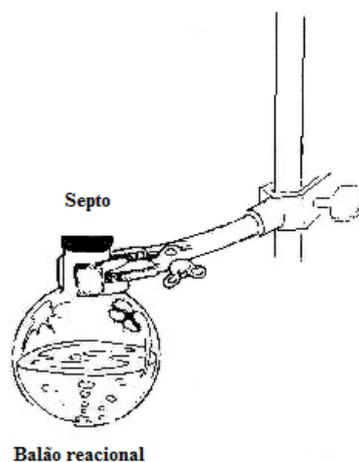


Figura 34: Sistema reacional utilizando vaso fechado.

Conforme já abordado, as reações em sistema fechado foram realizadas em balão de 100 mL. Os solventes e monômeros foram adicionados ao balão volumétrico e submetidos a

dispersão no Turrax® por tempos de até 5 minutos. Após, o balão é fechado com septo e submetido ao aquecimento até a temperatura de trabalho (normalmente de 60°C) em banho de silicone sob agitação magnética. O tempo de espera foi o da solubilização total dos monômeros ou até 20 minutos. Após decorridos este tempo, o balão foi aberto e adicionada a quantidade de enzima (Novozym 435) correspondente. Após fechado o balão é que a cronometragem da reação foi iniciada.

Os melhores resultados foram obtidos com a RE108de, conforme avaliado na seção 7.2.1, onde se obteve em tempos de 48 horas de reação, massa molar numérica média (M_n) de 4700 Da e conversão de 88%. Neste caso a composição de solventes foi a mistura ciclohexano/THF na proporção 5:1 em volume.

Ao se monitorar o teor de água da RE108de (figura 35) pelo método de titulação Karl Fischer, é possível verificar que em até 8 horas ocorre a formação de água. Após este tempo, o que ocorre é a redução de água no meio, apesar do índice de acidez continuar a diminuir. Este comportamento pode indicar que está ocorrendo a hidrólise do poliéster, apesar da enzima continuar atuando (pela redução do índice de acidez).

Assim, se torna claro a necessidade de remoção da água ao longo do tempo reacional, para favorecer o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação do polímero.

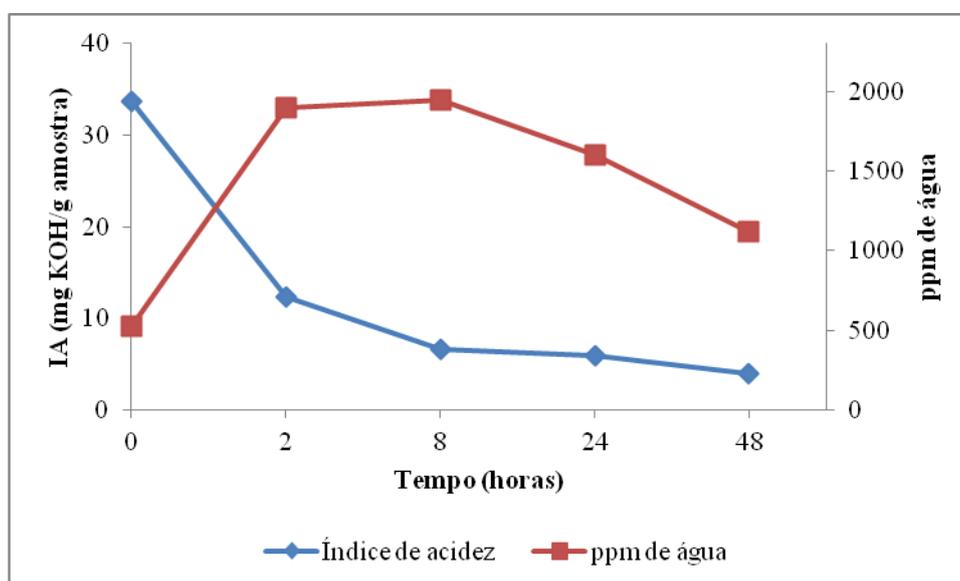


Figura 35: Índice de acidez e teor de água da RE108de avaliada ao longo do tempo.

Para remover a água do sistema, a mesma reação RE108de foi realizada adicionando peneira molecular (zeólita com 3 Å de abertura de poro) após 24 horas de reação.

Além da adição da peneira molecular, após 24 horas a enzima foi substituída por uma nova carga da Novozym 435 e adicionado 50% da carga inicial dos monômeros.

Para esta reação, RE108de, massas molares M_n e M_w de 1000 e 7600 foram alcançadas, respectivamente, em tempos de até 48 horas. A polidispersidade encontrada foi de 7,6, acima dos resultados normalmente obtidos de 2 e a conversão foi de 90%.

Conforme já discutido, a alta concentração de monômeros pode prejudicar a atividade enzimática. A adição de monômeros ao longo do tempo de reação pode ser uma alternativa para a obtenção de polímeros de alta massa, com longos períodos de reação. Este tipo de procedimento também é conhecido como “Feed Batch”.

Conforme figura 36, é verificada a variação de água e monômeros ao longo do tempo. Tempos de reação maiores, seguindo o procedimento de adição de reagente “Feed Batch” e remoção de água podem levar a formação de poliésteres com massas molares numérica média acima de 5000 Da.

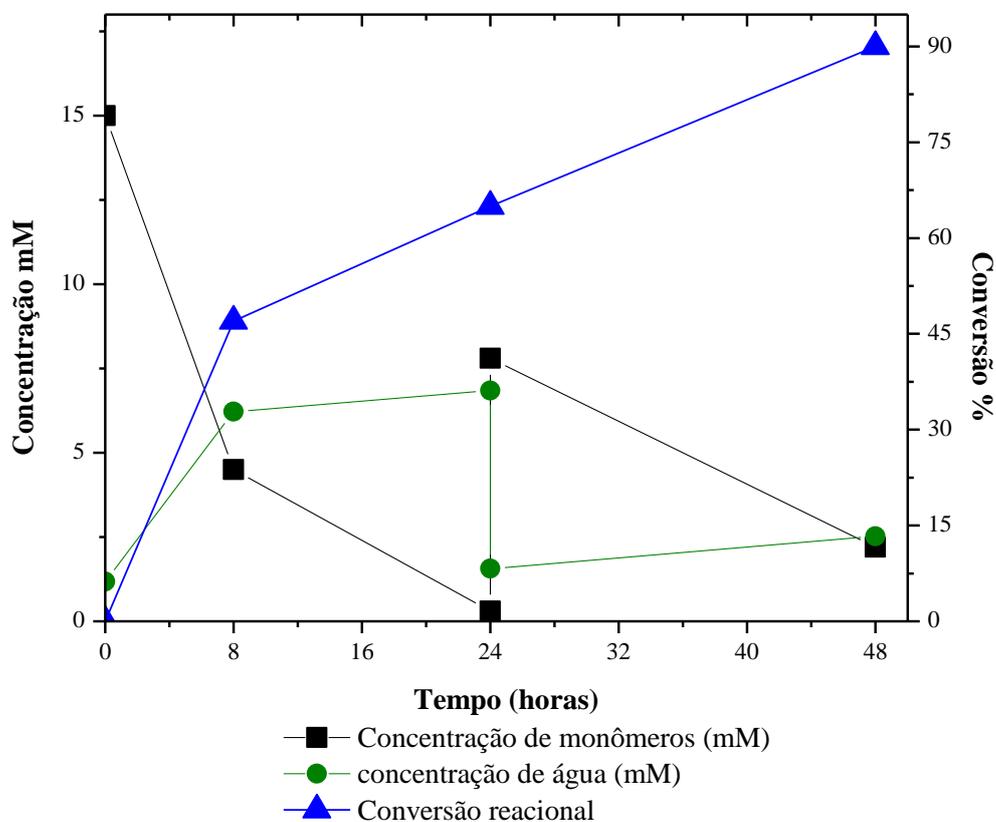


Figura 36: Avaliação da conversão da RE108de e concentrações de monômeros e água, pelo procedimento “Feed Batch”, em até 48 horas de reação. Peneira molecular foi adicionada após 24 horas de reação.

7.2.4.2 Sistema Aberto

O sistema aberto foi avaliado com o intuito de solucionar dois problemas: a remoção de água do sistema e minimizar a exposição da enzima (Novozym 435) ao THF, que acaba inibindo a sua atividade.

Para este sistema, foram utilizadas as mesmas condições da RE108de. Os solventes foram ciclohexano/THF na proporção 5:1 em volume, concentração dos monômeros em 7,5 mmol e uma concentração enzimática de 3% em massa sobre o monômero ácido. Ao invés do sistema fechado, foi utilizado um sistema aberto, com condensador e um balão coletor. Ao balão coletor foi adaptado um bulbo com silicone. Assim sempre existiu pressão positiva no sistema reacional e evitando maiores perdas de THF. Porém, a temperatura de trabalho utilizada foi de 80°C e a água foi removida através da destilação de um azeótropo THF/água a uma temperatura de 63,4 °C, numa composição molar de 17,1% de água, conforme mostrado na figura 37.

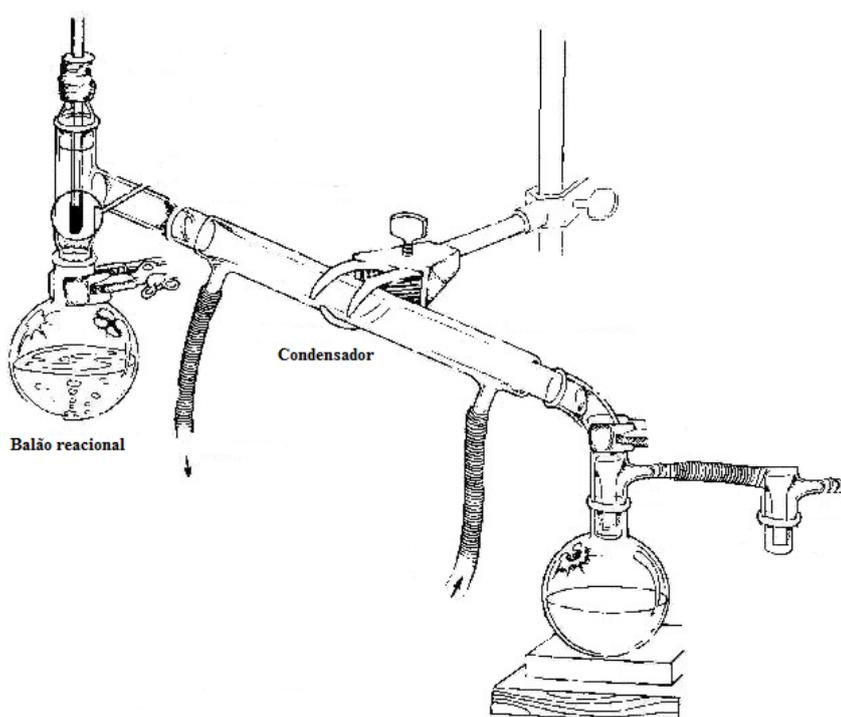


Figura 37: Sistema (aberto) de destilação utilizado na RE108de.

A figura 38 mostra esquematicamente os procedimentos adotados durante esta reação. Neste sistema, após 24 horas de reação, foi dobrada a quantidade de monômero, mantendo a mesma quantidade de enzima. A quantidade de água formada no balão coletor pode ser medida e utilizada para monitorar o curso da reação assim como o índice de acidez do sistema. O percentual de água no interior do sistema reacional permaneceu inferior a 300 ppm ao longo do

processo. A cada 8 horas foi adicionado ao sistema reacional, o volume de THF recolhido no balão coletor.

Após 48 horas de reação, foram obtidas massas molares M_n e M_w de 1100 e 3800, respectivamente. A polidispersão foi de 3,4.

Massas molares próximas ao sistema fechado foram obtidas, com a vantagem do aumento da conversão (95%) sem a substituição da enzima.

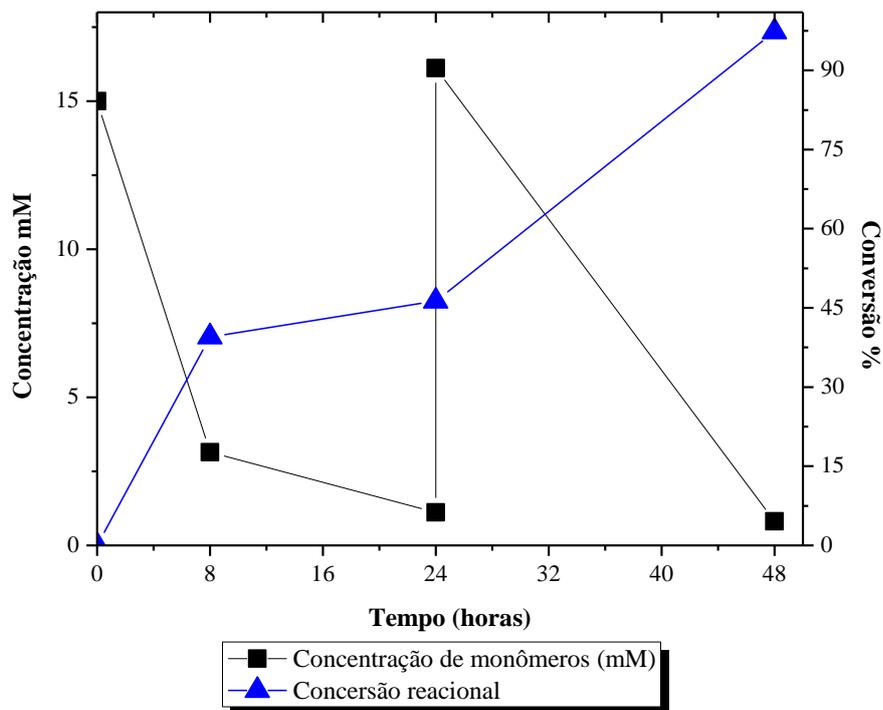


Figura 38: Conversão e concentração dos monômeros e água da RE108de em sistema aberto, em até 48 horas de reação.

Na figura 39 podemos comparar os cromatogramas obtidos por SEC da RE108de nos três sistemas: sistema fechado, sistema fechado com alimentação por “Feed Batch” e sistema aberto com alimentação por “Feed Batch”.

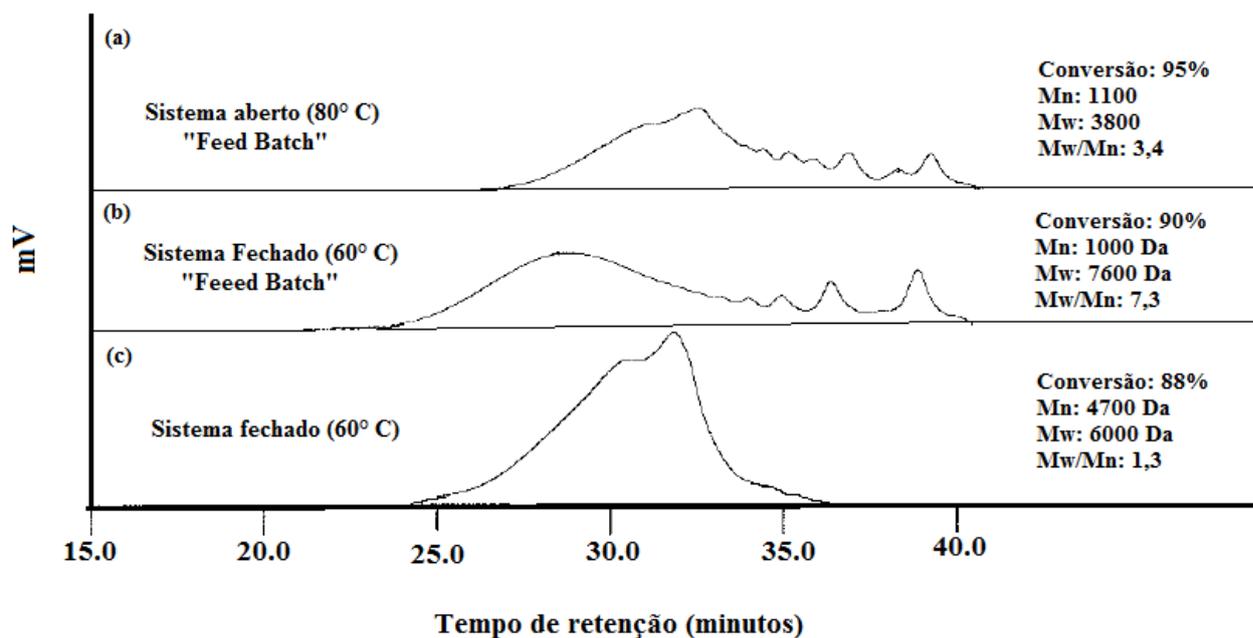


Figura 39: Cromatogramas obtidos por SEC da RE108de realizado em diferentes condições: (a) Sistema aberto a 80° C por “Feed Batch”; (b) Sistema fechado a 60° C por “Feed Batch”; (c) Sistema fechado a 60° C.

Existe o aumento da polidispersidade com a utilização do sistema por “Feed Batch”. Apesar do aumento da conversão reacional, a dosagem dos monômeros ao longo do tempo ocasiona a formação de unidades poliméricas de baixa massa, aumentando a polidispersão. Maiores tempos de reação poderiam originar polímeros com massas molares de até 8000 Da.

8 CONCLUSÕES

As reações de esterificação enzimática em meio heterogêneo com Novozym 435 foram efetivas na obtenção de poliésteres com massa molecular numérica média (M_n) superior a 4000 Da .

Nas reações de alcoólise enzimática do óleo vegetal, o teor de monoglicerídeos obtido não foi o suficiente para melhorar as conversões das reações de esterificação subseqüentes.

A mistura dos solventes ciclohexano/THF na proporção 5:1 em volume foi efetiva para as reações de esterificação enzimática com os monômeros avaliados. A utilização da mistura foi de fundamental importância para a solubilização dos monômeros, minimizando os efeitos difusionais. Porém o THF apresentou uma acentuada inibição à enzima, reduzindo a atividade biocatalítica no meio.

Ácido adípico e 1,10-decanodiol também apresentam inibição. Assim, a concentração dos monômeros no meio reacional pode influenciar a atividade biocatalítica.

Em relação aos monômeros hidroxilados os melhores resultados de massa molar foram obtidos empregando 1,10-decanodiol, que possui a maior distância entre os grupos hidroxilas.

A utilização de monômeros hidroxilados com funcionalidade maior do que 2 ocasionou aumento na polidispersão do material, mas redução da conversão e massa molar.

Foi efetiva a incorporação de monômeros como ácido adípico e Pripol[®], sendo as maiores conversões atingidas com a utilização do ácido adípico. De forma geral o uso de diésteres (adipato de etila) não resultou em melhores resultados de conversão e massa molar, mostrando a maior especificidade da enzima para esterificação, sendo a transesterificação dificultada.

A remoção da água formada pelo processo de policondensação (seja pelo uso da peneira molecular ou destilação azeotrópica) levou ao aumento da conversão nas reações.

A utilização da dosagem dos reagentes ao longo do tempo, ou “Feed Batch”, também foi efetiva para o aumento da conversão. Porém tempos maiores que 48 horas de reação são necessários neste caso para a obtenção de poliésteres com M_n superiores a 1000 Da.

Nas reações de policondensação enzimática, as massas molares alcançadas foram inferiores as almejadas na obtenção de poliésteres que possam apresentar propriedades mecânicas que viabilizem a sua aplicação em revestimentos.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Metzger, J. & Bornscheuer, U.; *Appl. Microbiol. Biot.*; **2006**, 71, 13.
2. Fjerbaek, L.; Christensen, K.; Norddahl, B.; *Biotech and Bioeng.*; **2008**, 102, 1298.
3. Hasan, F.; Saha, A. A.; Hammed, A.; *Enzym. Microb. Technol.*; **2006**, 39, 235–251.
4. Kulshrestha, A.; Gao, W.; Fu, H.; Gross, R.; *Biomacromol.*; **2007**, 8, 1794.
5. Kobayashi, S.; Uyama, H.; Suda, S.; Namekawa, S.; *Chem Lett.*; **1997**, 105.
6. Baron, A. M. Preparação e caracterização de Lipases Imobilizadas para a utilização em Biocatálise. Tese de Doutorado, **2008**.
7. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Lehninger: Principles of Biochemistry*; Fourth edition, 2001.
8. Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J.; *Hydrolases in Organic Synthesis*; Wiley: Alemanha, 2006.
9. Illanes, A.; *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*; Springer: Chile, 2008.
10. Whittall, J.; Sutton, P.W.; *Practical Methods for Biocatalysis an Biotransformations*; Wiley: Reino Unido, 2010.
11. Sharma, R. R.; *Enzyme Inhibition and Bioapplications*; Copyright: Croácia, 2012.
12. Bioquímica's Home Page, disponível em :
<http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/enzimas.html>. Acesso em 05 de maio de **2012**.
13. Pfluck, A. C.; Estudo computacional da influencia da temperatura e do solvente sobre as propriedades conformacionais de Lipase de *Pseudomonas cepacia*; **2009**.
14. Barrios, S. B.; Síntese de Resinas Alquílicas via Catálise Enzimática; Tese de Mestrado, **2008**.
15. Widmann, M.; Juhl, P. B.; Pleiss, J.; *BMC Genom.*; **2010**, 11, 123.
16. Kumar, A.; Kulshrestha, A.; Gao, W.; Gross, R.; *Macromol.*; **2003**, 36, 8219.
17. Muralidhar, R. V.; Chirumamilla, R. R.; Marchant, R.; Ramachandran, V. N.; Ward, O. P.; Nigam, P.; *World J. Microb. Biot.*; **2002**, 18, 81.
18. Barbe, S.; *Proteins*; **2009**, 77, 509.
19. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A.; *Structure*; **1994**, 2, 293-308.
20. Brenda; Disponível em: <http://www.brenda-enzymes.org>; Acesso em 25 de janeiro de 2012.
21. Miletic, N.; Rohandi, R.; Vukovic, Z.; Nastasovic, A.; Loos, K.; *React Funct Pol.*; **2009**, 69, 68–75.
22. José, C.; Torres, M.; Foresti, M.; Briand, L. E.; *Jour Mol Cat B: Enzym.*; **2011**, 71, 95–107.
23. Bajaj, A.; Lohan, P.; Jha, P. N.; Mehrotra, R.; *J. of Mol. Cat. B: Enzym*; **2010**, 62, 9 – 14.
24. Arroyo, M.; Montero, J. M. S.; Sinisterra, J.V. *Enzym Microb Technol.*; **1999**, 24, 3 – 12.

25. Boletim de Biotecnologia; Disponível em: www.biotec-zone.net/ficheiros/BiocatSolOrg. Acesso em 15 de janeiro de **2012**.
26. Idris, A.; Bukhari, A.; *Biotechnol. Adv.*; **2011**, *10*, 1016.
27. Duan, Z.; Du, W.; Liu, D.; *Bioreso. Technol.*; **2010**, *101*, 2568–2571.
28. Kulshrestha, A.; Gao, W.; Fu, H.; Gross, R.; *Biomacromol.*; **2007**, *8*, 1794.
29. Gross, R.; Kumar, A.; Kalra, B.; *Chem. Rev.*; **2001**, *101*, 2097.
30. Kobayashi, S.; *J. Polym. Sci.*; **1999**, *37*, 3041.
31. Juais, D.; Naves, A. F.; Li, C.; Gross, R.; Catalani, L.H.; *Macromol.*; **2010**, *43*, 10315.
32. Uyama, H.; Wada, S.; Fukui, T.; Kobayashi, S.; *Biochem. Eng. Jour.*; **2003**, *16*, 145 – 152.
33. EP CO; Dong, T.; Patente US448794.; **2003**.
34. Yamashita, H.; Nakano, Y.; *Polyester: Properties, Preparation and Application*; Nova Science Publishers: Nova Iorque, 2008.
35. Fazenda, J. M.; *Tintas e Vernizes: Ciência e Tecnologia*; Abrafati: São Paulo, 1993.
36. Odian, G.; *Principles of Polymerization*; McGraw-Hill: Nova Iorque, 1970.
37. Almeida, C.F.; Cabral, J.M.S.; Fonseca, L.P. *Analyt Chim Acta.*; **2004**, *502*, 115 – 124.
38. Glogauer, A.; Martini, V. P.; Krieger, N. *Microb Cell Fact.*; **2011**, *10*, 54.
39. Simons, H.; Gibson, T.D.; *Biotechn. Techn.*; **1999**, *13*, 365 – 367.
40. Dall'Alba, K. Uma alternativa para a glicerina oriunda da produção do biodiesel: Preparo de Polióis e aplicação em adesivos poliuretânicos; **2009**.
41. Varma, I.; Albertsson, A.C.; Rajkhowa, R.; Srivastava, R.; *Prog. Polym. Sci.*; **2005**, *30*, 949.
42. Bechthold, N.; Tiarks, F.; Willert, M.; Landfester, K.; Antonietti, M.; *Macromol. Symp.*; **2000**, *151*, 549.
43. Asua, J. M.; *Prog. Polym. Sci.*; **2002**, *27*, 1283.
44. Landfester, K.; *Annu. Rev. Mater. Res.*; **2006**, *36*, 231.
45. Landfester, K.; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2009**, *48*, 4488.
46. Barros, D.; Fonseca, L.; Cabral, J.; Weiss, C.; Landfester, K.; *Biotechnol. J.*; **2009**, *4*, 674.
47. Barrère, M.; Landfester, K.; *Polymer*; **2003**, *44*, 2833.
48. Aschenbrenner, E.; Weiss, C.; Landfester, K.; *Chem. Eur. J.*; **2009**, *15*, 2434.
49. Guyot, A.; Landfester, K.; Schork, F. J.; Wang, C.; *Prog. Polym. Sci.*; **2007**, *32*, 1439.
50. Wang, C.; Chu, F.; Graillat, C.; Guyot, A.; Gauthier, C.; Chapel, J. P.; *Polymer*; **2005**, *46*, 1113.
51. Qi, D.; Bao, Y.; Weng, Z.; Huang, Z.; *Polymer*; **2006**, *47*, 4622.
52. Damstrup, M.; Kiil, S.; Jensen, A.; Sparso, F.V.; Xu, X.; *J. Agric. Food Chem.*; **2007**, *55*, 7786.

53. Pilarek, M.; Szewczyk, K. W.; *Jour. Biotechn.*; **2007**, *127*, 736 – 744.
54. Miletic, N.; Rohandi, R.; Vukovic, Z.; Nastasovic, A.; Loos, K.; *React Funct Pol.*; **2009**, *69*, 68–75.
55. Chen, Z.; Zong, M.; Gu, Z.; Han, Y.; *Bioproc. Biosyst. Eng.*; **2008**, *31*, 351.
56. Janssen, A. E. M.; Vanderpadt, A.; Vansonsbeek, H. M.; Vantriet, K.; *Biotechnol. Bioeng.*; **1993**, *41*, 95.
57. Gross, R. A.; Miller, E.; Chen, B.; *Langmuir*; **2007**, *23*, 6467.
58. Kobayashi, S.; Uyama, H.; Tsujimoto, T.; *Biomacromolecules*; **2001**, *2*, 29.
59. Xu, X.; Mu, H.; Skands, A.; Hã, C.; Adler-Nissen, J.; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **1999**, *76*, 175.
60. Kobayashi, S.; Uyama, H.; *Acs Sym. Ser.*; **2003**, *840*, 128.
61. Poulhès, F.; Mouysset, D.; Gil, G.; Bertrand, M. P.; Gastaldi, S.; *Polymer*; **2012**, *53*, 1172 - 1179.