



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Sabrina Spagnolo Pedro da Silva

Síntese de sebacato de dioctila empregando lipases

Rio de Janeiro

2012

Sabrina Spagnolo Pedro da Silva

Síntese de sebacato de dioctila empregando lipases

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Antunes Pereira Langone

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SÍRIUS/NPROTEC

S586 Silva, Sabrina Spagnolo Pedro da
Síntese de sebacato de dioctila empregando lipases /
Sabrina Spagnolo Pedro da Silva. – 2012.
93 f.

Orientador: Marta Antunes Pereira Langone.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Biolubrificantes – Teses. 2. Esterificação (Química) – Teses. 3. Lipase – Teses. I. Langone, Marta Antunes Pereira. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. III. Título.

CDU 665.765.091.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Sabrina Spagnolo Pedro da Silva

Síntese de sebacato de dioctila empregando lipases

Tese apresentada como requisito parcial, para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em

Banca Examinadora:

Marta Antunes Pereira Langone
Instituto de Química da UERJ

Aline Machado de Castro
Cenpes/Petrobras

Antônio Carlos Augusto da Costa
Instituto de Química da UERJ

Fátima Maria Zanon Zotin
Instituto de Química da UERJ

Rio de Janeiro
2012

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Marta Langone, pelo aconselhamento, orientação, confiança e paciência.

Ao meu gerente, Wanderley Carreira, pela oportunidade oferecida e confiança ao longo de todo o curso.

Aos meus colegas de trabalho, Fernando de Almeida, Amanda Maciel, Clara Simões, Fábio Ferreira, Renan Nagib, Claudia Sampaio, pela amizade e cumplicidade, já que sem eles a realização do curso seria impossível.

Ao Igor Nascentes, pela ajuda e colaboração, já que sem ele o caminho percorrido teria sido bem mais longo.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Enzimática, Érika Aguierras, Natasha, Susana e Marly, pelo companheirismo demonstrado e pelos bons conselhos.

Ao Leonardo Lagden, Clelia Jeni, Sergio Pedro e Eunisia Pereira por tudo.

A todas as demais pessoas que de alguma forma puderam colaborar para a realização deste trabalho.

RESUMO

SILVA, Sabrina Spagnolo Pedro da. *Síntese de sebacato de dioctila empregando lipases*. Brasil, 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

A crescente demanda por lubrificantes obtidos a partir de fontes renováveis vem incentivando a pesquisa por alternativas sustentáveis. O objetivo principal deste trabalho foi investigar a síntese de sebacato de dioctila a partir da reação de esterificação entre o ácido sebácico e o 1-octanol empregando biocatalisadores e catalisador químico convencional (ácido sulfúrico). Alguns parâmetros reacionais foram estudados: tipo de lipase comercial imobilizada (Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM), temperatura, razão molar ácido/álcool, concentração de lipase, métodos de remoção da água do meio reacional. A reutilização da lipase Novozym 435 também foi avaliada. A conversão da reação foi determinada por cromatografia em fase gasosa. A lipase Novozym 435 apresentou os melhores resultados: 100% de conversão de ácido sebácico quando foi empregada razão molar ácido:álcool de 1:5 e 5% m/m de lipase, após 150 minutos de reação a 100°C. O emprego de peneira molecular e vácuo não aumentou a conversão do ácido sebácico. O produto final foi caracterizado com relação à viscosidade, ao índice de viscosidade, ao ponto de fulgor, ao ponto de fluidez e ao índice de neutralização, e apresentou comportamento semelhante a um óleo naftênico.

Palavras-chave: Biolubrificantes; esterificação; lipase.

ABSTRACT

The growing demand for lubricants derived from renewable sources has been encouraging the search for sustainable alternatives. The main objective of this study was to investigate the synthesis of dioctyl sebacate from esterification reaction between sebacic acid and 1-octanol, using biocatalysts and conventional chemical catalyst (sulfuric acid). Some reactions parameters were studied: type of commercial immobilized lipase (Novozym 435, Lipozyme RM IM and Lipozyme TL IM), temperature, molar ratio, lipase concentration, and methods of water removal from the reaction medium. The reuse of lipase Novozym 435 was also evaluated. The conversion of the reaction was determined by gas chromatography. Lipase Novozym 435 showed the best results, achieving 100% conversion of sebacic acid when employing a sebacic acid: 1-octanol molar ratio of 1:5 and 5 wt.% lipase after 150 minutes at 100°C. The use of molecular sieve and vacuum did not enhance the acid sebacic conversion. The final product was characterized by viscosity, viscosity index, flash point, pour point and neutralization index; and it showed a pattern similar to a naphthenic oil.

Keywords: Biolubricants; esterification; lipase.

.LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Fórmula geral dos ésteres	21
Figura 1.2 - Esquema geral de reação para obtenção de ésteres	21
Figura 1.3 - Transformações químicas do óleo de mamona	23
Figura 1.4 - Esquema das reações (a) de hidrólise (b) de esterificação.....	25
Figura 1.5 - Reação para obtenção do sebacato de dioctila	25
Figura 1.6 - Diferentes conformações da lipase <i>Candida Rugosa</i> . (a) Conformação fechada. (b) Conformação aberta	31
Figura 1.7 - Mecanismo de ativação interfacial de lipases	31
Figura 4.1. Efeito do tipo de lipase na conversão do ácido sebácico após 150 minutos de reação entre o ácido sebácico e 1-octanol (razão molar de 1:5), a 100 °C, empregando 5% m/m de diferentes lipases comerciais imobilizadas	53
Figura 4.2. Composição do meio reacional após 150 minutos na reação entre o ácido sebácico e 1-octanol, com razão molar ácido/álcool de 1:5, a 100 °C e 5% m/m de lipase.(a)Novozym 435.(b)Lipozyme RM IM.....	54
Figura 4.3. Efeito da razão molar ácido sebácico/1-octanol na conversão do ácido sebácico após 150 minutos de reação, a 100 °C, empregando 5 % m/m da lipase comercial imobilizada. (a) Lipozyme RM IM. (b) Novozym 435	55
Figura 4.4. Efeito da concentração da lipase na conversão do ácido sebácico após 150 minutos de reação, a 100 °C, razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5. (a) Lipozyme RM IM (b) Novozym 435.....	59
Figura 4.5. Composição do meio reacional na reação entre o ácido sebácico e 1-octanol, empregando razão molar ácido/álcool de 1:5, a 100 °C e a lipase Lipozyme RM IM. (a) 3% m/m (b) 5% m/m (c) 7% m/m (d) 9% m/m (e) 11% m/m	61
Figura 4.6. Composição do meio reacional na reação entre o ácido sebácico e 1-octanol, empregando razão molar ácido/álcool de 1:5, a 100 °C e a lipase Novozym 435. (a) 3% m/m (b) 5% m/m (c) 7% m/m (d) 9% m/m (e) 11% m/m.....	63

- Figura 4.7. Efeito da temperatura na conversão do ácido sebácico após 150 minutos de reação, empregando 5 % m/m de lipase e razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5. **(a)** Lipozyme RM IM **(b)** Novozym 435..... 64
- Figura 4.8. Seletividade em sebacato de dioctila obtida após 150 minutos de reação entre o ácido sebácico e 1-octanol, empregando razão molar de 1:5 e 5 % m/m da lipase Novozym 435, em diferentes temperaturas..... 66
- Figura 4.9. Composição do meio reacional na reação de síntese do sebacato de dioctila a 100 °C, com razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5, com 5 % m/m de Novozym 435. **(a)** Livre evaporação. **(b)** Reator fechado..... 68
- Figura 4.10. Composição do meio reacional na reação de síntese do sebacato de dioctila a 100 °C, com razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5, com 5 % m/m de Novozym 435. **(a)** Vácuo **(b)** Reator fechado..... 70
- Figura 4.11. Composição do meio reacional na reação de síntese do sebacato de dioctila a 100 °C, com razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5, com 5 % m/m de Novozym 435. **(a)** 50 mg de peneira molecular **(b)** Reator fechado..... 72
- Figura 4.12. Fração molar de sebacato de dioctila obtida nas reações entre o ácido sebácico e 1-octanol a 100 °C, empregando razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5 e 5 % m/m de Novozym 435. Em reator fechado(\diamond), em reator aberto (livre evaporação) (\square), empregando vácuo (\triangle) e adicionando 50 mg de peneira molecular (\times)..... 73
- Figura 4.13. Conversão do ácido sebácico nas reações de síntese do sebacato de dioctila, sendo conduzidas a 100 °C, com razão molar de ácido sebácico/1-octanol de 1:5, com 7% m/m de Novozym 435, nas diversas utilizações da lipase..... 74
- Figura 4.14. Composição do meio reacional da reação de síntese do sebacato de dioctila empregando razão molar de ácido sebácico/1-octanol de 1:5 e 7 % m/m de lipase Novozym 435, a 100 °C **(a)** Reação inicial **(b)** Primeira reutilização **(c)** Segunda reutilização..... 76
- Figura 4.15. Composição do meio reacional da reação de síntese do sebacato de dioctila, a 100 °C, empregando razão molar de ácido sebácico/1-octanol de 1:5 e 7% m/m de catalisador. **(a)** Novozym 435 **(b)** Ácido sulfúrico..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Solubilidade do ácido sebácico em 2-octanol, etanol e na mistura octanol/etanol, em diferentes razões molares, nas temperaturas de 75°C, 80°C, 85°C, 90°C e 100°C, nas proporções empregadas	45
Tabela 4.1 - Solubilidade de 0,1 g de ácido sebácico em diferentes solventes (3 mL) e temperaturas.....	51
Tabela 4.2. Solubilidade de 1 mol de ácido sebácico em diferentes solventes e temperaturas	52
Tabela 4.3. Resultados da caracterização do produto de reação entre ácido sebácico e 1-octanol (94,2% de sebacato de dioctila e 5,8% de sebacato de monoctila), comparado a um óleo básico mineral parafínico e a um óleo básico mineral naftênico.....	79
Tabela 4.4. Resultados comparativos de ensaios de caracterização de básicos minerais parafínicos e básicos minerais naftênicos	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTM	American Society for Testing and Materials
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CEPED	Centro de Pesquisa e Desenvolvimento
UEBA	Universidade Estadual da Bahia
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
CCS	Cold Cranking Simulator

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
Revisão Bibliográfica	16
1. LUBRIFICANTES	16
1.1. Biolubrificantes	18
1.2. Ésteres	20
1.2.1. <u>Sebacato de dioctila</u>	21
1.3. Reações para obtenção do sebacato de diocila	24
1.4. Catalisadores empregados em reações de esterificação	26
1.4.1. <u>Catalisadores químicos</u>	26
1.4.2. <u>Biocatalisadores</u>	27
1.4.2.1. Lipases e seu mecanismo de atuação	29
1.4.3. Enzimas em meio não aquoso	32
1.5. Influência de algumas variáveis em reações de esterificação	36
2. OBJETIVOS	40
3. EXPERIMENTAL	42
3.1. Materiais	42
3.2. Equipamentos	42
3.3. Reator	42
3.4. Determinação da atividade enzimática das lipases comerciais	43
3.5 Testes de solubilidade	44
3.6. Reação de esterificação entre o ácido sebácico e álcool empregando lipases	45
3.6.1. <u>Efeito do tipo de lipase</u>	46
3.6.2. <u>Efeito da razão molar dos reagentes</u>	46
3.6.3. <u>Efeito da concentração enzimática</u>	46
3.6.4. <u>Efeito da temperatura</u>	46
3.6.5. <u>Métodos de remoção de água</u>	47
3.6.6. <u>Reutilização da lipase</u>	47

3.6.7. <u>Efeito do catalisador químico</u>	48
3.7. Análise cromatográfica	48
3.8. Curvas-padrão	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Resultados preliminares	50
4.1.1. <u>Testes de solubilidade</u>	50
4.2. Influência de alguns parâmetros reacionais na conversão da reação de esterificação do ácido sebácico com 1-octanol empregando lipase	52
4.2.1. Influência do tipo de lipase	52
4.2.2. <u>Influência da razão molar de ácido sebácico/álcool no meio reacional</u>	56
4.2.3. <u>Influência da concentração de lipase no meio reacional</u>	58
4.2.4. <u>Influência da temperatura</u>	64
4.2.5. <u>Influência da remoção de água do meio reacional</u>	66
4.2.6. <u>Reutilização de lipase</u>	74
4.2.7. <u>Catálise química</u>	77
4.2.8. <u>Caracterização do biolubrificante</u>	78
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	83
5.1. <u>Conclusões</u>	83
5.2. <u>Sugestões para futuros trabalhos</u>	84
REFERÊNCIAS	86
ANEXO I. Análise cromatográfica	90

INTRODUÇÃO

O crescente aumento da frota automotiva ao redor mundo faz com que a demanda na produção de lubrificantes também venha aumentando consideravelmente nos últimos anos. De acordo com reportagem do jornal O Globo de fevereiro de 2011¹, estima-se que somente no Brasil, a frota automobilística tenha aumentado 114 % nos últimos dez anos.

Grande parte dos lubrificantes utilizados atualmente para suprir esta demanda de veículos utiliza como fonte de matéria prima o óleo básico mineral, proveniente dos processos de refino do petróleo. Estima-se que apenas 10% dos lubrificantes produzidos em todo o mundo são totalmente sintéticos (GRYGLEWICZ *et. al.*, 2005). Entretanto, produtos advindos do petróleo, conforme conceitos já bastante difundidos, têm sido substituídos por alternativas sustentáveis.

Lubrificantes de base mineral, que atualmente são utilizados em larga escala, apresentam alguns aspectos indesejáveis, como, por exemplo: são provenientes de fontes não renováveis, após o seu uso são considerados como produtos tóxicos e perigosos, sendo a sua reciclagem o único destino correto para tal, além de não serem biodegradáveis. Há também estudos que sugerem uma grande escassez de petróleo em um futuro próximo, o que levaria a um conseqüente aumento no preço desta matéria prima, o que pode ser considerado mais uma fonte de incentivo na busca de alternativas sustentáveis (SALIH *et. al.*, 2011).

Os biolubrificantes são lubrificantes caracterizados por serem biodegradáveis e não tóxicos para os seres humanos e o meio ambiente. Estes lubrificantes podem ser obtidos a partir de fontes renováveis como óleos vegetais (como exemplo o óleo de mamona) ou a partir de ésteres sintéticos fabricados a partir de óleos renováveis modificados². Os biolubrificantes mostram-se como uma alternativa aos lubrificantes de base mineral devido a uma série de fatores: são biodegradáveis, possuem baixa ou nenhuma toxicidade, possuem maior lubricidade e são derivados de fontes

¹ Do site <http://www.globo.com>. Acessado em 02/02/2011 às 20:00 h.

renováveis. Além disso, permitem um intervalo de troca maior, menos paradas para manutenção do motor, além de apresentam melhores propriedades físico-químicas, como melhor ponto de fluidez, melhor índice de viscosidade, menor volatilidade etc.

Dentre os biolubrificantes destacam-se os ésteres sintéticos, que são considerados como alternativas promissoras para a substituição dos lubrificantes de origem mineral, ou seja, advindos do petróleo, pois as características dos ésteres sintéticos satisfazem os desafios impostos pelos motores e máquinas modernas, tanto na questão técnica como na ambiental (GRYGLEWICZ *et al.*, 2005).

Um éster pode ser utilizado como lubrificante sintético é o sebacato de dioctila. O sebacato de dioctila é um emoliente incolor de baixa viscosidade, com bom poder de penetração. É ainda formador de filme com propriedades plastificantes³.

De acordo com a empresa Dhaymers, fornecedora do lubrificante sintético sebacato de dioctila, o mesmo é produzido em escala industrial a partir da esterificação direta entre o ácido sebácico e o álcool (que pode ser o n-octanol ou 2 etil hexanol). Geralmente é produzido em reatores industriais de grande porte, com capacidade de 15 a 50 toneladas, em batelada, usando catalisador ácido e vácuo para remoção de água reacional. O rendimento situa-se normalmente entre 90 e 98% sobre o estequiométrico.

Uma rota alternativa para a obtenção do sebacato de dioctila é a partir da reação de esterificação entre o ácido sebácico e o álcool empregando como catalisador lipase comercial imobilizada.

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triacilglicerol éster hidrolases EC. 3.1.1.3.) e possuem diversas vantagens frente a catalisadores químicos convencionais, como o ácido sulfúrico, por exemplo, que é usualmente utilizado em reações de esterificação. São exemplos destas vantagens: aumento da velocidade da reação, maior especificidade, atuação em menores faixas de

² Do site: <http://www.biolubrificantes.com>. Acessado em 18/12/2011 às 16:00 h.

³ Do site <http://www.dhaymers.com.br/Defaultb.asp?area=11&produto=125>. Acessado em 17/10/2011 às 19:00 h.

temperatura e pressão, além da atuação em ampla faixa de pH (DALLA VECCHIA *et al.*, 2004). Neste caso, também pode-se destacar que as lipases imobilizadas são catalisadores heterogêneos. Com isso, a separação deste biocatalisador dos produtos de reação torna-se mais fácil, não sendo necessária a utilização de operações unitárias complexas ao final do processo. Além disso, a lipase não provoca corrosão nos reatores, como pode ocorrer quando da utilização dos catalisadores químicos convencionais, como no caso do ácido sulfúrico.

Os fatores citados acima elevaram o número de pesquisas acerca do uso de lipases como catalisadores para a produção dessas substâncias, como por exemplo, os trabalhos de Akerman e colaboradores (2011), Torres e colaboradores (2000), Gryglewicz (2003), Dörmo e colaboradores (2004).

Com base no exposto, essa dissertação de mestrado teve como objetivo a obtenção de sebacato de dioctila via catálise enzimática. Desta forma, o presente trabalho será apresentado da seguinte maneira: na primeira parte, será apresentada no Capítulo I a revisão bibliográfica, que visa fornecer embasamento teórico, além de possibilitar a análise dos resultados obtidos na literatura sobre pontos pertinentes ao tema em questão. No Capítulo II são explicitados os objetivos desta tese. No Capítulo III será descrita a parte experimental, que possibilita esclarecer os métodos e materiais utilizados na pesquisa em questão; no Capítulo IV serão descritos os resultados encontrados para os sistemas estudados e, finalmente, serão apresentadas no Capítulo V as conclusões e sugestões para futuros estudos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. LUBRIFICANTES

Um lubrificante tem como função reduzir o desgaste acelerado das partes de um motor, tendo a capacidade de formar uma película protetora que envolve estas peças, mantendo-as separadas (American Petroleum Institute, 1996). Para atender a estes requisitos, algumas propriedades são requeridas no produto final. Algumas dessas propriedades são listadas a seguir.

- Ponto de fluidez – É a menor temperatura na qual o lubrificante consegue fluir livremente, indicando a capacidade de trabalho em baixas temperaturas (American Society for Testing and Materials - ASTM D 97). Entretanto, observa-se que alguns óleos ainda são capazes de fluir mesmo com temperaturas abaixo do ponto de fluidez.

“Nos básicos parafínicos, ocorre a formação de uma estrutura de cristais de cera que impede o fluxo livre do óleo [...]. Se esta estrutura for alterada ou quebrada, o óleo como um todo volta a fluir.” (Lubrificantes na Indústria. RUNGE, 1989, p.22).

- Viscosidade – É uma medida de resistência do fluido ao fluxo. O método de medição mais empregado é o de viscosidade cinemática. Neste método, o controle é feito pelo tempo em que um fluido escoar em determinada superfície, sob a ação gravitacional. É uma medida importante, já que através dela é possível estimar as condições de estocagem, manuseio, além da condição operacional, já que a correta operação de motores depende da viscosidade do fluido empregado (ASTM D 445). As viscosidades mais usualmente adotadas para lubrificantes são medidas a 100°C e 40°C.
- Índice de Viscosidade – É um número empírico, que relaciona a variação da viscosidade com a variação de temperatura, numa faixa de

40°C a 100°C em óleos lubrificantes (ASTM D 2270). Quanto mais alto o índice de viscosidade, menor será a variação da viscosidade com o aumento da temperatura.

- Cold Cranking Simulator (CCS) – Medida da viscosidade aparente a baixas temperaturas (entre -5°C e -35°C), simulando a partida a frio de um veículo (ASTM D 5293).
- Ponto de fulgor – É a menor temperatura na qual, com a passagem de uma chama de teste (centelha), os vapores do fluido em teste tornam-se inflamáveis. Esta análise é um importante parâmetro para segurança, já que quanto mais baixo o ponto de fulgor de um produto, mais perigoso este se torna para manuseio e estocagem (ASTM D 93).

“A distinção entre produtos inflamáveis e combustíveis, para efeitos de seguro, segurança de transporte etc., baseia-se no ponto de fulgor. Um produto que apresente um ponto de fulgor abaixo de 65,6°C, pelo método ASTM D 93, é considerado inflamável [...]; acima deste valor é considerado combustível.” (RUNGE, 1989, p.21).

Outras propriedades como cor, ponto de anilina, tendência de espuma e reserva alcalina, são importantes na caracterização de um lubrificante. O óleo básico puro, geralmente não atende a todos esses requisitos sendo, então, necessária a adição de aditivos para atingir as especificações do lubrificante final.

O grande desafio para os pesquisadores do ramo de lubrificação é balancear o uso de produtos não biodegradáveis em meio a tantos programas para melhora ambiental, aonde todos reúnem esforços para atingir metas de redução de produtos poluentes de emissões atmosféricas de gases de efeito estufa e tantas outras ações.

O óleo lubrificante proveniente de material fóssil depois de usado e/ou contaminado é considerado um resíduo tóxico e perigoso para a população e para o meio ambiente. Uma tentativa de gerenciar este resíduo é enviá-lo para o rerrefino, sendo esta a única destinação correta, de acordo com a resolução do CONAMA (CONAMA 362, 2005). Porém, trata-se de um processo custoso, já que é um processo industrial complexo e mesmo este processo gera subprodutos. Outro grande problema além do custo é ter o controle de todo o óleo lubrificante usado que

é descartado, uma vez que a própria população ainda descarta os resíduos oleosos em solos e águas.

A idéia de utilização de um produto biodegradável será imprescindível para os próximos anos, já que o termo biodegradável refere-se a produtos que não agredem o meio ambiente por poderem ser usados como substrato pelos microorganismos, que empregam esses materiais para realizarem seu metabolismo celular⁴ (Total lubrificantes).

Neste contexto enquadram-se os biolubrificantes. Os biolubrificantes representam a possibilidade de manipular lubrificantes de baixa ou nenhuma toxicidade, e que ao final de seu ciclo de vida, possam ser facilmente descartados por se tratar de um material biodegradável. Além disso, devido ao fato de os biolubrificantes apresentarem bons, ou até mesmo melhores resultados para as propriedades citadas anteriormente, como ponto de fulgor, ponto de fluidez, dentre outras, cada vez mais pesquisas vêm sendo realizadas para o desenvolvimento de novas tecnologias para obtenção dos mesmos.

1.1. Biolubrificantes

Os biolubrificantes são definidos segundo a empresa portuguesa Biolubrificantes – Total em sua homepage⁵, uma referência na produção dos mesmos, como:

“O termo biolubrificante aplica-se a todos os lubrificantes que são rapidamente biodegradáveis e não tóxicos para os seres humanos e para o ambiente. [...] Podem ter como base óleos vegetais ou ésteres sintéticos fabricados a partir de óleos renováveis modificados [...]”.

Atualmente, a constante procura por fontes de energia renováveis tem tornado cada vez mais freqüentes as pesquisas acerca dos biolubrificantes. Os biolubrificantes são considerados uma boa alternativa aos lubrificantes tradicionais,

⁴ Do site: <http://www.total.pt>. Acessado em 23/01/2010 às 19:30 h.

⁵ Do site: www.total.pt Acessado em 23/01/2010 às 21:00 h.

advindos de materiais fósseis, por apresentarem boas propriedades físico-químicas, como baixa volatilidade, têm excelente lubricidade, são materiais biodegradáveis e não tóxicos, podendo ser considerados produtos ecologicamente corretos (QUINCHIA *et al.*, 2009).

Além disso, os biolubrificantes são obtidos a partir de fontes renováveis, o que faz com que diminua a dependência das reservas petrolíferas, cada vez mais escassas no mundo – uma das suas grandes vantagens frente aos derivados de petróleo.

Por serem lubrificantes sintéticos, os biolubrificantes apresentam diversas vantagens em relação aos lubrificantes advindos do petróleo. Em consequência das boas propriedades físico-químicas apresentadas anteriormente, os lubrificantes sintéticos apresentam alguns benefícios, como:

- Fácil partida da máquina;
- Menor cisalhamento e menor perda de viscosidade;
- Menor formação de gomas e depósitos;
- Menores riscos de saúde e segurança;
- Menor risco de incêndio;
- Vida útil mais longa do lubrificante.

Do ponto de vista da relação custo-benefício, também pode-se destacar algumas vantagens:

- Menor número de paradas para manutenção;
- Menor consumo;
- Maior eficiência.

Alguns ésteres são amplamente utilizados como matéria prima para a obtenção dos biolubrificantes. Isto ocorre devido às suas excelentes propriedades físico-químicas, como alto ponto de fulgor, boa estabilidade térmica e baixa

volatilidade (GRYGLEWICZ, 2000).

“Propriedades específicas dos ésteres os habilitam a satisfazer os desafios de lubrificação impostos pelas máquinas modernas, tanto tecnicamente, quanto no que diz respeito à proteção ambiental. Em comparação aos óleos derivados de hidrocarbonetos, ésteres exibem um forte momento dipolo. Isso melhora sua lubrificidade, já que aderem fortemente à superfície do metal no ponto de atrito”.⁶
(GRYGLEWICZ *et al.*, 2005, p.560, tradução nossa).

1.2. Ésteres

Os ésteres são substâncias encontradas na natureza, podendo ser encontrados nos estados líquido ou sólido, dependendo do número de átomos de carbono e da condição do ambiente. Possuem os mesmos pontos de ebulição dos aldeídos e cetonas de massa molecular relativamente semelhante. Devido à presença do grupo C=O, os ésteres possuem um caráter polar. Entretanto, como os mesmos não possuem ligações hidrogênio, costumam ser pouco solúveis em água e solúveis em álcool. Para os ésteres, a solubilidade em água abrange apenas os compostos de três a cinco átomos de carbono (MORRISON, 1983).

Estes produtos são comumente usados como aromatizantes, por possuírem cheiro característico de determinadas frutas e flores. Ésteres vêm sendo amplamente utilizados também como lubrificantes. A Figura 1.1 apresenta a fórmula geral dos ésteres.

Os ésteres são obtidos a partir da reação direta de um álcool (ou até mesmo um fenol) e um ácido orgânico (ou derivados de ácidos), na presença de um catalisador. Esta reação resulta na substituição de um grupo –OH do ácido por um radical –OR', gerando o éster e água, sendo esta última resultante do hidrogênio do álcool e da hidroxila do ácido. A Figura 1.2 representa esta reação. Cabe ressaltar que a reatividade do álcool utilizado obedece a seguinte ordem: Primário > Secundário > Terciário (MORRISON, 1983).

⁶ O texto em língua estrangeira é: “Specific properties of esters enable them to meet the vagaries of lubrication challenges posed by modern machines both technically and with respect to environmental protection. In comparison to hydrocarbon oils, esters exhibit strong dipole moments. This improves their lubricity by adhering strongly to the metal surface at the friction point.”

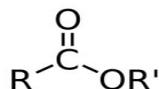


Figura 1.1. Fórmula geral dos ésteres

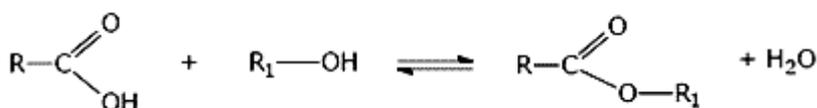


Figura 1.2. Esquema geral de reação para obtenção de ésteres

Dentre os ésteres que podem atuar como biolubrificantes, destaca-se o sebacato de dioctila, proveniente do ácido sebácico, que por sua vez é advindo do óleo de mamona. Os sebacatos são produtos de grande interesse como alternativa a óleos lubrificantes, por apresentarem características excelentes para tal fim; apresentam bons resultados para os ensaios já citados: ponto de fluidez, alto índice de viscosidade e estabilidade em altas temperaturas (Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade Estadual da Bahia – Ceped/UEBA)⁷.

Trabalhos anteriores, como o de Gryglewicz (2005), mostram alguns ésteres obtidos a partir de ácidos dicarboxílicos que podem ser utilizados para este fim, como por exemplo, ésteres derivados do ácido sebácico e do ácido adípico.

1.2.1. Sebacato de dioctila

O sebacato de dioctila (C₂₆H₅₀O₄), o produto de interesse do presente trabalho, que é também conhecido como Decanodióico ácido bis(2-etilhexil) éster, pode ser obtido a partir da reação de transesterificação do ácido sebácico, este último proveniente da fusão alcalina do óleo de mamona (Empresa Brasileira de

⁷ Disponível no site: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/ofuturodaindustria%20-%20Biodiesel.pdf>. Acessado em 28/02/2010.

Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2010). As reações específicas para a obtenção deste sebacato serão discutidas posteriormente.

O óleo de mamona, que é extraído das sementes da planta *Ricinus communis*, possui em sua composição 90% de triglicerídeos. Destes triglicerídeos, o principal é a ricinoleína, que após sofrer uma reação com metanol em meio alcalino (NaOH) a 45°C, dá origem ao ricinoleato de metila. A partir de uma reação conduzida em uma faixa de temperatura de 250 a 275°C, utilizando 2 moles de NaOH para cada 1 mol do ricinoleato de metila, obtém-se os produtos álcool caprílico e ácido sebácico. A Figura 1.4 ilustra esta obtenção, bem como todas as outras transformações químicas do óleo de mamona.

O sebacato de dioctila é um diéster proveniente do ácido sebácico, que é um ácido dicarboxílico. Encontra-se na forma de um líquido viscoso, incolor ou levemente amarelado, com um ponto de fulgor em torno de 210°C (Índice Merck, 1976).

Como todo éster obtido a partir de ácidos dicarboxílicos, o sebacato de dioctila caracteriza-se por ser estável termicamente, ter excelente lubrificidade e ser biodegradável (GRYGLEWICZ, 2005).

O sebacato de dioctila já fora apontado por outros trabalhos como uma boa alternativa a produtos de origem mineral. No trabalho “Lipase catalyzed synthesis of sebacic and phthalic esters”, Gryglewicz (2003) estudou a síntese deste, bem como a síntese de outros ésteres (di-2-etilhexil ftalato e di-3,5,5-trimetilhexil ftalato). Os resultados foram avaliados levando-se em consideração o tipo de lipase utilizada como catalisador. Dentre as enzimas estudadas, Novozym 435, Lipozyme Im e PPL, as duas primeiras, que são imobilizadas, foram as mais eficientes na síntese dos ésteres quando comparadas com a utilização da última enzima, PPL, que encontra-se em forma livre.

Gryglewicz e colaboradores (2005) compararam ésteres provenientes do ácido sebácico com ésteres obtidos a partir do ácido adípico, sempre nas mesmas condições reacionais. Observou-se que os primeiros apresentaram melhores propriedades físico químicas que os demais, corroborando com a proposta do

presente trabalho.

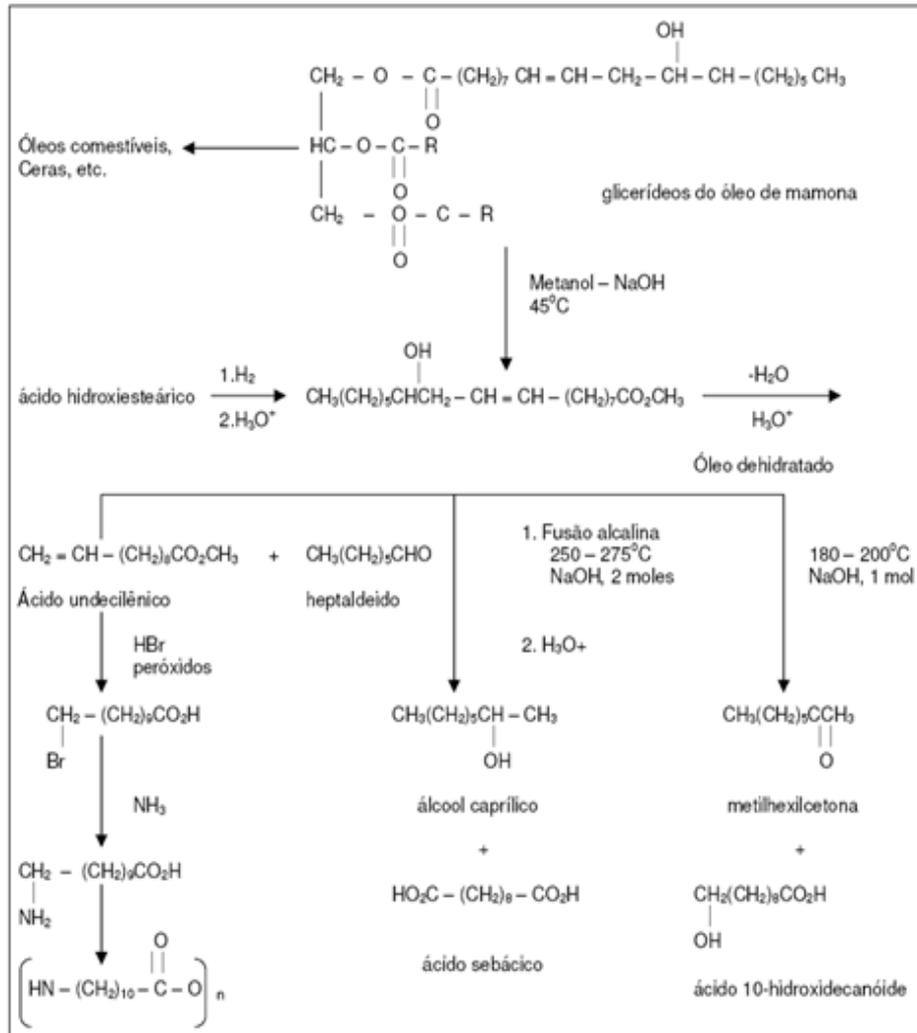


Figura 1.3. Transformações químicas do óleo de mamona

Fonte: EMBRAPA, 2010.⁸

O sebacato de didecila apresentou um índice de viscosidade de 167, enquanto que o éster didecil adipato obteve um índice de viscosidade de 117. Para o ensaio de perda por evaporação, apesar de ambos os ésteres terem apresentado

⁸ Disponível em:

<http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/SistemaProducaoMamona/index.htm>. Acessado em 23/01/2010.

bons resultados, pode-se constatar que após uma temperatura de 350 °C o didecil sebacato mostrou uma perda de massa menor que o didecil adipato.

Vale ressaltar que o ensaio de perda por evaporação (Noack - ASTM D 5800) é um importante parâmetro para óleos lubrificantes que necessitam trabalhar em altas temperaturas. Uma vez que o lubrificante apresenta grande perda de massa quando submetido a altas temperaturas, há uma perda significativa do fluido em uso, além da emissão de substâncias tóxicas para o meio ambiente.

Ainda neste estudo foi testada a adição destes ésteres em óleos lubrificantes minerais, numa proporção de 10 % m/m. Esta adição propiciou melhoria das condições físico químicas do óleo mineral puro. O ponto de fluidez do óleo mineral foi reduzido em 5 °C; o CCS (cold cranking Simulator - simulador de partida a frio) foi reduzido de 8900 cP para 7800 cP; o índice de viscosidade aumentou de 176 para 184. Além disso, o ponto de fulgor não teve nenhuma redução significativa.

1.3. Reações para obtenção do sebacato de dioctila

Emil Fischer foi o químico orgânico que descobriu no ano de 1895 que os ésteres são formados pelo aquecimento de um ácido carboxílico em uma solução alcoólica, com pequena quantidade de um ácido forte como catalisador. Em homenagem a ele, esta reação é conhecida como esterificação de Fischer (MORRISON, 1983).

A esterificação de Fischer é uma reação de substituição nucleofílica do grupamento acila usualmente catalisada por um ácido. Como os ácidos carboxílicos não são suficientemente reativos para sofrerem o ataque, utiliza-se um ácido forte (geralmente H_2SO_4 ou HCl). A esterificação é considerada a reação inversa à hidrólise, aonde a água e o éster reagem para formar um álcool e um ácido orgânico (reações apresentadas na Figura 1.5). Todas as etapas da reação são reversíveis, então, torna-se possível deslocar o sentido da reação. Para favorecer a formação do éster, pode-se trabalhar com álcool em excesso; para favorecer a formação do ácido carboxílico, trabalha-se com grande excesso de água no meio (McMURRY, 2005).

As reações de esterificação são de extrema importância na indústria química, uma vez que, como citado anteriormente, os ésteres são utilizados em diversas aplicações, como na produção de aromas e essências, solventes, plastificantes para polímeros, pesticidas, herbicidas, além do próprio uso como lubrificantes. Estima-se que devido ao uso extensivo de ésteres nestas indústrias, o número de ésteres comerciais exceda 500 (ALI, *et al.*, 2007).

O éster de interesse, sebacato de dioctila, foi sintetizado neste trabalho a partir da reação de esterificação do ácido sebácico com o octanol. O esquema da reação é apresentado na Figura 1.6. Esta reação também é uma reação de polimerização gradual, uma vez que a matéria prima é um ácido dicarboxílico.

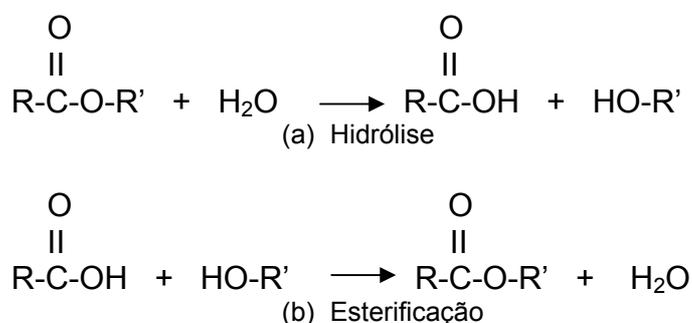


Figura 1.4. Esquema das reações (a) de hidrólise (b) de esterificação.
Fonte: Carvalho *et al.*, 2003

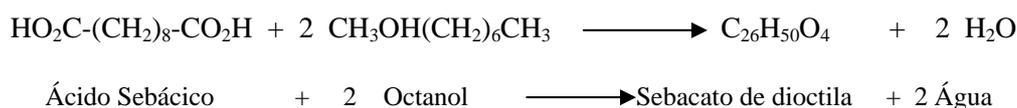


Figura 1.5. Reação para obtenção do sebacato de dioctila.

Griglewicz *et al.* (2005) sugeriram outra forma de obtenção para ésteres de ácidos dicarboxílicos (como o ácido sebácico e ácido adípico). Esta poderia ocorrer através de reações de transesterificação a partir de ésteres metílicos com alcoóis apropriados, na presença de catalisadores básicos. Neste caso, foram estudadas e comparadas as propriedades físico-químicas dos dois ésteres, no uso destes como lubrificantes.

1.4. Catalisadores empregados em reações de esterificação

Catalisadores são substâncias que aceleram a velocidade de uma reação. Esta aceleração ocorre devido à diminuição da energia de ativação da reação, promovida por este catalisador. Vale ressaltar, que um catalisador apenas acelera uma reação termodinamicamente possível pela redução de sua energia de ativação, porém ele não possibilita uma reação impossível de acontecer (CONN e STUMPF, 1980).

Os catalisadores de um modo geral dividem-se em catalisadores homogêneos e catalisadores heterogêneos. O que diferencia estes dois tipos de catalisadores é o fato de que os catalisadores homogêneos formam uma única fase com a mistura reacional, enquanto que os catalisadores heterogêneos permanecem formando outra fase durante todo o processo reacional.

Esta característica permite afirmar que os catalisadores heterogêneos podem ser mais facilmente separados no final da reação, além de poderem ser reutilizados.

Nas reações de esterificação, podem-se utilizar catalisadores ácidos ou enzimáticos. Os catalisadores ácidos possuem diversos inconvenientes para uso. De acordo com Ali e colaboradores (2006), a recuperação destes catalisadores não é rentável, além do fato de que altas concentrações de ácido aumentam a taxa de corrosão do sistema, acarretando em um aumento do custo operacional. Além disto, como os catalisadores ácidos são catalisadores homogêneos, há ainda a dificuldade do tratamento destes resíduos, que devem ser neutralizados para separação do produto.

1.4.1. Catalisadores químicos

Os catalisadores utilizados nas reações de esterificação podem ser ácidos minerais. Como os ácidos carboxílicos não são reativos o suficiente para que sofram um ataque de um álcool, há a necessidade da adição de um ácido forte (por exemplo, HCl ou H₂SO₄) para aumentar a reatividade destes ácidos carboxílicos. Estes ácidos aceleram tanto o processo de esterificação quanto de hidrólise, pelo

fato de protonarem o oxigênio carbonílico e, desta forma, tornam o carbono carbonílico mais suscetível ao ataque nucleofílico (McMURRY, 2005).

Apesar do rendimento das reações utilizando este tipo de catalisador ser relativamente alto, o uso de catalisadores ácidos em escala industrial torna-se limitado, uma vez que grandes quantidades destes catalisadores levam a processos de corrosão no sistema, exigindo materiais adequados de modo a suportar esta corrosão, o que aumenta os custos de produção (SAMI ALI *et al.*, 2007)

Ainda de acordo com Ali e colaboradores. (2007), outros problemas associados ao uso de catalisadores ácidos podem ser listados a seguir:

- Produtos com menor grau de pureza;
- A formação de subprodutos é mais acentuada;
- Há a necessidade de operações mais complexas para a separação do catalisador do produto final.

1.4.2. Biocatalisadores

O uso de biocatalisadores é alvo de constantes pesquisas em função de sua alta atividade catalítica, comparada com os catalisadores químicos convencionais. Além disso, as reações catalisadas por biocatalisadores podem ocorrer em condições mais brandas, não perdendo sua eficiência (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; LINKO *et al.*, 1998). Neste contexto está a catálise enzimática. Algumas das vantagens da catálise enzimática frente aos catalisadores químicos convencionais são (BON, FERRARA e CORVO, 2008):

- Podem aumentar a velocidade das reações de 10^6 até 10^{12} vezes;
- Sua especificidade é muito maior;
- Possuem alta enantioseletividade;
- Atuam em temperaturas de reação menores de 100°C ;
- As reações são conduzidas à pressões atmosféricas;

- São ambientalmente mais aceitáveis.

De acordo com Conn e Stumpf (1980), enzimas são proteínas que catalisam ou aceleram uma reação termodinamicamente possível. A função catalítica de uma enzima possui uma alta especificidade devido a sua natureza protéica. A estrutura altamente complexa da proteína enzimática propicia tanto o ambiente para um mecanismo particular de reação como a capacidade de reconhecer um grupo limitado de substratos (CONN E STUMPF, 1980).

A conversão do substrato em produto ocorre numa região da proteína que participa de forma direta nesta conversão. Esta região é conhecida como sítio ativo (CONN e STUMPF, 1980).

Dentre as enzimas, as hidrolases são as mais utilizadas industrialmente. Seu uso se deve ao fato de que as hidrolases têm maior especificidade de substratos, ampla disponibilidade, baixo custo, dentre outros (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Dentre as hidrolases, as lipases são um grande grupo de interesse e vêm sendo objeto de pesquisas para uso como catalisadores em diversas áreas. Além do uso destas em indústrias de detergente, outros ramos vão ganhando destaque como indústrias farmacêuticas, de cosméticos, de química fina, de biocombustíveis, além do ramo de interesse do presente trabalho, que é a obtenção de biolubrificantes. (CASTRO *et al.* 2003; CRESPO *et al.*, 2004; GRYGLEWICZ, 2000; REETZ *et al.* 1998; REETZ, 2002).

“Em geral, lipases são capazes de catalisar reações de esterificação e tioesterificação, além da hidrólise de triglicerídeos. Características como versatilidade catalítica, disponibilidade comercial, baixo custo, estereoseletividade, e a possibilidade de poder usar as lipases em largas faixas de pH e temperaturas entre 20 e 70°C, aumentaram suas aplicações.”⁹ (CRESPO *et al.*, 2004, p.401, tradução nossa).

Duan e colaboradores (2010) utilizou a lipase Novozym 435 (Novozymes) para catalisar a reação de síntese do 1,3-diacilglicerol na reação de esterificação

⁹ O texto em língua estrangeira é: “In general, lipases are suitable to catalyze esterification and thioesterification reactions and hydrolysis of triglycerides. Characteristics such as catalytic versatility, commercial availability, low cost, stereoselectivity and the possibility of using them within a large

entre ácido oléico e glicerol em meio contendo t-butanol. Os autores observaram que a enzima mostrou alta atividade e estabilidade por um longo período. Nas melhores condições de testes, foi possível a obtenção de 40 % do produto de interesse.

Gomes e colaboradores (2004) estudaram a síntese do butirato de butila, éster importante para a indústria alimentícia. Os testes foram feitos a partir de reações de esterificação entre ácido butírico e n-butanol, utilizando a lipase comercial imobilizada *Candida rugosa* (*Candida rugosa* lipase, Tipo VII). Verificou-se que, mesmo com baixas concentrações da lipase obteve-se uma conversão de ácido de quase 56 %.

Já Torres e Otero (2000) avaliaram o rendimento da reação de esterificação do ácido láctico, utilizando a lipase Novozym 435 (Novozymes). O rendimento obtido foi de 35 %, empregando as melhores condições de teste. Este rendimento gira em torno do máximo de rendimento que pode ser obtido utilizando ácido láctico comercial.

1.4.2.1. Lipases e seu mecanismo de atuação

As lipases, classificadas como hidrolases (triacilglicerol éster hidrolases, EC. 3.1.1.3), são enzimas capazes de catalisar a quebra das ligações de ésteres de diversos compostos, liberando ácidos graxos e glicerol (CASTRO *et al.* 2003; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Podem ser encontradas na natureza, sendo obtidas a partir de fontes vegetais, animais ou microbianas (CASTRO *et al.* 2003; RODRIGUES, 2009), sendo as microbianas as mais usadas, já que do ponto de vista econômico e industrial são mais viáveis (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Além das lipases microbianas apresentarem procedimento de isolamento mais simples a partir do caldo fermentativo, também são, geralmente, mais estáveis que lipases de outras fontes (vegetais e animais) (CARVALHO *et al.*, 2003).

Nas lipases, seus sítios ativos são caracterizados pela tríade catalítica

range of pH and at temperatures between 20 and 70°C increases their application."

composta por aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico ou glutâmico (Ser-His-Asp). Estes aminoácidos são imprescindíveis para a reação, já que se registra uma perda da ação catalítica com a modificação destes (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Esta tríade se repete ao longo de toda a estrutura das lipases.

As lipases possuem seus sítios ativos protegidos por uma tampa peptídica em forma de α -hélice, que em meio aquoso permanece fechada (conformação fechada), fazendo com que o sítio se torne totalmente isolado do meio da reação.

O sítio ativo da lipase é constantemente protegido por esta tampa hidrofóbica descrita acima, denominada "lid". Quando em contato com a interface hidrofóbica ou solvente orgânico, esta tampa se abre devido a uma mudança conformacional sofrida pela estrutura, expondo assim o sítio ativo (Figura 1.7 e Figura 1.8) (VILLENEUVE *et al.*, 1999).

As lipases têm sido classificadas em dois grupos, de acordo com sua especificidade com relação ao substrato:

- 1) Lipases 1,3 específicas – Catalisam a liberação de ácidos graxos especificamente primários, ou seja, na posição 1 ou 3 dos acilgliceróis.
- 2) Lipases não específicas – Não demonstram especificidade nenhuma com relação à natureza do grupo acil ou à posição em que está esterificado no glicerol. Libera ácidos graxos na posição 1(3) ou 2 dos acilgliceróis.

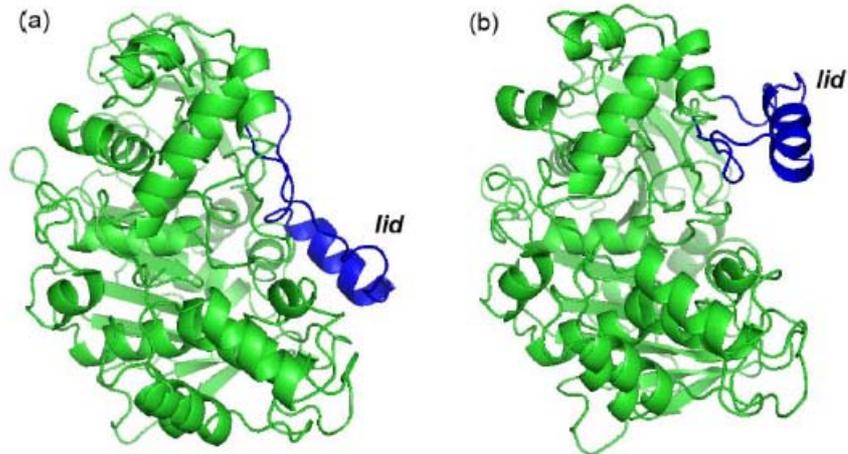


Figura 1.6. Diferentes conformações da lipase *Candida Rugosa*. (a) Conformação fechada (b) Conformação aberta.

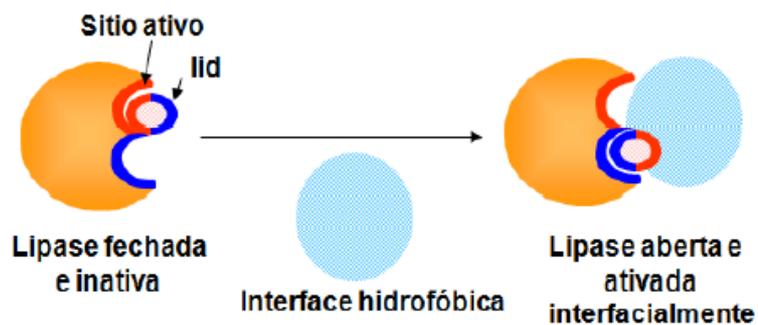


Figura 1.7. Mecanismo de ativação interfacial de lipases.

Pode-se utilizar como biocatalisadores lipases imobilizadas ou até mesmo em sua forma livre. A vantagem de utilizar a lipase em sua forma imobilizada consiste no fato de que, quando imobilizada, o suporte fornece maior estabilidade e vida útil à enzima. Além disso, o suporte pode fornecer uma melhor dispersão da enzima no meio reacional (GOMES *et. al.*, 2006).

Gomes *et. al.* (2006) estudaram os seguintes tipos de situação: reações de esterificação entre diferentes alcoóis e ácidos, catalisados pela lipase de *Candida rugosa* na forma imobilizada e as mesmas reações utilizando a lipase supracitada, porém em sua forma livre. As reações foram estudadas em meio orgânico e em meio aquoso. Os resultados obtidos para todos os experimentos mostram que a

enzima na forma imobilizada atuou em temperaturas e valores de pH mais extremos que a enzima na forma livre, que desnaturou quando aplicados os mesmos valores de temperatura e pH (45 °C e 8,0, respectivamente).

1.4.3. Enzimas em meio não aquoso

Durante anos acreditou-se que a utilização de enzimas só era possível em meio aquoso. A utilização de enzimas em meio aquoso foi extensivamente usada em processos catalíticos, porém seu uso tornou-se limitado, já que muitos substratos são pouco ou nada solúveis em meio aquoso, necessitando de grande volume reacional e procedimentos complexos de separação (GOMES *et al.*, 2004).

Apesar de relatos de que algumas enzimas apresentam atividades catalíticas em meio orgânico datem do início do século, foi a partir da década de 1980 que se passou a utilizar as enzimas em processos catalíticos em meios não aquosos (LIMA e ANGNES, 1999).

A água exerce um papel preponderante nas propriedades das enzimas, assim como em outras proteínas; na ausência de água, as enzimas têm sua conformação alterada, fazendo com que as mesmas percam sua atividade, estabilidade e seletividade, fazendo com que as enzimas se tornem inativas (ZACKS e KLIBANOV, 1985).

A água funciona como uma espécie de lubrificante molecular, sem a qual as enzimas tornam-se muito rígidas. Com a hidratação das enzimas, o centro ativo tem um aumento da mobilidade, devido a um aumento da polaridade e flexibilidade (KLIBANOV, 2001). Para manter a enzima ativa, deve-se proporcionar água no meio reacional. Portanto, a questão não é se o meio deve conter água, mas sim o *quanto* de água o meio deve conter. E mais ainda, qual a disponibilidade de água para a enzima (LIMA e ANGNES, 1998).

Algumas das vantagens em se utilizar a biocatálise com enzimas em meio não aquoso são listadas abaixo (GARCIA, 2005; LEE e DORDICK, 2002; SERDAKOWSKI e DORDICK, 2007; ZAKS e KLIBANOV, 1985; ZAKS e KLIBANOV,

1987):

- Aumento de solubilidade de alguns substratos e/ou produtos, permitindo que algumas reações sejam possíveis de acontecer;
- Aumento da estabilidade térmica das enzimas;
- Possibilidade de algumas reações ocorrerem, já que em meio aquoso estas reações encontram restrições de ordem cinética e/ou termodinâmica;
- Como as enzimas são insolúveis em meios orgânicos, a retirada destas do meio reacional e consequente reutilização das mesmas torna-se mais fácil.
- Deslocamento do equilíbrio reacional no sentido da síntese, já que há uma diminuição da quantidade de água.

Atualmente convencionou-se considerar como meios não aquosos os solventes orgânicos, fluidos supercríticos, fases gasosas ou fase sólidas, além dos líquidos iônicos, sendo estes últimos utilizados para este fim somente mais recentemente (AIRES-BARROS, 2002; GARCIA, 2005).

Com estas vantagens da utilização de enzimas em meio não aquoso, é cada vez maior o número de trabalhos e pesquisas divulgadas neste contexto. Após o trabalho pioneiro de Zaks e Klivanov em 1984 (GARCIA, 2005), cada vez mais artigos nesta área são publicados (GOMES *et al.*, 2004; HALLING *et al.*, 1998; LEE e DORDICK, 2002; LIMA e ANGNES, 1998; YANG *et al.*, 2004).

São exemplos de reações obtidas via catálise enzimática em meio orgânico algumas sínteses orgânicas (separação de alcoóis ou ácidos racêmicos, síntese de peptídeos), nas indústrias (síntese de aspartame, interesterificação regioseletiva de óleos e gorduras), além da analítica (LIMA e ANGNES, 1998).

Há também algumas desvantagens no uso de solventes orgânicos como meio reacional, como por exemplo, limitações à transferência de massa (especialmente em catalisadores imobilizados) e toxicidade de alguns solventes. Porém, o grande problema da utilização de enzimas em solventes orgânicos é o rendimento de reação. Já é sabido que as taxas de rendimento de reações em meio aquoso são maiores que em meios orgânicos – em torno de quatro ou cinco ordens de

magnitude mais altas (SERDAKOWSKI e DORDICK, 2007). De acordo com Klibanov (1997), este rendimento mais baixo em solventes orgânicos pode ser explicado pelo fato de que em meio aquoso, a enzima forma uma solução (uma vez que a mesma é solúvel em água). Quando a enzima é adicionada em solventes orgânicos, forma-se uma suspensão. Conseqüentemente, é bastante plausível que a atividade catalítica seja mais baixa em solventes orgânicos, devido as limitações difusionais nos substratos.

Ainda segundo Klibanov (1997), outra possível causa para este rendimento mais baixo é a mudança conformacional da enzima. Como já se sabe, quando proteínas estão em contato com misturas de água e solvente orgânico, ocorre a desnaturação destas. Quando em contato com solventes orgânicos puros, é de se esperar uma situação ainda pior. Mas na verdade, não é propriamente o contato com o solvente orgânico que provoca esta desnaturação da enzima e sim sua desidratação que altera a estrutura das enzimas e, conseqüentemente, reduz sua atividade catalítica.

Com a necessidade de se utilizar solventes orgânicos como meio reacional, por motivos já citados anteriormente, novas pesquisas surgem atualmente acerca de como melhorar o rendimento destas reações. Com isso, emergem cada vez mais alternativas eficientes para melhorar o desempenho das reações em meios orgânicos (HALLING *et al.*; 1998; LEE *et al.*, 2002; KLIBANOV, 1997; KLIBANOV, 2001; SERDAKOWSKI *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2004).

Como algumas alternativas, podemos citar (KLIBANOV, 2001; SERDAKOWSKI *et al.*, 2007):

- Uso de solventes hidrofóbicos preferencialmente aos hidrofílicos. Solventes hidrofílicos podem remover a quantidade mínima de água da superfície da enzima, sendo esta água imprescindível para a ativação da mesma;

- Utilização de homogeneização mais vigorosa do meio, de modo a eliminar possíveis problemas de transferência de massa.

- Liofilização da enzima. Este é um processo de desidratação no qual as

enzimas são congeladas e posteriormente colocadas no vácuo. As moléculas de água presentes na enzima sublimam sem que haja a fusão das mesmas. Para isso, a temperatura da enzima é resfriada durante a etapa de congelamento. No passo seguinte, as enzimas são submetidas a vácuo e temperaturas mais altas. Logo depois, a temperatura é ainda mais elevada para quebrar qualquer tipo de interação que possa ter ocorrido entre as moléculas de água e o material congelado.

Uma das formas de proteger a enzima da interação com o solvente orgânico do meio reacional é imobilizar a enzima, para que seja garantida a eficiência da catálise, além de propiciar o uso prolongado deste biocatalisador.

As enzimas imobilizadas são mais estáveis quando em condições desfavoráveis de temperatura e pH, e facilitam sua recuperação do meio reacional e sua reutilização. Além disso, as enzimas imobilizadas podem ser utilizadas na realização de um processo contínuo (CARVALHO *et al.*, 2006).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior (DALLA-VECCHIA, *et al.*, 2004).

De acordo com Aires-Barros (2002), as reações em meios orgânicos dependem diretamente da escolha do solvente correto para cada reação. Esta escolha deve levar em conta aspectos físico-químicos (capacidade de solubilização de substrato e produto, densidade, viscosidade, entre outros), biológicos (agressivos para o biocatalisador), segurança (toxicidade, inflamabilidade), logísticos (fácil obtenção, eliminação de resíduos), além de econômico (custo viável).

Ainda de acordo com estudos feitos por Aires-Barros (2002), como principais desvantagens relacionadas ao uso de solventes orgânicos como meio de bioconversão, pode-se destacar: aumento das limitações difusionais à transferência de massa de produtos e/ou reagentes, já que é introduzido mais uma fase (orgânica), além da fase aquosa e a própria fase sólida (caso a enzima esteja imobilizada); o uso do solvente pode significar um ambiente adverso para o

biocatalisador; pode ocorrer ainda a formação de emulsões estáveis, geralmente devido a efeitos interfaciais; devem-se considerar também os custos adicionais para a segurança do processo, considerando o tratamento de efluentes do processo, inclusive a própria reutilização do solvente orgânico.

1.5. Influência de algumas variáveis em reações de esterificação

Algumas variáveis interferem diretamente na obtenção do produto, no caso das reações que empregam lipases como biocatalisador. Pode-se destacar:

- *Efeito da concentração de lipase no meio reacional:*

Assim como para qualquer catalisador, o aumento da concentração de enzima aumenta a velocidade de reação. Com a baixa concentração inicial do substrato, os sítios ativos da enzima não se encontram bloqueados. Conforme aumenta a concentração de substrato, os sítios ativos tornam-se saturados, obstruindo estes sítios, fazendo com que a velocidade seja independente da concentração do substrato (CONN e STUMPF, 1980). De acordo com Crespo e colaboradores (2004), o aumento do rendimento da reação com o aumento da concentração de lipase pode ser relacionado com o fato de haver uma maior quantidade de biocatalisador disponível para formar o complexo “enzima-substrato”. Entretanto, alguns artigos mencionam que na medida em que se aumenta a quantidade de enzima no meio reacional, pode-se alcançar um ponto em que o rendimento da reação decresce. Estudos como o de Duan e colaboradores (2010) para reações de esterificação para obtenção de 1,3-diacilglicerol mostram este comportamento. Com 0,50g de enzima no meio reacional, a concentração de 1,3-diacilglicerol é em torno de 25% após 12 horas de reação; ao aumentar a quantidade de enzima para 1g para 50 mL observa-se um máximo na concentração do 1,3-diacilglicerol (35% após as mesmas 12 horas de reação); ao aumentar ainda mais a concentração de enzima, desta vez para 1,25g em 50 mL, nota-se um decréscimo na concentração do produto de interesse (32,8% após 12 horas de reação).

O artigo de Torres e Otero (2000) também demonstra comportamento semelhante na reação de esterificação enzimática do ácido láctico com ácidos graxos (como o ácido caprílico), utilizando a lipase Novozym 435. O maior rendimento de reação foi obtido quando utilizada a quantidade de 100 mg de Novozym 435 (foram testadas as seguintes quantidades de lipase no meio reacional: 25, 50, 100, 200 e 300 mg). Ao utilizar maiores ou menores quantidades de lipase no meio reacional, o rendimento da reação decaiu. Os autores atribuíram estes resultados ao fato de que com grandes quantidades de biocatalisador no meio reacional aumenta a fração de moléculas de ácido láctico que formam complexos acil-enzima. Essa formação de complexos impede as reações posteriores envolvendo o ácido caprílico, sendo que esta condição favorece a formação de oligômeros de ácido láctico.

- *Efeito da temperatura*

A reação quando catalisada faz com que o valor da energia de ativação (E_A) da molécula de reagente seja reduzida antes de sofrer a transformação química, aumentando assim a velocidade da reação. Desta forma, as reações catalisadas ocorrem de maneira mais rápida que as não-catalisadas. Além de usar catalisadores de modo a acelerar uma reação química, pode-se utilizar também o aumento da temperatura de reação. Com um aumento na temperatura da reação química, proporciona-se uma maior energia cinética das moléculas dos reagentes, ocasionando em maior quantidade de choques produtivos entre estas moléculas por unidade de tempo (GOMES *et al.*, 2006), fazendo com que haja uma aceleração na velocidade de reação. Dessa forma, o aumento da temperatura aumenta a velocidade de reações catalisadas ou até mesmo de reações não-catalisadas.

As reações catalisadas por enzimas apresentam comportamento semelhante às reações catalisadas quimicamente, no que diz respeito ao aumento da temperatura. Entretanto, nas reações biocatalisadas, existe um ponto de temperatura conhecido como “*ponto ótimo*” da reação; à medida que se aumenta a temperatura do meio reacional, observa-se um aumento acentuado na velocidade da reação. Porém, devido à natureza protéica das enzimas, pode ocorrer a

desnaturação térmica em temperaturas elevadas, fazendo diminuir a concentração efetiva da enzima, com conseqüente redução da velocidade da reação (CONN e STUMPF, 1980).

Diversos estudos difundidos na literatura demonstram este comportamento, sendo o ponto ótimo encontrado sempre justificado pela desnaturação da enzima em determinada temperatura. Pode-se citar o estudo de Wu e colaboradores (2001) para reações de esterificação catalisadas pela lipase de *Candida rugosa* em solventes orgânicos. Neste artigo é investigado dentre outros fatores, a influência da temperatura. O melhor rendimento da reação foi com a temperatura de 30°C, que foi considerada a temperatura ótima para a reação. A partir daí, pequenos aumentos da temperatura já causaram a rápida desnaturação da lipase.

Já Gomes e colaboradores (2006) investigaram a dependência da temperatura na atividade enzimática, comparando a lipase de *Candida rugosa* em sua forma livre e imobilizada. Foi observado que para a forma livre da lipase a atividade máxima ocorreu a 37°C, enquanto que a lipase na forma imobilizada teve a atividade máxima a 40°C. A partir destas temperaturas, observou uma intensa queda na atividade relativa (%) das lipases. Os autores explicaram tal fato pela desnaturação da enzima, sendo que, quando a mesma passa por um processo de imobilização, pode-se aumentar a temperatura ótima da enzima, o que permite trabalhos em faixas mais amplas de temperatura. Gomes e colaboradores (2006) justificaram a desnaturação da enzima pelo fato de que a enzima, por ter uma natureza protéica, necessita que sua estrutura terciária seja mantida, principalmente por grandes números de ligações não covalentes (por exemplo, pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto) para garantir sua atividade catalítica. Caso a molécula absorva excesso de energia, a estrutura terciária é rompida, desnaturando a enzima e, deste modo, fazendo com que a mesma perca sua atividade catalítica.

- *Presença de água*

A presença de água no meio em uma quantidade mínima é necessária para garantir a solvatação da enzima ou dos substratos e dos produtos. Esta quantidade

mínima de água retida ainda possibilita as enzimas manterem sua conformação tridimensional ativa (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; LORTIE, 1997).

Porém, quando em excesso, o éster produzido reage com a água, acarretando no deslocamento da reação no sentido inverso à esterificação, a reação de hidrólise.

Dörmö e colaboradores (2004), no estudo sobre a obtenção de biolubrificante a partir de reações de esterificação via catálise enzimática, sugerem o uso de um sistema de pervaporação para a retirada da água formada durante a reação entre ácido oléico e álcool isoamilico (1:2). Neste trabalho, a saída do reator foi conectada à uma unidade de pervaporação que utilizou membrana hidrofílica para a remoção contínua de água. O rendimento do éster sem o uso do sistema de pervaporação foi de 92 %. Ao utilizar a unidade de pervaporação, o rendimento do éster de interesse passou a ser de 99,8 %

Linko *et al.* (1995) sugeriram a utilização de vácuo para a retirada da água do sistema reacional na reação de síntese do poli(1,4-butyl sebacato), formado a partir da reação de poliesterificação entre o ácido sebácico e o 1,4-butanodiol. O resultado do uso de vácuo, quando a reação foi conduzida na presença de um solvente orgânico (difenil éter), foi de visível melhora na obtenção do produto de interesse, quando comparado com a reação decorrida sem o auxílio do vácuo. Quando decorridos 160 minutos de reação, o experimento que utilizou vácuo obteve uma massa molecular média poli(1,4-butyl sebacato) de aproximadamente 40000 gmol^{-1} . Já o experimento que não utilizou vácuo obteve uma massa molecular média do produto de interesse de 9000 gmol^{-1} .

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é investigar a síntese de sebacato de dioctila usando lipase comercial imobilizada.

Para tal, determinou-se os seguintes objetivos específicos, de modo a avaliar as melhores condições de síntese entre os reagentes ácido sebácico e 1-octanol, avaliando a influência de diversos parâmetros:

- Testar a solubilidade do ácido sebácico para identificar qual seria o melhor solvente empregado para análise das reações de síntese por cromatografia gasosa, além de verificar a composição do meio reacional para a reação entre o ácido sebácico e o octanol. Para tal, os seguintes solventes foram utilizados, nas proporções de 0,1 g de ácido sebácico para 3 mL de solvente: água, n-hexano, acetato de etila, acetona, etanol, metanol, éter etílico, éter de petróleo, éter diisopropílico, etilmetilcetona, diisobutilcetona, 1-hexanol, éter difenílico e 2-octanol.

- Avaliar a solubilidade do ácido sebácico nos solventes acima citados, em diferentes temperaturas (25°C, 40°C, 50°C e 60°C).

- Verificar a influência do tipo de lipase comercial imobilizada (Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM), na conversão da reação de esterificação entre o ácido sebácico e o 1-octanol.

- Investigar o efeito da temperatura (90°C, 100°C e 110°C) na conversão da reação de esterificação entre o ácido sebácico e 1-octanol.

- Estudar a influência da razão molar entre o ácido sebácico/1-octanol (1:4, 1:5, 1:6 e 1:7) na conversão da reação.

- Avaliar os efeitos da concentração de biocatalisador (Novozym 435 e Lipozyme RM IM), a 3, 5, 7, 9 e 11 % m/m, na síntese de sebacato de dioctila.

- Investigar métodos de remoção da água formada na reação de esterificação: utilização de reator aberto (livre evaporação), adição de peneira molecular no sistema reacional e utilização de vácuo.

- Verificar a viabilidade de reutilização do biocatalisador na síntese de sebacato de dioctila.

- Comparar a via enzimática com a via química, realizando a reação de esterificação entre o ácido sebácico e o 1-octanol, na presença de 7% m/m de ácido sulfúrico como catalisador.

- Caracterizar o produto reacional obtido, através dos seguintes ensaios: viscosidade 100°C e 40°C, índice de viscosidade, ponto de fluidez, ponto de fulgor e índice de acidez.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

O ácido sebácico 99%, 1-octanol 99%, 2-octanol 97%, bis(2-etilhexil) sebacato 97% e peneira molecular 3 Å foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. As lipases comerciais Novozym 435 (lipase 1,3 específica de *Pseudozyma antarctica*, também conhecida como *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa), Lipozyme RM-IM (lipase 1,3 específica de *Mucor miehei*, imobilizada em resina de troca iônica) e Lipozyme TL-IM (lipase 1,3 específica de *Termomyces lanuginosus*) foram todas gentilmente doadas pela Novozymes Latin America Ltda (Araucária, Brasil). Etanol absoluto P.A. 99,9% foi fornecido pela Merck.

3.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados no presente trabalho foram:

- Balança analítica digital METTLER TOLEDO;
- Banho termostático HAAKE DC 10;
- Bomba de vácuo FISATON modelo 825;
- Cromatógrafo a gás VARIAN modelo CP 3380;
- Placa de agitação e aquecimento IKA C-MAG HS 4.

3.3. Reator

As reações de esterificação foram realizadas em um reator batelada fechado de capacidade de 15 mL, provido de condensador e de agitação magnética. A temperatura do meio reacional foi mantida constante através da circulação de etilenoglicol, proveniente de banho termostático (HAAKE DC10) pela camisa do reator.

O acompanhamento do rendimento das reações de esterificação foi realizado por cromatografia em fase gasosa. Alíquotas de 20 µL eram retiradas do meio reacional, após interromper a agitação do sistema, quando, então, ocorria a decantação da lipase do meio reacional, em diferentes tempos de reação.

3.4. Determinação da atividade enzimática das lipases comerciais

A atividade das lipases comerciais imobilizadas Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM nas reações de esterificação foi determinada pela velocidade inicial da reação de esterificação entre o ácido oleico e butanol, com razão estequiométrica dos reagentes (0,03 mmol de ácido oléico e 0,03 mmol de butanol), empregando 3% m/m de lipase comercial, na temperatura de 45°C.

Esta reação de esterificação foi conduzida em reator aberto com capacidade de 20 mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático (HAAKE D10). Acompanhou-se o progresso da reação retirando-se alíquotas do meio reacional (100 µL, em duplicata) nos seguintes tempos: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos de reação. Essas alíquotas foram analisadas por titulometria de neutralização. As amostras foram dissolvidas em 30 mL de mistura acetona/etanol com razão molar de 1:2 e tituladas contra solução de NaOH a 0,02 mol/L, utilizando titulador automático Mettler modelo DL25. Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido oléico por minuto, nas condições experimentais descritas anteriormente. Segue abaixo a equação que descreve o cálculo empregado na determinação da atividade enzimática de esterificação.

$$A = \frac{(V_1 - V_2)C}{tm} \times 1000 \times \frac{Vm}{Va}$$

Onde:

A = atividade de esterificação (µmols/min.g);

V_1 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo zero de reação (mL);

V_2 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo t minutos de reação (mL);

C = concentração da solução de NaOH (mol/L);

t = tempo de reação (min);

m = massa de preparação enzimática empregada na reação (g);

V_m = volume do meio reacional (mL);

V_a = Volume de amostra (mL).

3.5. Testes de solubilidade

A solubilidade do ácido sebácico foi testada empregando 0,1 g de ácido sebácico em 3 mL dos solventes relacionados a seguir:

- | | |
|--------------------|-----------------------|
| - água | - éter de petróleo |
| - n-hexano | - éter diisopropílico |
| - acetato de etila | - etilmetilcetona |
| - acetona | - diisobutilcetona |
| - etanol | - 1-hexanol |
| - metanol | - 2-octanol |
| - éter etílico | - éter difenílico |

A solubilidade foi verificada em diferentes temperaturas, a seguir: temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), 40°C, 50°C e 60°C. A mistura foi mantida em um reator aberto sob agitação constante e a temperatura do meio reacional foi mantida constante através da circulação de etileno glicol proveniente de banho termostático (HAAKE D10), pela camisa do reator.

Adicionalmente, foi testada a solubilidade de 0,02 mol de ácido sebácico (massa molar = 202,25 g/mol) em octanol, etanol e na mistura etanol/octanol, em diversas proporções e temperaturas, conforme descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Solubilidade do ácido sebácico em 1-octanol, etanol e na mistura octanol/etanol, em diferentes razões molares, nas temperaturas de 75°C, 80°C, 85°C, 90°C e 100°C, nas proporções empregadas.

Solvente	Razão molar dos reagentes (ácido sebácico : solvente)
2-octanol	1:1
2-octanol	1:2
2-octanol	1:3
2-octanol	1:4
2-octanol	1:5
Etanol	1:1
Etanol	1:2
Etanol	1:3
Etanol	1:4
Etanol	1:5
Etanol	1:6
Etanol	1:7
Etanol + 2-octanol (1:2)	1:1:2
Etanol + 2-octanol (2:2)	1:2:2
Etanol + 2-octanol (3:2)	1:3:2
Etanol + 2-octanol (4:2)	1:4:2
Etanol + 2-octanol (5:2)	1:5:2

A solubilidade em etanol só foi testada a 75 °C, considerando o ponto de ebulição deste álcool (78,5 °C). Para o octanol foram avaliadas as temperaturas de 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C e 100 °C, visto que seu ponto de ebulição é de 195 °C.

3.6. Reação de esterificação entre o ácido sebácico e álcool empregando lipases

Os efeitos da temperatura de reação, da concentração de enzima, da razão molar de reagentes, do tipo de enzima, da remoção de água do meio reacional, da reutilização da lipase, além do emprego de catalisador químico foram investigados nas reações de esterificação do ácido sebácico.

3.6.1. Efeito do tipo de lipase

Foi estudado o efeito do tipo de lipase nas reações de esterificação entre 0,02 mol de ácido sebácico e 0,1 mol de 1-octanol, empregando 5% m/m de lipase, a 100°C. As lipases estudadas foram: Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM.

3.6.2. Efeito da razão molar dos reagentes

O efeito da razão molar dos reagentes foi estudado nas reações entre ácido sebácico e 1-octanol, empregando 5% m/m de lipase (Novozym 435 e Lipozyme RM IM), a 100°C. As razões molares ácido sebácico:1-octanol investigadas foram: 1:4, 1:5, 1:6 e 1:7 para as lipase Lipozyme RM IM e Novozym 435. O limite inferior da razão molar empregado foi 1:4, considerando os resultados dos ensaios de solubilidade.

3.6.3. Efeito da concentração enzimática

O efeito da concentração enzimática foi estudado nas reações entre 0,02 mol de ácido sebácico e 0,1 mol de 1-octanol, o que corresponde a uma razão molar ácido:álcool de 1:5, empregando lipase (Novozym 435 e Lipozyme RM IM), a 100°C. Nestes ensaios a concentração de enzima está expressa em % m/m em relação à massa de ácido sebácico. Foram estudadas as seguintes concentrações enzimáticas: 3, 5, 7, 9 e 11% m/m da Lipozyme RM IM, bem como da Novozym 435.

3.6.4. Efeito da temperatura

Para avaliação do efeito da temperatura na esterificação do ácido sebácico, as reações foram conduzidas empregando 0,02 mol de ácido sebácico (4,045 g) e 0,1 mol de álcool (16,06 mL de 1-octanol/2-octanol), o que equivale a razão molar ácido/álcool de 1:5, e 5% m/m da lipase (Novozym 435 e Lipozyme RM IM) em relação à massa do ácido sebácico, correspondendo a uma massa de 0,2832 g. Foram estudadas as seguintes temperaturas de reação: 90°C, 100°C e 110°C.

3.6.5. Métodos de remoção de água

O efeito da remoção da água formada na reação de esterificação entre o ácido sebácico e 1-octanol foi estudado nos experimentos conduzidos com 0,02 mol de ácido sebácico e 0,1 mol de 1-octanol, empregando 5% m/m de lipase Novozym 435 a 100°C, durante 150 minutos de reação. As formas de remoção de água do meio reacional utilizadas no presente trabalho foram: livre evaporação, adição de peneira molecular no meio reacional e vácuo.

A peneira molecular utilizada foi previamente tratada termicamente em estufa a 200°C, durante 24 h. Após a eliminação da água adsorvida à peneira molecular (cerca de 20% m/m de água), esta foi imediatamente adicionada ao meio reacional, no momento em que se iniciou a reação. As seguintes quantidades de peneira molecular Sigma 3 Å foram adicionadas ao meio reacional: 50, 100, 250 e 500 mg.

As reações conduzidas sob vácuo foram realizadas com o auxílio de uma bomba de vácuo Fisaton modelo 825, gerando vácuo constante durante os 150 minutos de reação.

As reações que utilizaram um sistema de livre evaporação foram conduzidas em reator batelada aberto (com capacidade de 15 mL), provido de agitação magnética. Foi feita a pesagem do sistema reacional no tempo zero (imediatamente após a adição da lipase) e no tempo final de reação (após 150 minutos), de modo a acompanhar a perda de massa após evaporação da mistura reacional.

3.6.6. Reutilização da lipase

Foi estudado o efeito da reutilização da lipase Novozym 435 nas reações de esterificação entre 0,02 mol de ácido sebácico e 0,01 mol de 1-octanol, razão molar ácido/álcool de 1:5, empregando 7 % m/m da lipase estudada, a 100 °C. Foi escolhida essa concentração de lipase para facilitar o manuseio da lipase, visto que a concentração de 5 % m/m seria uma quantidade muito pequena, dificultando a manipulação.

Para recuperação da lipase ao final das reações, a enzima foi separada do meio reacional através de filtração com o uso de papel de filtro e auxílio de vácuo. Após esta etapa, a lipase foi lavada com 50 mL de 1-octanol, filtrada à vácuo e seca em dessecador por 24 horas, antes de cada reutilização.

3.6.7. Efeito do catalisador químico

Foi investigada a utilização de catalisador químico (ácido sulfúrico) nas reações de esterificação entre 0,02 mol de ácido sebácico e 0,01 mol de 1-octanol, razão molar ácido/álcool de 1:5, empregando 7 % m/m de ácido sulfúrico em relação à massa de ácido sebácico, a 100 °C.

3.7. **Análise Cromatográfica**

Alíquotas de 20 µL do meio reacional foram retiradas nos tempos de 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos e depois diluídas em etanol (1:25) e injetadas no cromatógrafo a gás VARIAN, modelo CP 3380, equipado com detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar CP WAX 52 CB de 30m x 0,25mm x 0,25 µm, em sistema de injeção split com vazão de 1:20. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250°C e 280°C. A temperatura do forno foi, inicialmente, de 80°C durante 30 segundos e, em seguida, aumentada a uma taxa de 20°C/min, até atingir a temperatura de 150°C. Posteriormente, a temperatura do forno atingiu

300°C, a uma taxa de 20°C/min. O hidrogênio foi o gás de arraste utilizado na vazão de 2 mL/min e a pressão da coluna foi mantida constante em 20 psi. Um computador equipado com o software Star Workstation 6.2 foi conectado ao cromatógrafo através do módulo de interface Star 800 para integração automática dos picos obtidos. Um exemplo do cromatograma obtido para a análise do meio reacional pelo método citado está apresentado no Anexo I. Vale ressaltar que todas as análises cromatográficas foram feitas em duplicata.

3.8. Curvas-padrão

Foram realizadas as curvas-padrão para o método de cromatografia em fase gasosa para análise do ácido sebácico e do bis(2-etilhexil) sebacato, produto de interesse. As concentrações utilizadas para ambos os produtos foram: 0,007; 0,016; 0,033; 0,066; 0,099; 0,132 e 0,165 mol/L. Os resultados dessas análises estão apresentados no Anexo I. Alíquotas de 2 µL das soluções preparadas foram injetadas no cromatógrafo a gás, de acordo com o método já descrito anteriormente (item 3.6).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão mostrados os resultados obtidos para a síntese do éster sebacato de dioctila e o efeito de algumas variáveis na conversão da reação.

Também serão mostrados os resultados preliminares de solubilidade do reagente ácido sebácico em diferentes solventes, o que possibilitou a escolha do melhor solvente para o ensaio de análise cromatográfica, além de verificar a viabilidade da reação proposta neste trabalho.

As variáveis estudadas no presente trabalho foram: tipo de lipase, temperatura, concentração de lipase no meio reacional, razão molar de ácido sebácico:álcool, método de remoção da água no meio reacional, reutilização da lipase, além da comparação dos resultados obtidos na reação empregando biocatalisador com aquela usando catalisador químico (ácido sulfúrico).

Cabe ressaltar que ao longo das observações dos resultados obtidos, trataremos como produtos de reação, não somente o diéster sebacato de dioctila, mas também o produto sebacato de mono-octila. Este último acredita-se que seja formado antes que haja a substituição da segunda hidroxila do ácido sebácico. Uma vez que não havia um padrão para este monoéster, o mesmo foi comparado nos cromatogramas empregando o mesmo fator de resposta do obtido com o padrão de sebacato de dioctila.

4.1. Resultados preliminares

4.1.1. Testes de solubilidade

Inicialmente, testou-se a solubilidade do reagente ácido sebácico em vários solventes (conforme proposto na literatura), cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.1.

Verificou-se que o reagente foi solúvel em etanol nas temperaturas testadas,

o que possibilitou que este fosse utilizado como solvente de diluição para a análise cromatográfica.

Como o objetivo deste trabalho era o produto da reação de esterificação entre ácido sebácico e octanol, testou-se a solubilidade de 0,02 mol de ácido sebácico em 1-octanol em temperaturas mais elevadas, conforme apresentado na Tabela 4.2. Além do 1-octanol, foi verificada a solubilidade do ácido sebácico em etanol e na mistura etanol e 1-octanol. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.1. Solubilidade de 0,1 g de ácido sebácico em diferentes solventes (3 mL) e temperaturas

Solvente	T ambiente	40°C	50°C	60°C
água	insolúvel	insolúvel	insolúvel	insolúvel
n-hexano	insolúvel	insolúvel	insolúvel	insolúvel
acetato de etila	insolúvel	insolúvel	insolúvel	insolúvel
acetona	insolúvel	insolúvel	solúvel	solúvel
etanol	Solúvel	solúvel	solúvel	solúvel
metanol	Solúvel	solúvel	solúvel	solúvel
Éter etílico	insolúvel	insolúvel	insolúvel	insolúvel
Éter de petróleo	insolúvel	insolúvel	insolúvel	insolúvel
Éter diisopropílico	insolúvel	insolúvel	insolúvel	insolúvel
etilmetilcetona	insolúvel	insolúvel	insolúvel	insolúvel
diisobutilcetona	insolúvel	insolúvel	insolúvel	insolúvel
1-hexanol	insolúvel	insolúvel	insolúvel	insolúvel
1-octanol	insolúvel	insolúvel	insolúvel	insolúvel
Éter difenílico	insolúvel	insolúvel	insolúvel	insolúvel

A partir dos testes de solubilidade, concluiu-se que a reação de esterificação entre o ácido sebácico e o octanol poderia ser conduzida empregando razões molares de ácido:álcool acima de 1:4 e temperaturas acima de 100 °C, ou razões molares ácido:álcool acima de 1:5, quando empregadas temperaturas acima de 90°C.

A reação entre o ácido sebácico e o octanol também poderia ser conduzida em temperaturas menores (75 °C), desde que fosse também adicionado o etanol, na razão molar ácido sebácico/etanol/1-octanol igual a 1:5:2. Considerando a possibilidade da reação entre ácido sebácico e etanol também ser catalisada pela lipase, observada pela análise cromatográfica (resultados não mostrados), optou-se

por estudar a reação de síntese de sebacato de dioctila apenas no meio reacional contendo ácido sebácico e octanol.

Tabela 4.2. Solubilidade de 1 mol de ácido sebácico em diferentes solventes e temperaturas

Solvente	Quantidade (mol)	75°C	80°C	85°C	90°C	100°C
1-octanol	1	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
1-octanol	2	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
1-octanol	3	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
1-octanol	4	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel
1-octanol	5	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Solúvel	Solúvel
etanol	1	Insolúvel	-	-	-	-
etanol	2	Insolúvel	-	-	-	-
etanol	3	Insolúvel	-	-	-	-
etanol	4	Insolúvel	-	-	-	-
etanol	5	Insolúvel	-	-	-	-
etanol	6	Insolúvel	-	-	-	-
etanol	7	Solúvel	-	-	-	-
etanol + 1-octanol	1:2	Insolúvel	-	-	-	-
etanol + 1-octanol	2:2	Insolúvel	-	-	-	-
etanol + 1-octanol	3:2	Insolúvel	-	-	-	-
etanol + 1-octanol	4:2	Insolúvel	-	-	-	-
etanol + 1-octanol	5:2	Solúvel	-	-	-	-

4.2. Influência de alguns parâmetros reacionais na conversão da reação de esterificação do ácido sebácico com 1-octanol empregando lipase

4.2.1. Influência do tipo de lipase

Inicialmente, nas reações de esterificação entre o ácido sebácico e o 1-octanol testou-se três lipases comerciais imobilizadas (Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM) nas seguintes condições de teste: razão molar ácido sebácico:1-octanol de 1:5, a 100 °C, utilizando 5 % m/m (em relação à massa de ácido sebácico) de lipase. Os resultados são apresentados na Figura 4.1.

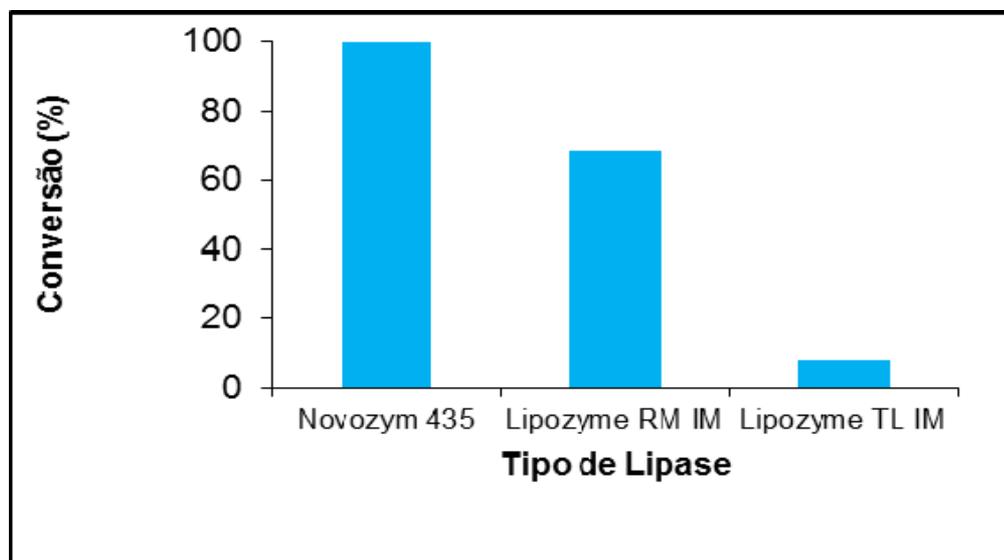
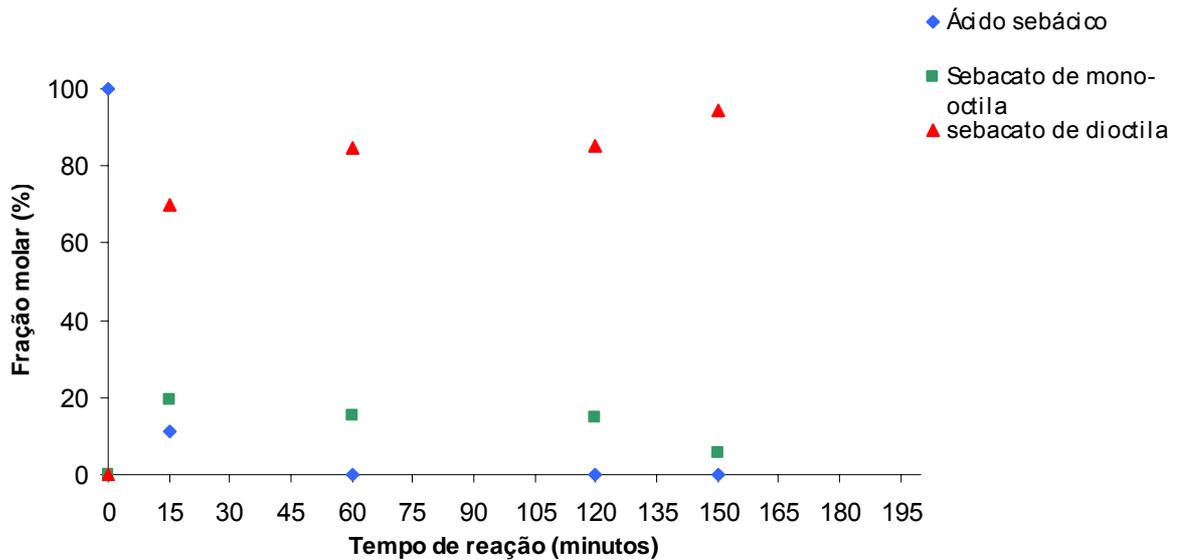


Figura 4.1. Efeito do tipo de lipase na conversão do ácido sebácico após 150 minutos de reação entre o ácido sebácico e 1-octanol (razão molar de 1:5), a 100 °C, empregando 5 % m/m de diferentes lipases comerciais imobilizadas.

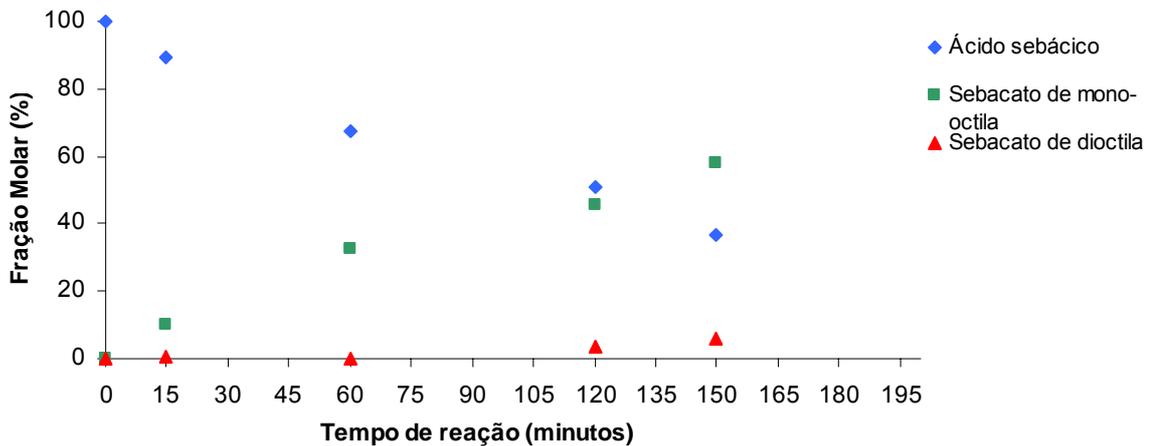
Nota-se pela Figura 4.1, que a maior conversão foi obtida utilizando a lipase Novozym 435 (100 %), seguido da lipase Lipozyme RM IM (68,6 %) e da lipase Lipozyme TL IM (7,81 %). Devido ao baixo valor de conversão obtido na reação empregando a lipase Lipozyme TL IM, esta não foi mais avaliada nos demais testes de investigação das reações de esterificação para síntese de sebacato de dioctila.

Estes resultados estão coerentes com os valores de atividade determinados para as três lipases comerciais (item 3.4). De acordo com a determinação da atividade de esterificação realizada, a Novozym 435 apresentou o maior valor (3824 μmols de ácido/min.g), seguido da Lipozyme RM IM (1909 μmols de ácido/min.g) e o menor potencial foi realmente observado para a Lipozyme TL IM (699 μmols de ácido/min.g).

Quando se observa a especificidade das lipases, pode-se concluir que a Novozym 435 também é a que apresenta o melhor resultado, conforme exposto na Figura 4.2.



(a) Novozym 435



(b) Lipozyme RM IM

Figura 4.2. Composição do meio reacional após 150 minutos na reação entre o ácido sebáico e 1-octanol, com razão molar ácido/álcool de 1:5, a 100 °C e 5% m/m de lipase. (a) Novozym 435. (b) Lipozyme RM IM.

A Figura 4.2 (a), para a reação com a lipase Novozym 435, mostra que a fração molar do produto de interesse (sebacato de dioctila) foi de 94,2 % após 150 minutos de reação, sendo que, logo após 15 minutos de reação, o ácido sebáico já havia sido quase todo consumido. Estes resultados mostram a eficiência desta lipase para a reação de síntese do sebacato de dioctila.

Já na Figura 4.2 (b), para a reação conduzida com a lipase Lipozyme RM IM,

pode-se observar que, apesar da conversão ter se mostrado em torno de 60%, a fração molar do sebacato de dioctila aponta um baixo rendimento para o mesmo (5,8 %); ainda pode ser concluído que além da baixa seletividade para o produto de interesse, a conversão do ácido sebácico também ocorre de forma mais lenta.

De acordo com Figura 4.2, nota-se o aparecimento de outro produto, que inicialmente tem seu surgimento de maneira crescente, sendo consumido ao longo da reação. Acredita-se ser o éster mono-substituído; uma vez que o ácido sebácico é um ácido dicarboxílico, ocorreria primeiro a substituição de uma carbonila, para posteriormente ser totalmente convertido no diéster de interesse.

A lipase Lipozyme RM IM apresentou uma conversão menor em relação a Novozym 435. Por ser uma lipase 1,3-específica e como o ácido dicarboxílico utilizado no presente estudo apresenta as carbonilas na posição 1, esperava-se uma performance melhor da Lipozyme RM IM, mesmo considerando os resultados de atividade de esterificação, pois esta enzima é largamente utilizada em reações de esterificação (RODRIGUES e FERNANDES-LAFUENTE, 2010).

Trabalhos utilizando lipases sugerem que a soma da quantidade de carbonos dos reagentes pode exercer uma influência na atividade da enzima. O tamanho da cadeia carbônica pode restringir o acesso dos reagentes ao sítio ativo da enzima. Essa explicação é relatada no trabalho de Gomes e colaboradores (2006), sobre a determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. Os autores concluíram que para reagentes cuja soma de carbonos seja igual ou superior a 14, pode ocorrer uma redução gradativa na conversão do éster correspondente.

Já Castro e colaboradores (2000), no estudo sobre a influência do coeficiente de partição do substrato na performance da lipase na síntese de acetato de citronela por reações de alcólise, verificaram a mesma influência sobre a lipase de *Mucor miehei*. A conclusão é que, para reações de esterificação que utilizem octanol, o ideal é que o ácido possua um número de carbonos igual a sete. Assim, a soma ideal para o número de carbonos dos substratos seria igual a 15, para as reações

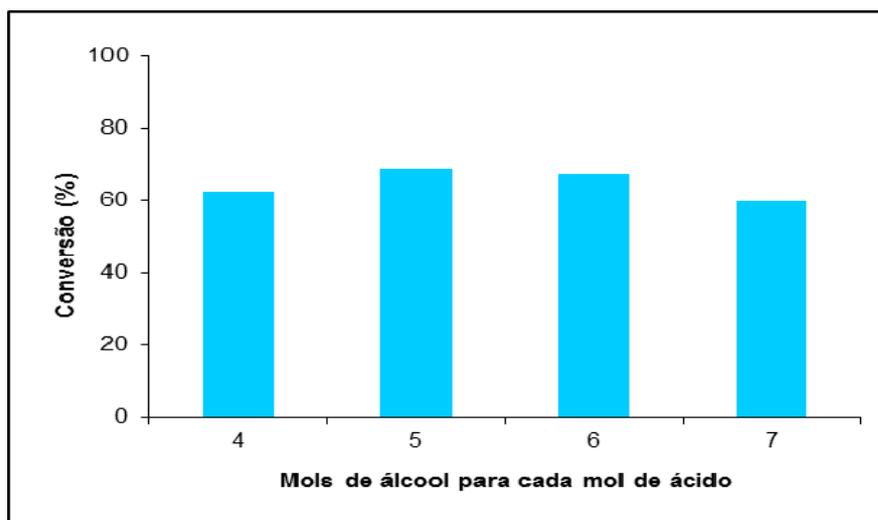
empregando a Lipozyme RM IM.

Bruno e colaboradores (2004), no estudo da síntese de ésteres catalisada pela lipase de *Mucor miehei* imobilizada em partículas magnéticas de álcool polisiloxano-polivinil, também verificaram que esta lipase torna-se mais ativa em reações de esterificação que tem como álcool reagente o octanol, quando o ácido utilizado possui um número de átomos de carbonos igual a sete. Deste modo, a soma ideal no número de carbonos dos reagentes para obter a melhor atividade da enzima seria de 15.

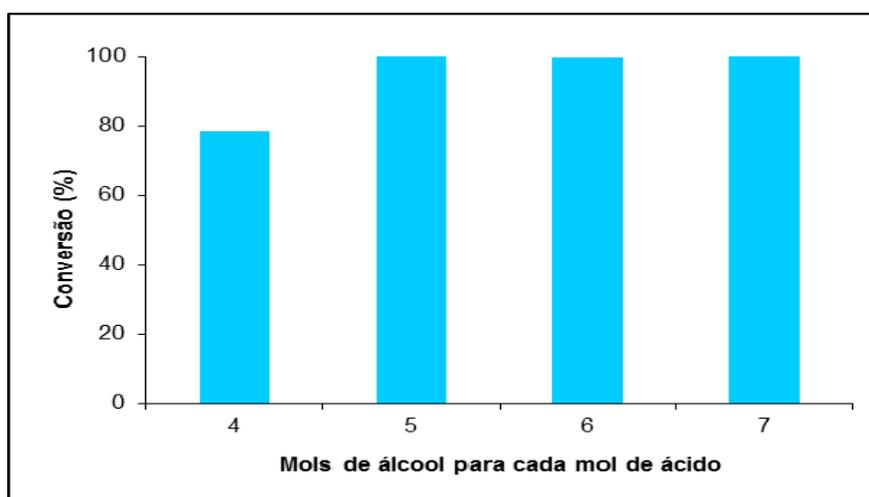
Estes estudos podem explicar o comportamento da lipase Lipozyme RM IM nas reações de síntese do sebacato de dioctila, uma vez que os reagentes do presente trabalho possuem uma soma do número de átomos de carbonos igual a 18, tendo o ácido sebácico 10 carbonos e, o octanol, 8 carbonos. Desta forma, a síntese de sebacato de dioctila supera os 14 átomos de carbono e, até mesmo o número ideal de 15, conforme relatado nos trabalhos anteriores. Assim, apenas a produção de sebacato de mono-octila, cujo número de carbonos é igual a 16, é favorecida quando empregada a lipase Lipozyme RM IM.

4.2.2. Influência da razão molar de ácido sebácico/álcool no meio reacional

Para verificar os efeitos da razão molar dos reagentes na síntese de sebacato de dioctila testou-se as seguintes razões molares de ácido sebácico/1-octanol: 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 para as reações utilizando Lipozyme RM IM e Novozym 435. Os resultados podem ser visualizados na Figura 4.3. Todas as reações foram conduzidas a 100°C, utilizando 5 % m/m de lipase.



(a) Lipozyme RM IM



(b) Novozym 435

Figura 4.3. Efeito da razão molar ácido sebácico/1-octanol na conversão do ácido sebácico após 150 minutos de reação, a 100 °C, empregando 5 % m/m da lipase comercial imobilizada. (a) Lipozyme RM IM (b) Novozym 435.

Nota-se que para ambas as lipases, a razão molar não exerce forte influência sobre a conversão da reação. De acordo com a Figura 4.3 (a), que ilustra o efeito da razão molar dos reagentes com o uso da lipase Lipozyme RM IM, observa-se que a razão molar 1:5 ofereceu conversão de ácido sebácico (68,6 %) muito semelhante às conversões obtidas com outras razões molares: com a razão molar ácido/álcool de 1:6, obteve-se 67,3 % de conversão e para a razão molar ácido/álcool de 1:7, a

conversão foi de 59,8 %. O mesmo ocorre para a menor quantidade de 1-octanol: com a razão molar ácido/álcool de 1:4, a conversão de ácido sebácico foi de 62,3 %.

O aumento de um dos reagentes funcionou segundo o princípio de Le Chatelier: quanto maior for a quantidade de um dos reagentes, o equilíbrio será deslocado no sentido direto da reação. Logo, ao aumentar a concentração de álcool no meio reacional, maior deveria ser a conversão do ácido sebácico em produto.

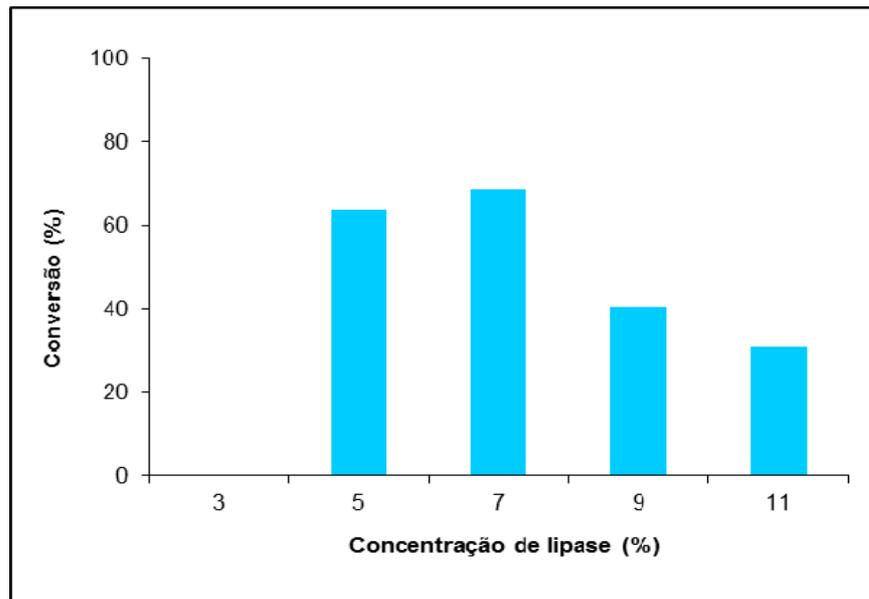
Porém, com o excesso de álcool provavelmente ocorreu a inibição da enzima, conforme relatado na literatura (KRAAI *et. al.*, 2008; DÖRMÖ *et. al.*, 2004; GHAMGUI *et. al.*, 2004). De acordo com Trubiano e colaboradores (2011), quando o álcool é adicionado ao sistema, devido à sua polaridade, são criadas interações hidrofílicas com a camada de água essencial para a lipase causando modificações na estrutura protéica da mesma, ocasionando na inibição desta enzima.

Para a lipase Novozym 435, conforme exposto na Figura 4.3 (b), a menor quantidade de 1-octanol (razão molar ácido/álcool de 1:4) propiciou uma conversão de 78,5 %, sendo esta a menor conversão encontrada. Conforme houve o aumento da quantidade de álcool, ocorreu também o aumento da conversão, chegando a um máximo de 100 % de conversão nas razões molares 1:5, 1:6 e 1:7, não sendo observada a sua desnaturação pelo excesso de álcool.

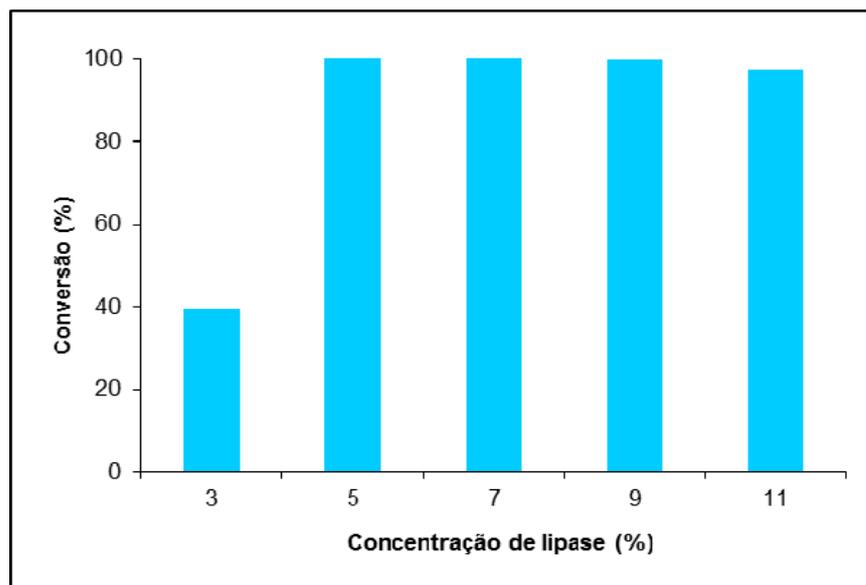
De acordo com esses resultados, adotou-se como a razão molar ácido sebácico/1-octanol ideal de 1:5 para ambas as lipases, considerando a maior conversão de ácido sebácico e a melhor condição custo-benefício.

4.2.3. Influência da concentração de lipase no meio reacional

O efeito da quantidade de lipase no meio reacional foi avaliado nos experimentos conduzidos a 100°C, com razão molar ácido sebácico/álcool de 1:5, com as seguintes quantidades de lipase: 3, 5, 7, 9 e 11% m/m em relação ao ácido sebácico, tanto para a Lipozyme RM IM quanto para a Novozym 435. Os resultados estão apresentados na Figura 4.4.



(a) Lipozyme RM IM



(b) Novozym 435

Figura 4.4. Efeito da concentração da lipase na conversão do ácido sebácico após 150 minutos de reação, a 100 °C, razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5. (a) Lipozyme RM IM (b) Novozym 435.

Nas reações utilizando a lipase Lipozyme RM IM, as conversões de ácido sebácico, para as concentrações de 3 %, 5 %, 7 %, 9 % e 11 % m/m de lipase foram, respectivamente, de 0 %, 63,6 %, 68,6 %, 40,5 % e 30,8 %, após 150 minutos de reação.

Estes valores caracterizam um ponto máximo de conversão quando utilizou-se 7% m/m da lipase Lipozyme RM IM. Concentrações inferiores da lipase resultaram em conversões menores, assim como concentrações acima de 7% m/m.

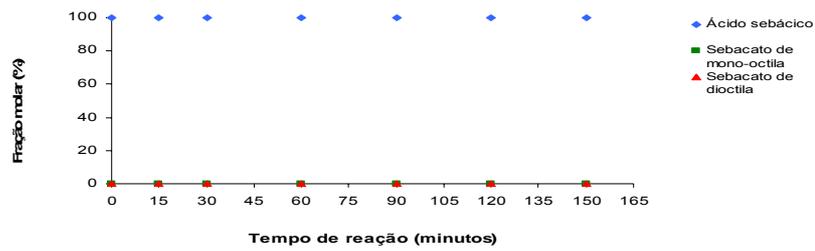
À medida que se aumenta a quantidade de lipase no meio reacional, a tendência é que aumente também a conversão do ácido (reagente limitante), uma vez que haverá mais catalisador disponível para formar o complexo enzima-substrato. Entretanto, conforme a concentração de enzima foi acrescida em grandes quantidades ao meio reacional, ocorreu um decréscimo na conversão do reagente. Este decréscimo na conversão do reagente pode ser explicado pelo fato de que se formou um aglomerado do biocatalisador, ocasionando possíveis problemas difusionais. O catalisador que fica no interior destes “grumos” acaba por não participar da reação, diminuindo assim, a sua capacidade catalítica. Ocorreu, então, um decréscimo da eficiência por unidade de massa do catalisador.

Comportamentos semelhantes relacionados à concentração de enzima foram relatados em trabalhos anteriores, como em Duan e colaboradores (2010), onde estudou-se a reação de esterificação para obtenção de 1,3-diacilglicerol utilizando a lipase Novozym 435. Com o acréscimo na concentração de lipase no meio reacional, também ocorreu um decréscimo na conversão em produto.

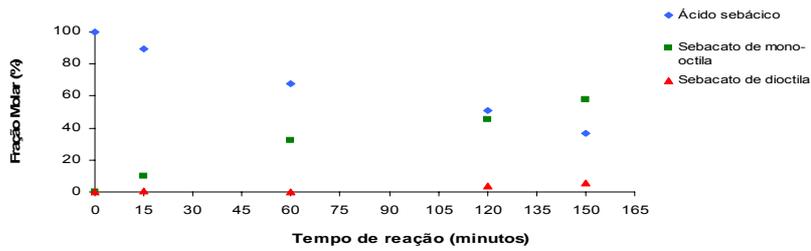
Já de acordo com a Figura 4.4 b, nas reações utilizando a lipase Novozym 435, as conversões de ácido sebácico, para as concentrações de 3 %, 5 %, 7 %, 9 % e 11 % m/m de lipase foram, respectivamente, de 39,6 %, 100 %, 100 %, 99,9 % e 100 %.

Para esta lipase, observa-se que o máximo de conversão foi obtido a partir da utilização de 5 % m/m de lipase. Por conta da relação custo benefício, considerou-se que a melhor condição reacional seria, portanto, utilizando 5 % m/m de Novozym 435.

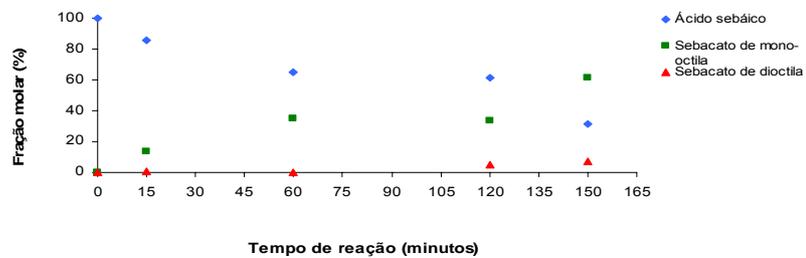
Pela Figura 4.5 pode-se verificar as frações molares de ácido sebácico, monoéster do ácido sebácico e o diéster ácido sebácico ao longo da reação de síntese do sebacato de dioctila, empregando a Lipozyme RM IM.



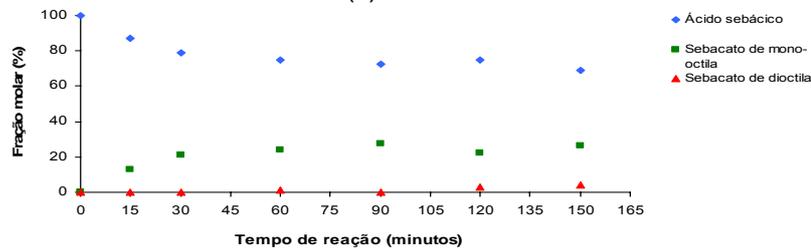
(a) 3% m/m



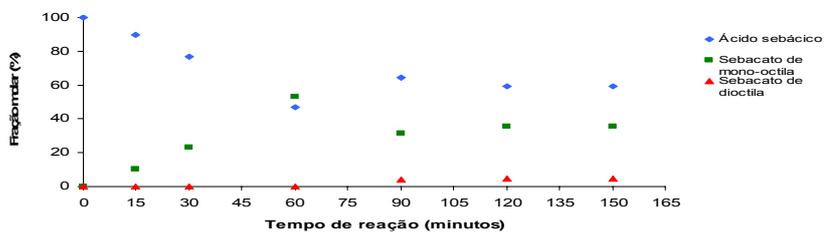
(b) 5% m/m



(c) 7% m/m



(d) 9% m/m



(e) 11% m/m

Figura 4.5. Composição do meio reacional na reação entre o ácido sebácico e 1-octanol, empregando razão molar ácido/álcool de 1:5, a 100 °C e a lipase Lipozyme RM IM. (a) 3% m/m (b) 5% m/m (c) 7% m/m (d) 9% m/m (e) 11% m/m.

Na Figura 4.5, observa-se que a reação conduzida com a lipase Lipozyme RM IM não apresentou boa seletividade para o éster de interesse, mesmo nas melhores condições de razão molar dos reagentes e de concentração de lipase no meio reacional (7% m/m). A fração molar de sebacato de dioctila (diéster) ao final da reação, ou seja, após 150 minutos, foi de 7,0 %. Já o rendimento de éster sebacato de mono-octila foi de aproximadamente 62 %. Além disso, o ácido é consumido mais lentamente até a primeira hora de reação, a conversão foi de apenas 35 %. As taxas iniciais de reação, conforme esperado, aumentaram com o aumento da concentração de lipase no meio reacional. Porém, isso também só foi observado até a concentração de 7 % m/m da lipase Lipozyme RM IM no meio reacional; acima dessa concentração, a taxa de conversão inicial também diminuiu.

Para a reação conduzida com a lipase Novozym 435 (Figura 4.6), além da excelente conversão (100%), nota-se uma ótima seletividade para o sebacato de dioctila (94%). Ao final da reação restam apenas 5,8 % de fração molar do monoéster. Quanto maior foi a quantidade de enzima adicionada ao meio reacional, maior foi a taxa de conversão do ácido sebácico. Com 5 % m/m de Novozym 435, a conversão após 15 minutos de reação correspondeu a 89 %. Já com a adição de 7% m/m, 9% m/m e 11% m/m de Novozym 435, a conversão de ácido sebácico após 15 minutos de reação já era de 100 %.

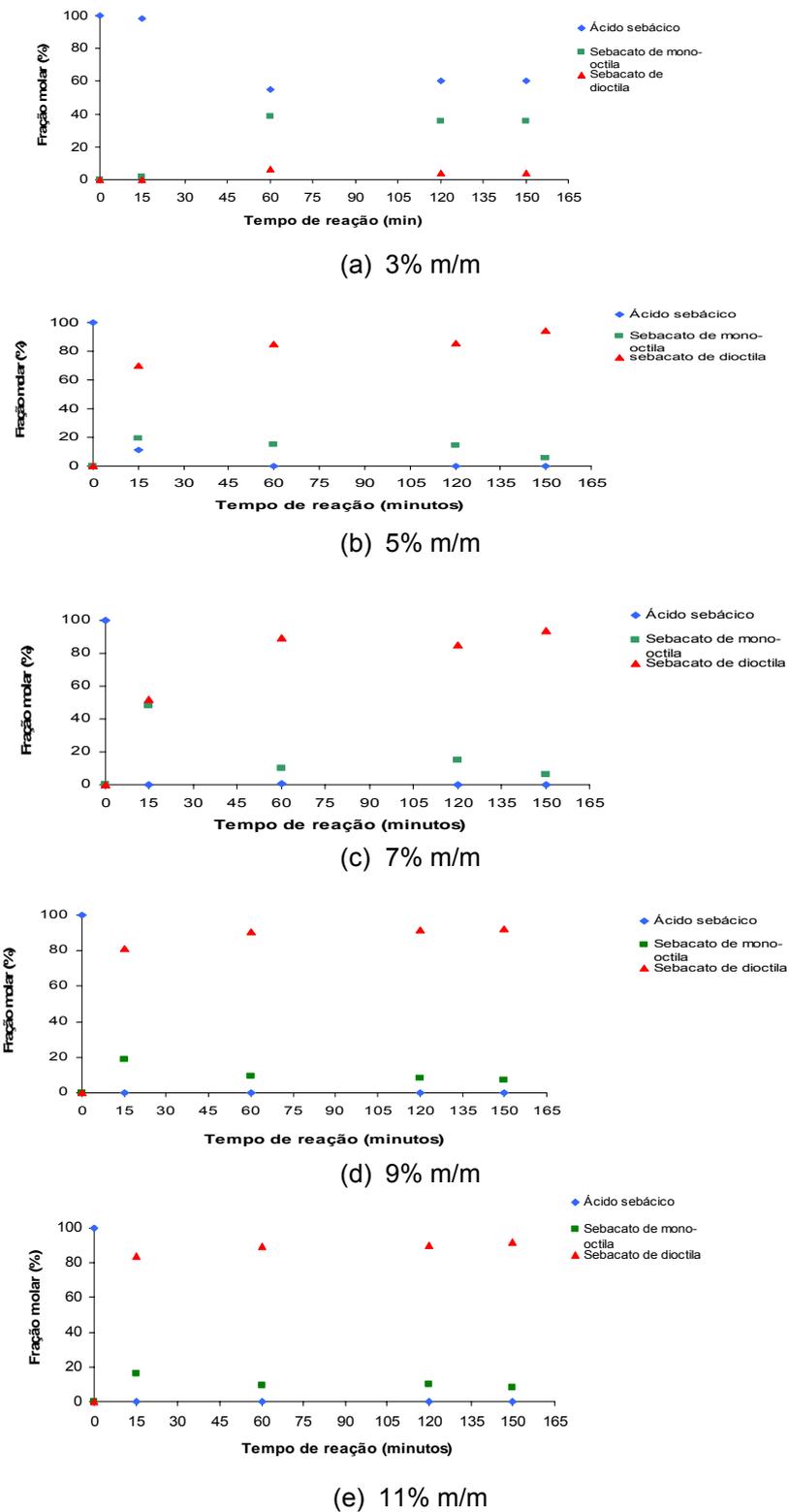
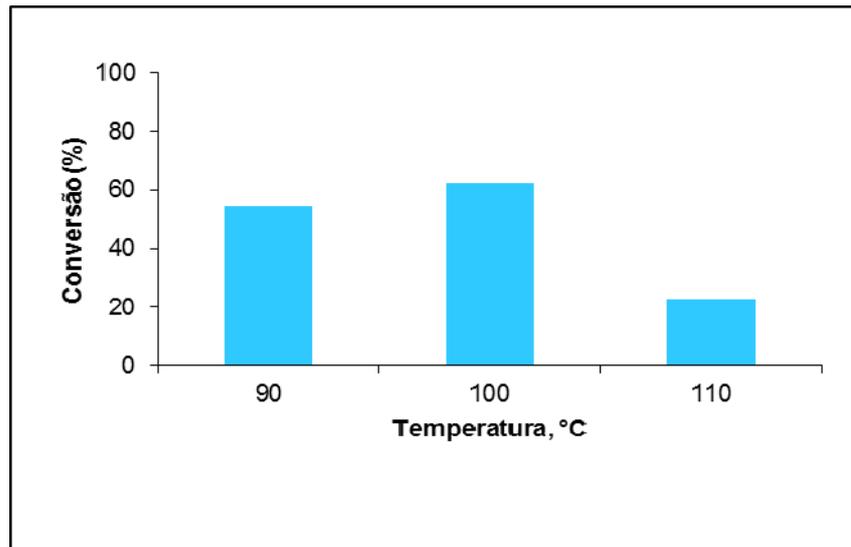


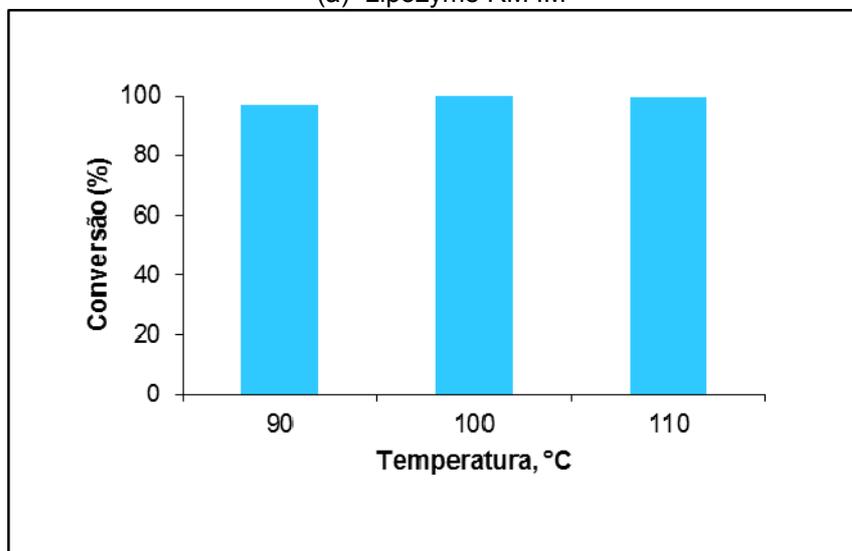
Figura 4.6. Composição do meio reacional na reação entre o ácido sebácico e 1-octanol, empregando razão molar ácido/álcool de 1:5, a 100 °C e a lipase Novozym 435. **(a)** 3% m/m **(b)** 5% m/m **(c)** 7% m/m **(d)** 9% m/m **(e)** 11% m/m.

4.2.4. Influência da temperatura

O efeito da temperatura na conversão da reação entre o ácido sebácico e o 1-octanol foi investigado nas reações empregando razão molar ácido:álcool de 1:5, 5% m/m de lipase comercial imobilizada, nas temperaturas de 90 °C , 100 °C e 110 °C. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 4.7.



(a) Lipozyme RM IM



(b) Novozym 435

Figura 4.7. Efeito da temperatura na conversão do ácido sebácico após 150 minutos de reação, empregando 5 % m/m de lipase e razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5. **(a)** Lipozyme RM IM **(b)** Novozym 435.

Observou-se que a maior conversão de ácido sebácico para ambas as lipases ocorreu na temperatura de 100°C. Nota-se ainda, que para a lipase Novozym 435, os resultados obtidos foram muito semelhantes nas três temperaturas testadas.

De acordo com a Figura 4.7a, que apresenta a conversão da reação utilizando a lipase Lipozyme RM IM, observa-se que a conversão de ácido sebácico a 90 °C foi de 54,3 %, enquanto que a conversão obtida a 100 °C foi de 62,2 %, e a 110 °C foi de apenas 22,8 %. A seletividade desta lipase para o sebacato de dioctila, foi em torno de 10% para as temperaturas testadas.

Uma reação, mesmo quando não catalisada, pode aumentar sua velocidade devido a um aumento na temperatura do sistema reacional, até atingir uma temperatura que proporcione alta conversão dos reagentes. O aumento da temperatura proporciona uma maior energia cinética das moléculas dos reagentes, ocasionando em maior quantidade de choques entre estas moléculas. De acordo com Iyer e Ananthanarayan (2008), o aumento da temperatura de reação propicia algumas vantagens, como por exemplo: diminuir a viscosidade do meio reacional e as limitações difusionais, conseqüentemente, proporcionando maiores taxas de reação. Entretanto, quando uma reação é catalisada por enzimas, devido à sua natureza proteica, as mesmas podem se desnaturar em temperaturas muito elevadas.

Comportamentos semelhantes foram identificados em reações de esterificação, como por exemplo, no trabalho de Jin-Chuam Wu e colaboradores (2001), que estudou reações de esterificação catalisadas pela lipase de *Candida rugosa* em solventes orgânicos. A reação entre o ácido láurico e álcool laurílico na presença de iso-octano apresentou maior atividade enzimática na temperatura de 30°C (em torno de 300 mmol/ming), enquanto que a 20°C a atividade da enzima foi de 200 mmol/ming e a 40°C foi de 240 mmol/ming.

Para as reações conduzidas com a lipase Novozym 435, conforme apresentado na Figura 4.7 b, pode-se observar que as conversões foram similares. A conversão de ácido sebácico obtida foi de 97%, 100% e 99% para as temperaturas de 90°C, 100°C e 110°C, respectivamente.

A seletividade em sebacato de dioctila obtida nas reações empregando Novozym 435 está ilustrada na Figura 4.8. Observa-se que o maior valor foi obtido na temperatura de 100°C: 94%. Para as temperaturas de 90°C e 110°C, foram observados os mesmos valores de seletividade para o diéster formado: 70%.

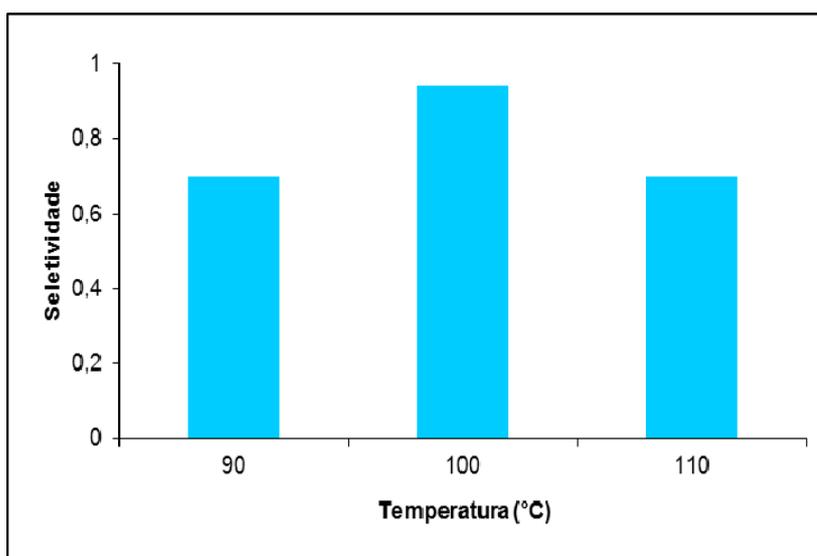


Figura 4.8. Seletividade em sebacato de dioctila obtida após 150 minutos de reação entre o ácido sebácico e 1-octanol, empregando razão molar de 1:5 e 5 % m/m da lipase Novozym 435, em diferentes temperaturas.

4.2.5. Influência da remoção de água do meio reacional

Sabe-se que a quantidade de água no meio reacional exerce grande influência em reações de esterificação. Como dito anteriormente, a enzima necessita de uma mínima quantidade de água para tornar-se ativa e torna-se inativa em meios totalmente anidros. No entanto, o aumento na quantidade de água presente no meio reacional nas reações de esterificação pode acarretar na reação reversa – hidrólise do éster formado.

Com isso, torna-se importante o controle da quantidade de água na reação proposta no presente trabalho.

Para avaliar a influência da quantidade de água formada ao longo da reação

de esterificação na conversão do ácido sebácico, testou-se a retirada desta por três metodologias: livre evaporação (uso do reator aberto), com vácuo e a adição de peneira molecular ao meio reacional. Considerando que os maiores valores de conversão foram obtidos com a Novozym 435, os experimentos cujos resultados serão descritos a seguir, foram realizados apenas com essa enzima.

As reações foram conduzidas a 100 °C, empregando 5% m/m de Novozym 435, e razão molar ácido sebácico:1-octanol de 1:5.

a) Livre evaporação

A reação conduzida com livre evaporação da água, através do emprego de um reator batelada aberto, permitiu a obtenção de 99,8% de conversão do ácido sebácico, após 150 minutos de reação. A evolução dessa reação, bem como a reação em reator fechado, pode ser observada na Figura 4.9.

Quando comparada à conversão obtida na reação com o reator fechado, em que se obteve 100 % de conversão, nota-se uma desprezível redução.

Para verificar a perda de massa do sistema reacional ocorrida no experimento em reator aberto, o sistema foi pesado no tempo zero (imediatamente após a adição da enzima) e após 150 minutos de reação. O esperado era que a massa evaporada fosse apenas correspondente à massa de água formada durante a reação de esterificação. Mas, ao pesar o sistema antes e depois da reação, a massa perdida por evaporação não correspondeu à estequiometria da reação. Para cada mol de ácido sebácico convertido é gerado dois mols de água. Assim, o esperado é que, ao utilizar 0,02 mol de ácido sebácico, fosse gerado 0,04 mol de água, o que correspondia a 0,72 g. Mas a massa do sistema reacional da reação conduzida com o reator aberto diminuiu de aproximadamente 3,5 g. Ou seja, aproximadamente apenas 20% da massa evaporada correspondia a água evaporada. O restante acredita-se ser correspondente ao 1-octanol que também deve ter evaporado do meio reacional. Vale ressaltar que o ponto de ebulição do 1-octanol é de 195°C, enquanto que o ponto de ebulição do sebacato de dioctila é de 248°C contra 294°C que é o ponto de ebulição do ácido sebácico. Estes dados

levam a conclusão de que a substância que possivelmente evaporou do sistema realmente foi o 1-octanol.

Nota-se então, a ocorrência de dois fenômenos ocorrendo simultaneamente: a retirada de água do meio reacional e a diminuição da razão molar, já que o álcool também evapora do sistema, sendo este último o possível responsável pela formação do produto de interesse de forma mais lenta.

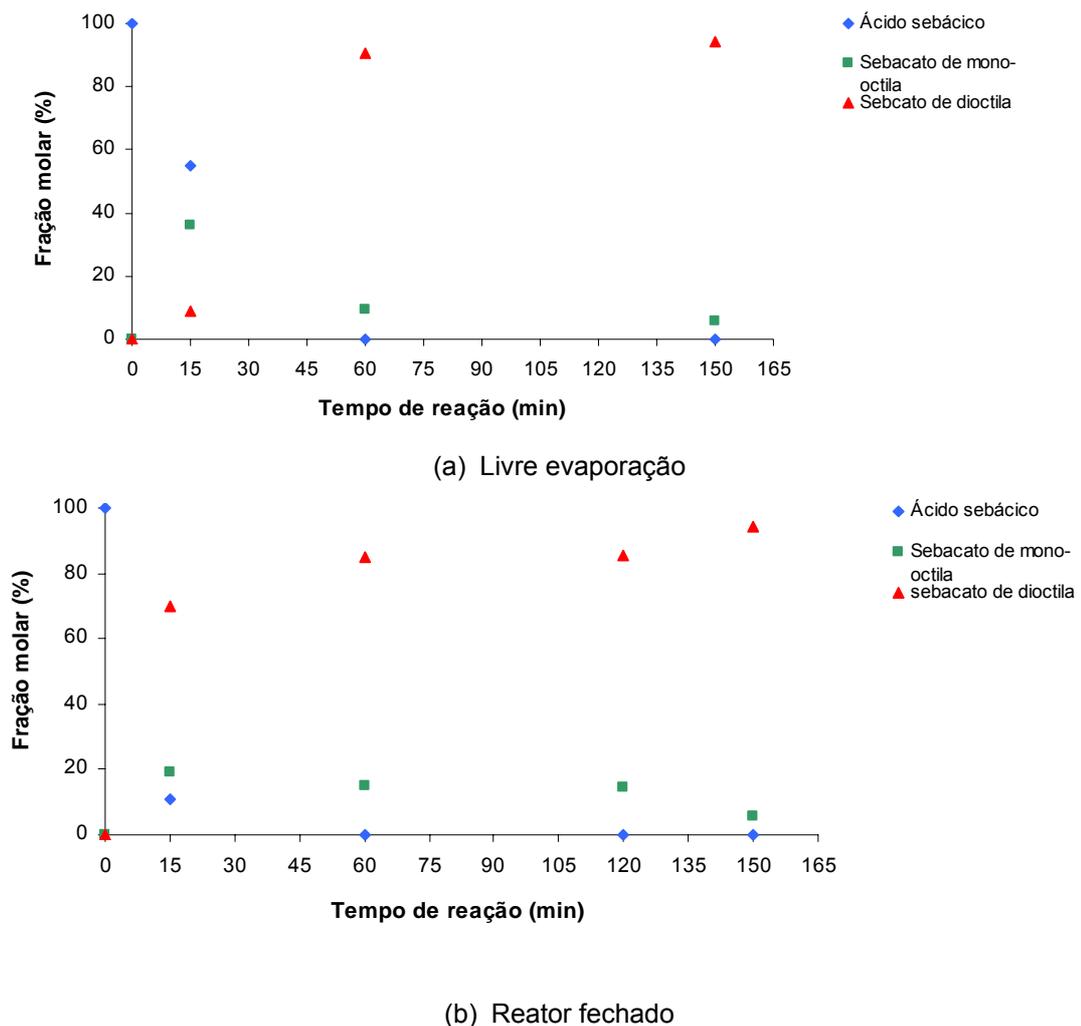


Figura 4.9. Composição do meio reacional na reação de síntese do sebacato de dioctila a 100 °C, com razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5, com 5 % m/m de Novozym 435. (a) Livre evaporação (b) Reator fechado.

Com relação à síntese de sebacato de dioctila, quando é comparado o progresso da reação com o tempo, pode-se notar pela Figura 4.9 que com o reator

fechado já houve uma grande formação de sebacato de dioctila logo nos primeiros 15 minutos de reação, ao contrário da reação com reator aberto, que só aos 60 minutos de reação apresentou formação considerável do diéster. A fração molar do diéster de interesse aos 15 minutos na reação com reator aberto foi de 9%, enquanto que no mesmo tempo na reação em reator fechado, a fração molar do sebacato de dioctila foi de 70%.

Esse tempo maior para a formação do produto de interesse com o reator aberto pode ser explicado pela evaporação de um dos reagentes, o que justifica dizer que, a melhor condição para obtenção do éster de interesse, entre as duas condições comparadas, é com o reator fechado.

b) Vácuo

Na reação realizada sob vácuo, a conversão de ácido sebácico obtida após 150 minutos de reação foi de 99,7%.

Comparando este resultado com o obtido pelo método convencional (reator fechado), nota-se que a conversão foi apenas um pouco inferior. O mesmo ocorreu quando comparadas as conversões nos primeiros 15 minutos de reação. Obteve-se 88% de conversão em 15 minutos na reação com vácuo e 89% de conversão em 15 minutos na reação com o reator fechado. Entretanto, quando comparadas as frações molares do sebacato de dioctila aos 15 minutos de ambas as reações, nota-se pela Figura 4.10 que, para a reação com o reator fechado, a seletividade para o éster de interesse é maior, visto que sua fração molar é de 70%, contra apenas 46% de fração molar na reação sob vácuo. A seletividade da lipase para o sebacato de dioctila aos 15 minutos de reação é de 52% na reação sob vácuo, contra 78% quando utilizado o reator fechado.

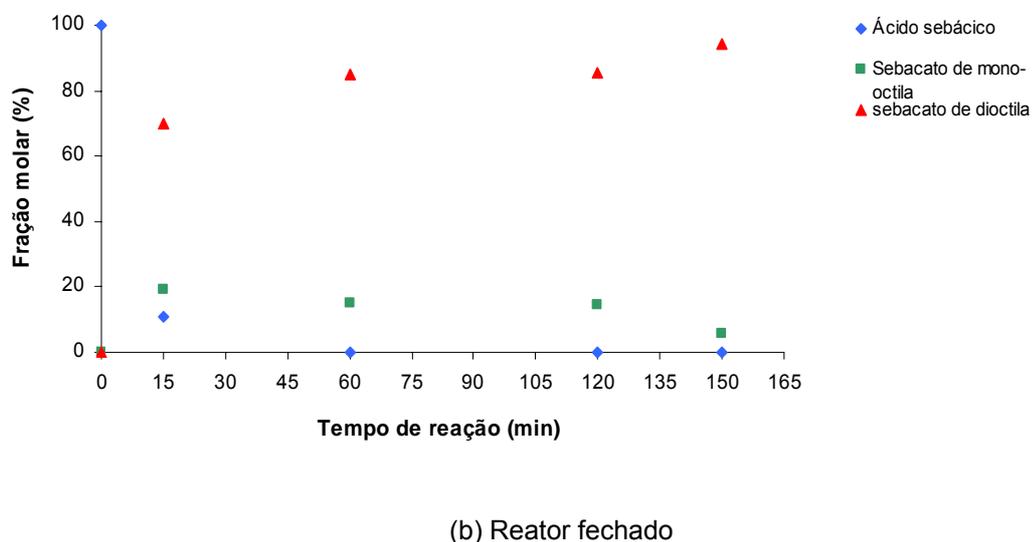
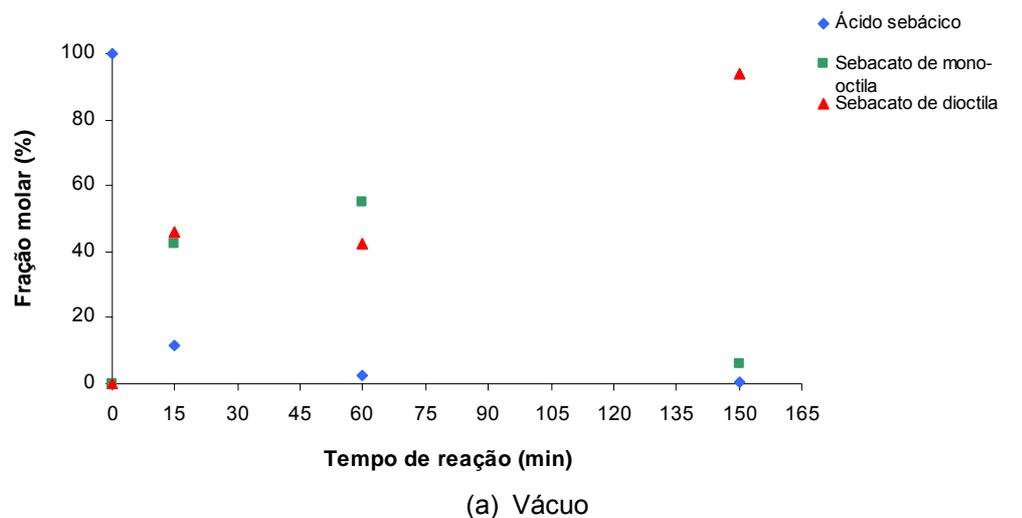


Figura 4.10. Composição do meio reacional na reação de síntese do sebacato de dioctila a 100 °C, com razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5, com 5 % m/m de Novozym 435. (a) Vácuo (b) Reator fechado.

c) Peneira molecular

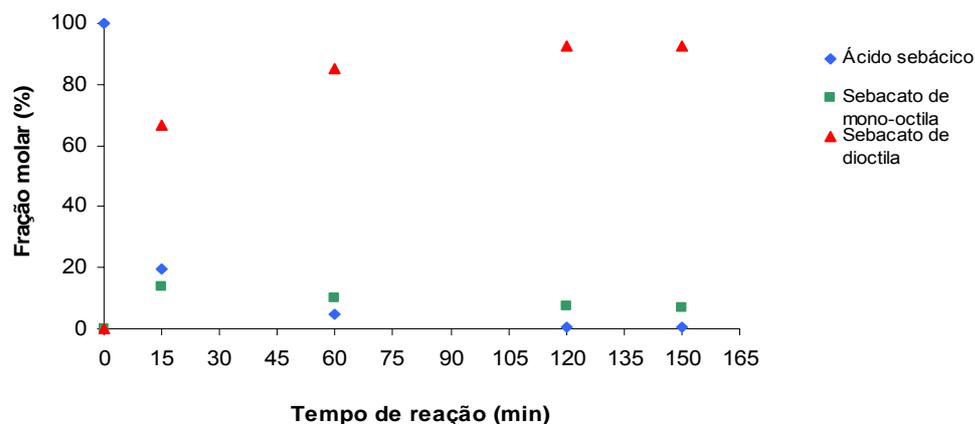
Testou-se também a adição de peneira molecular ao meio reacional para remoção da água produzida na reação. A peneira molecular utilizada foi uma peneira de 3Å, fornecida pela Sigma, e foi previamente seca em estufa a 200 °C por 24 h antes de ser adicionada à reação. Pesando a peneira antes e após o período de secagem, constatou-se que a mesma continha cerca de 20% m/m de água.

Os testes utilizando a peneira molecular foram conduzidos a 100 °C, com razão molar ácido sebácico:1-octanol de 1:5 e com 5 % m/m da lipase Novozym 435, com o reator fechado. As seguintes quantidades de peneira molecular foram testadas: 50, 100, 250 e 500 mg.

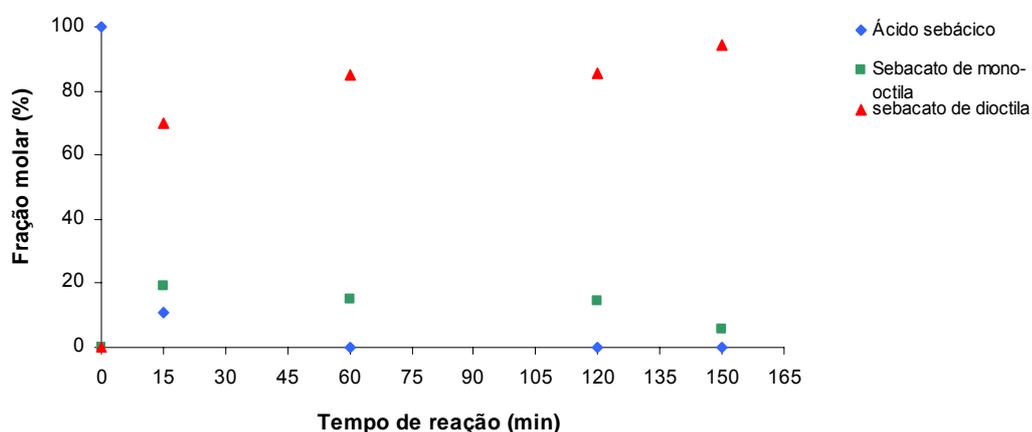
As conversões de ácido sebácico obtidas foram as seguintes: 99,7 %, com 50 mg de peneira; 100 %, com 100 mg de peneira; 99,8 %, com 250 mg de peneira; 99,7 %, com 500 mg de peneira. Assim, os resultados obtidos foram semelhantes para todas as condições testadas. Porém, quando observadas às frações molares ao longo das reações com as diversas adições de peneira, nota-se que a reação em que houve a adição de 50 mg de peneira molecular foi a reação que converteu o ácido em menor tempo. Aos 15 minutos de reação a conversão de ácido sebácico foi de 81% e seletividade para o diéster de 83%; para a adição de 100 mg de peneira os valores de conversão de ácido sebácico e seletividade para o diéster aos 15 minutos de reação foram de 72% e 42%, respectivamente; para a adição de 250 mg os valores foram de 94% de conversão porém a seletividade para o sebacato de dioctila foi de 43%; e para a adição de 500 mg os valores de conversão de ácido sebácico e de seletividade para o produto de interesse foram de 98% e 0,42%, respectivamente. O fato provavelmente ocorreu por conta de que, ao adicionar maiores quantidades de peneira, a camada mínima de água essencial para a atividade da enzima também foi retirada (KLIBANOV, 1997).

Como a reação que teve a adição de 50 mg de peneira molecular foi a que apresentou melhores resultados de seletividade para a lipase e conseqüentemente o maior rendimento do produto de interesse ao final da reação (após 150 minutos), esta foi escolhida como a melhor condição reacional quando utilizada a peneira molecular.

Com relação à fração molar de sebacato de dioctila, verificou-se o valor de 93% com a adição de 50 mg de peneira, enquanto que no reator fechado obteve-se 94%. As frações molares do sebacato de dioctila ao longo da reação com utilização de 50 mg de peneira molecular e da reação com reator fechado estão apresentadas na Figura 4.11.



(a) 50 mg de peneira molecular



(b) Reator fechado

Figura 4.11. Composição do meio reacional na reação de síntese do sebacato de dioctila a 100 °C, com razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5, com 5 % m/m de Novozym 435. (a) 50 mg de peneira molecular (b) Reator fechado.

A Figura 4.12 resume as condições testadas e permite concluir que não ocorreu um aumento na conversão do ácido sebácico, nem um aumento na velocidade de formação do éster de interesse a partir do emprego de reator aberto, vácuo ou adição de peneira molecular. Pelo contrário, de acordo com a Figura 4.12, pode-se observar que em reator fechado obteve-se a maior fração molar de ácido

sebácico em 15 minutos de reação.

Assim, de acordo com Zaks e colaboradores (1985), as metodologias usadas para retirada de água do meio reacional podem estar também contribuindo para a retirada da camada de água essencial para a ativação da enzima. Desta forma, a mesma torna-se menos ativa ao longo da reação, retardando a conversão do reagente em produto.

O estudo de Carlos Torres e Cristina Otero (2001) mostrou comportamento semelhante quando adicionadas quantidades de peneira molecular na reação de esterificação enzimática do ácido láctico. Nesse estudo, quanto maior a quantidade de peneira adicionada (acima de 200 mg), menor foi o rendimento de éster. O fato foi atribuído à afinidade da peneira molecular para adsorção de moléculas polares. Com a adsorção desse substrato, há menos moléculas de ácido láctico livres na mistura reacional.

Como o ácido sebácico tem caráter polar, também pode haver um impacto da interação do ácido com a peneira.

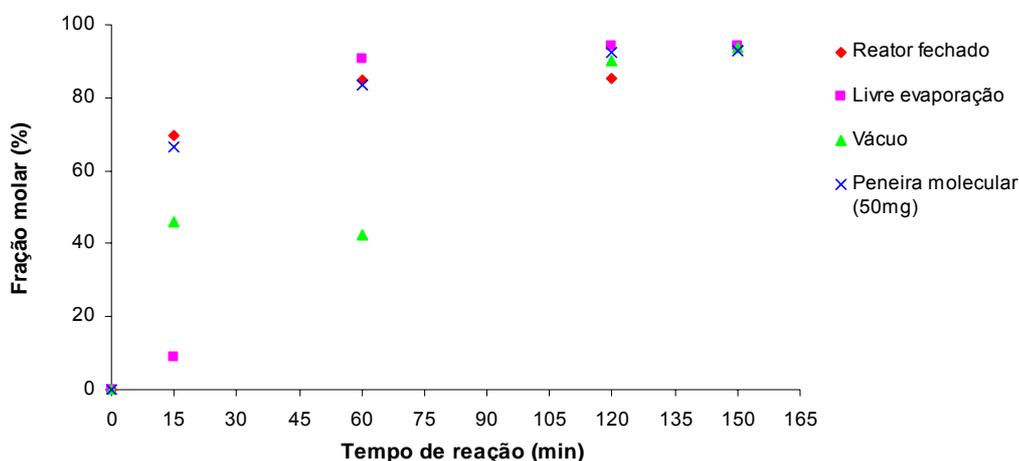


Figura 4.12. Fração molar de sebacato de dioctila obtida nas reações entre o ácido sebácico e 1-octanol a 100 °C, empregando razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5 e 5 % m/m de Novozym 435. Em reator fechado (◇), em reator aberto (livre evaporação) (□), empregando vácuo (△) e adicionando 50 mg de peneira molecular (x).

4.2.6. Reutilização de lipase

No estudo das reações de esterificação para obtenção de sebacato de dioctila testou-se também a reutilização da lipase Novozym 435, uma vez que esta lipase forneceu os melhores resultados de conversão e seletividade para o produto de interesse.

Procedeu-se com a reutilização da lipase após a mesma ter sido retirada da primeira reação, filtrada e lavada com 50 mL de 1-octanol, com o auxílio de uma bomba de vácuo. Após este procedimento, o biocatalisador foi mantido em dessecador durante o período de 24 h.

Apesar dos resultados com 5% m/m de lipase terem se mostrados mais vantajosos, a quantidade de enzima em 5% m/m é muito pequena dificultando a manipulação da lipase. Com isso, optou-se por utilizar a concentração de 7% m/m de lipase no meio reacional.

Foram testadas duas reutilizações dessa enzima, sempre procedendo a lavagem e secagem da mesma conforme exposto anteriormente. Os resultados podem ser visualizados na Figura 4.13.

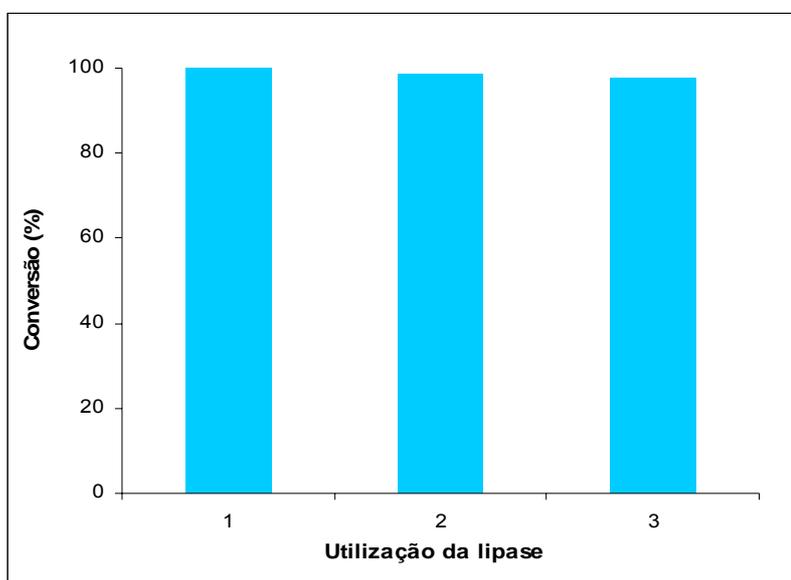


Figura 4.13. Conversão do ácido sebácico nas reações de síntese do sebacato de dioctila, sendo conduzidas a 100 °C, com razão molar de ácido sebácico/1-octanol de 1:5, com 7% m/m de Novozym 435, nas diversas utilizações da lipase.

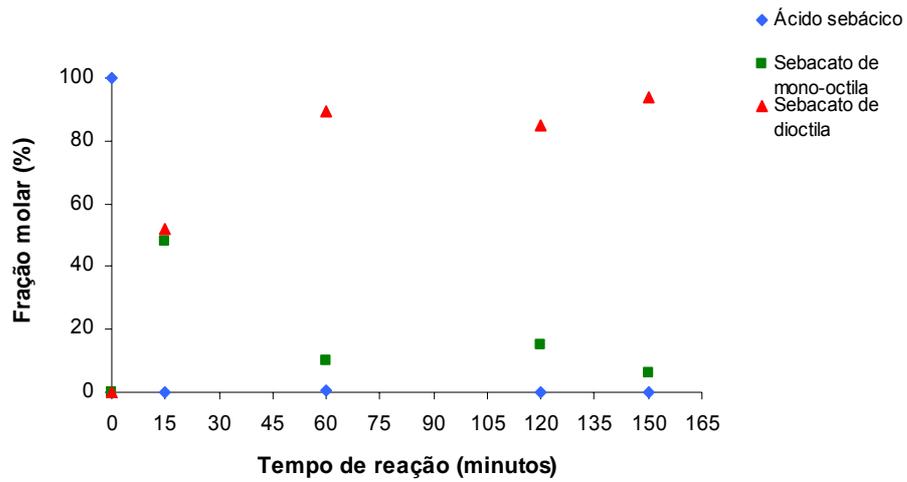
Na Figura 4.13 pode-se observar que foram obtidos valores de conversão de ácido sebácico semelhantes para as três reações. Na primeira reação, a conversão de ácido sebácico obtida foi de 100%, enquanto que após a primeira reutilização, a conversão foi de 98,4% e na segunda reutilização, a conversão foi de 97,8%.

Todavia, na primeira reutilização, a fração molar de sebacato de dioctila decaiu muito em relação à fração molar obtida no sistema inicial, onde foi obtido o valor de 63,4%. Já na segunda reutilização, o rendimento foi ainda menor, de 34,4% (Figura 4.14).

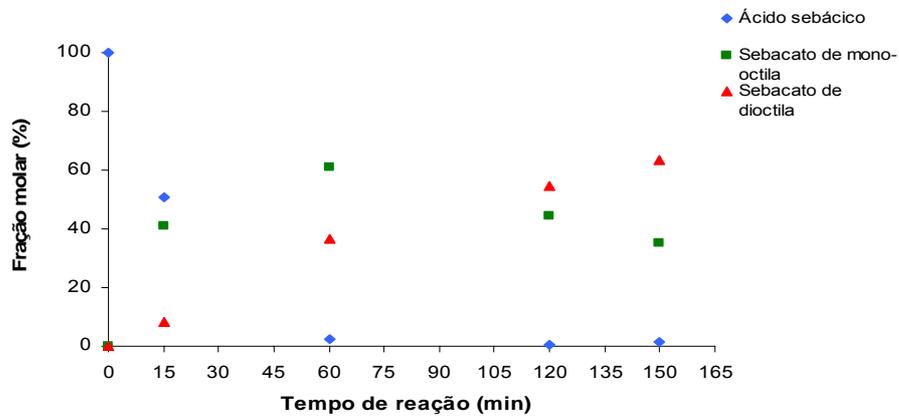
Nota-se grande declínio na fração molar de sebacato de dioctila ao longo da primeira e da segunda reutilização. Conforme aumentou o número de reutilizações da lipase, aumentou a seletividade para o sebacato de monoctila, diminuindo sua seletividade para o produto de interesse.

O resultado pode ser explicado por um acúmulo de produtos nos sítios ativos da enzima, alterando sua seletividade ao longo das reutilizações, pela desnaturação da enzima causada pela elevada temperatura, pela lavagem com o octanol, pela perda da quantidade mínima da água necessária para manter a conformação nativa, pela alteração da conformação estrutural da enzima causada pelas interações com os substratos e produtos do meio reacional ou até mesmo pela dessorção da lipase do suporte.

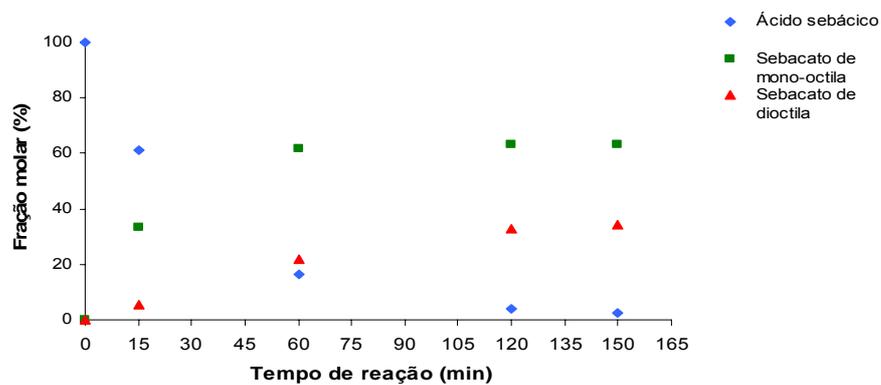
Ghamgui e colaboradores (2004) testaram a reutilização da lipase de *Rhizopus oryzae* na reação de esterificação entre ácido oleico e butanol para obtenção do 1-butil oleato. A partir da sexta reutilização, a conversão da reação caiu de 73,8% para 60% e a atividade da enzima decaiu. A redução da atividade enzimática foi atribuída à dessorção da lipase do suporte.



(a) Reação inicial



(b) Primeira reutilização



(c) Segunda reutilização

Figura 4.14. Composição do meio reacional da reação de síntese do sebacato de dioctila empregando razão molar de ácido sebácico/1-octanol de 1:5 e 7 % m/m de lipase Novozym 435, a 100 °C **(a)** Reação inicial **(b)** Primeira reutilização **(c)** Segunda reutilização.

4.2.7. Catálise química

As reações de síntese de sebacato de dioctila também foram realizadas empregando como catalisador o ácido sulfúrico.

As reações foram conduzidas nas mesmas condições empregadas na via enzimática: temperatura de 100°C, com razão molar ácido sebácico/1-octanol de 1:5, utilizando 7 % m/m de catalisador. Os resultados obtidos para esses dois catalisadores podem ser observados na Figura 4.15.

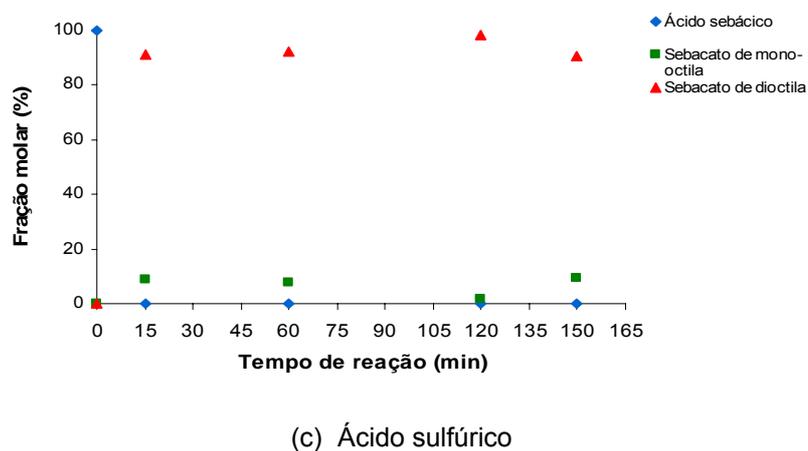
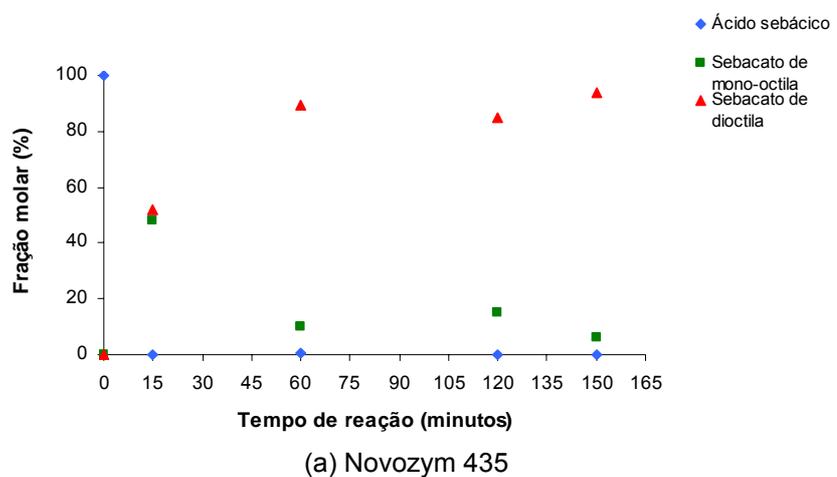


Figura 4.15. Composição do meio reacional da reação de síntese do sebacato de dioctila, a 100 °C, empregando razão molar de ácido sebácico/1-octanol de 1:5 e 7% m/m de catalisador. **(a)** Novozym 435 **(b)** Ácido sulfúrico.

Ambas as reações obtiveram uma conversão de ácido sebácico de 100 %. Comparando a seletividade do catalisador para o diéster de interesse, pode-se concluir de acordo com a Figura 4.15, que a reação catalisada com o catalisador químico obteve um valor de 90,7% de sebacato de dioctila ao final da reação, enquanto que a reação catalisada com o biocatalisador obteve um valor de 94,1%. No entanto, a reação com o ácido sulfúrico é mais rápida e o equilíbrio parece já ter sido alcançado após 15 minutos iniciais de reação, enquanto que, com o biocatalisador Novozym 435, o equilíbrio foi atingido apenas após 60 minutos de reação (Figura 4.15a).

Cabe ressaltar as vantagens da catálise enzimática frente aos catalisadores químicos: uma vez que as lipases imobilizadas são catalisadores heterogêneos, as mesmas podem ser retiradas do meio reacional facilmente e serem reutilizadas. O uso de biocatalisadores, ao invés do uso de catalisadores químicos convencionais (ácido sulfúrico, ácido clorídrico etc.), ainda evita a ocorrência de corrosão no sistema reacional (ALI *et. al.*, 2006). Além disso, diversas outras vantagens podem ser associadas ao uso de catalisadores enzimáticos, como poderem ser descartados sem pré-tratamentos (operações unitárias).

4.2.8. Caracterização do biolubrificante

A caracterização do biolubrificante produzido a partir da reação entre o ácido sebácico e 1-octanol, empregando razão molar de 1:5, a 100 °C, utilizando 5 % m/m do biocatalisador Novozym 435, foi feita através das seguintes metodologias:

- Viscosidade cinemática a 40 °C – ASTM D 445
- Viscosidade cinemática a 100 °C – ASTM D 445
- Índice de viscosidade – ASTM D 2270
- Ponto de fluidez – ASTM D 97
- Ponto de fulgor – ASTM D 92

- Índice de neutralização – ASTM D 974

Os resultados obtidos foram comparados com um óleo básico parafínico de origem mineral e com um óleo básico naftênico, também de origem mineral (ambos advindos do petróleo através de seus fracionamentos). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Resultados da caracterização do produto de reação entre ácido sebácico e 1-octanol (94,2% de sebacato de dioctila e 5,8% de sebacato de monoctila), comparado a um óleo básico mineral parafínico e a um óleo básico mineral naftênico.

Ensaio	Metodologia	Produto de reação (sebacato de dioctila e sebacato de mono-octila)	Óleo mineral parafínico (Spindle 09)	Óleo mineral naftênico (NH10)
Viscosidad e 100°C	ASTM D 445	2,000 cSt	2,741 cSt	2,365 cSt
Viscosidad e 40°C	ASTM D 445	7,370 cSt	10,68 cSt	9,805 cSt
Ponto de fluidez	ASTM D 97	- 63 °C	-9 °C	-51 °C
Ponto de fulgor	ASTM D 92	128 °C	184 °C	150 °C
Índice de acidez	ASTM D 974	8,64 mg KOH/g	0,01 mg KOH/g	0,01 mg KOH/g
Índice de viscosidad e	ASTM D 2270	39	95	30

Conforme observado na Tabela 4.3, o produto obtido tem o ponto de fluidez bem menor que o básico mineral parafínico, além de ser menor do que o óleo básico mineral naftênico também. Esta é uma vantagem do biolubrificante gerado, pois de acordo com a definição de ponto de fluidez descrita no Capítulo I deste trabalho, quanto menor o ponto de fluidez, melhor são as características do lubrificante em

temperaturas negativas.

Isto significa dizer que, mesmo em temperaturas de até -63 °C, o lubrificante escoará pelo sistema de lubrificação, podendo sair do cárter e chegar ao sistema de cilindros sem grandes problemas.

Já o resultado do ponto de fulgor encontra-se abaixo dos resultados obtidos para os dois básicos minerais. Isto não é considerado um problema, uma vez que, de acordo com a Norma Regulamentadora NR 20¹⁰, um produto só é considerado inflamável quando seu ponto de fulgor é abaixo de 70 °C. Ou seja, o produto contendo sebacato de dioctila pode ser manipulado e estocado sem a necessidade de cuidados especiais.

Com relação aos resultados obtidos para o índice de acidez, pode-se notar uma grande acidez presente no sebacato de dioctila produzido, que não está presente nos básicos minerais. Esta acidez é um inconveniente, pois se utilizado desta forma, o lubrificante poderá causar um processo de corrosão nas partes do motor. Logo, sugere-se que o biolubrificante passe por pelo menos uma das três possibilidades abaixo:

- a) O biolubrificante pode receber um tratamento com aditivos anti-corrosivos, de modo a inibir sua tendência a causar corrosão nos sistemas. Vale ressaltar que haverá um custo extra com a adição de aditivos;
- b) O biolubrificante pode passar por um processo de neutralização, o que também significa dizer que haverá custos adicionais envolvidos. Um processo usualmente empregado em indústrias de re-refino de lubrificantes é uma lavagem do produto em um leito contendo óxido de cálcio;
- c) O biolubrificante pode ser utilizado juntamente com um lubrificante de base mineral, perdendo assim, seu potencial corrosivo, sem custos

¹⁰ Do site <http://www.mte.gov.br>. Acessado em 26/12/2011, às 21:30h.

adicionais.

Já o índice de viscosidade mostra um valor próximo ao encontrado no óleo naftênico, sendo bem abaixo do resultado obtido no básico parafínico. Esta propriedade também está um pouco inferior no biolubrificante quando comparada ao óleo básico mineral parafínico. Entretanto, atende à utilização em aplicações onde normalmente emprega-se o óleo mineral naftênico.

Para uma melhor compreensão sobre a diferença entre óleos naftênicos e parafínicos, pode-se observar a Tabela 4.4, onde estão dispostos os resultados de alguns ensaios comparativos.

Tabela 4.4. Resultados comparativos de ensaios de caracterização de básicos minerais parafínicos e básicos minerais naftênicos.

Ensaio	Metodologia	Óleo parafínico	Óleo naftênico
Densidade	ASTM D 4052	0,8517	0,8914
Índice de viscosidade	ASTM D 2270	95	30
Ponto de anilina	ASTM D 611	90	60,3

Os óleos básicos minerais naftênicos geralmente são escolhidos para a fabricação de produtos lubrificantes solúveis, os quais têm como aditivação os agentes emulsificantes, que possuem em sua estrutura uma parte polar e outra apolar, fazendo com que a formação de uma emulsão seja possível ao adicionar óleo à água. Estes lubrificantes solúveis são usualmente empregados em indústrias de usinagem.

Pela Tabela 4.4 entende-se o porquê desta escolha. Como a densidade do básico mineral naftênico é superior ao do básico mineral parafínico, a diferença de densidade entre o óleo naftênico e a água é menor. Com isso, a estabilidade da emulsão é mais dificilmente afetada quando sujeita às forças de corte, garantindo que não haverá separação da emulsão, deixando as peças de corte desprotegidas.

Já o índice de viscosidade mais baixo dos óleos naftênicos significa que estes sofrerão uma queda de viscosidade mais brusca quando houver um aumento

de temperatura, conforme explicado no Capítulo I. Isto faz com que estes óleos sejam mais interessantes para aplicações de usinagem, pois se mostram mais eficazes nas transferências de calor.

Com relação ao ponto de anilina, quanto mais baixo for este valor, maior a aromaticidade (e polaridade) do óleo. Como o óleo mineral naftênico possui o ponto de anilina em torno de 30 °C mais baixo que o óleo mineral parafínico, pode-se dizer que o naftênico possui maior caráter polar, sendo mais indicado para usos em emulsões.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1. Conclusões

No presente trabalho foi estudada a síntese de sebacato de dioctila a partir de reações de esterificação utilizando lipases comerciais imobilizadas, bem como o efeito de diversas variáveis de processo.

Este trabalho permitiu avaliar a influência do tipo de lipase, da razão molar ácido:álcool, da concentração de lipase no meio reacional, da temperatura, do tipo de catalisador (enzimático e químico), da forma de eliminação da água do meio reacional, da possibilidade de reutilização da enzima, além da caracterização do produto de interesse, podendo concluir que:

- a) O uso da lipase Novozym 435 forneceu os melhores resultados, tanto no que diz respeito à conversão do reagente, quanto no rendimento em sebacato de dioctila, quando comparadas às outras lipases testadas (Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM);
- b) A melhor condição para obtenção do produto de interesse quando utilizada a lipase Novozym 435 foi: razão molar ácido:álcool de 1:5, com 5 % m/m de lipase, a 100 °C;
- c) A reação empregando Novozym 435 obteve valores de conversão de ácido sebácico similares aos obtidos empregando ácido sulfúrico, e maior seletividade em sebacato de dioctila, do que a observada para a reação com catalisador químico conduzida nas mesmas condições experimentais;
- d) Apesar dos valores de conversão terem se mostrado iguais quando utilizado biocatalisador e catalisador ácido, o uso do catalisador químico propicia uma formação do produto de interesse mais rápida;
- e) As metodologias empregadas para retirada de água do meio reacional não obtiveram sucesso para formação do produto de interesse,

retardando o aparecimento do mesmo;

- f) A reutilização da lipase Novozym 435 não foi eficaz, visto que mesmo apesar de continuar apresentando converções satisfatórias, a seletividade para o produto de interesse decaiu bastante durante as reutilizações;
- g) A lipase Novozym 435 pode ser utilizada para a reação de obtenção de sebacato de dioctila em substituição ao catalisador químico convencional ácido sulfúrico.
- h) Os testes de caracterização do produto obtido mostram que o produto pode ser utilizado como lubrificante puro (com a adição de aditivos) ou mesmo adicionado a outros óleos básicos de origem mineral.

5.2. Sugestões para futuros trabalhos

Baseado nos resultados obtidos no presente estudo, novas metas podem ser delineadas:

- a) Estudar a reutilização da lipase, verificando algumas propriedades após seu uso, como estrutura morfológica, quantidade de água, quantidade de proteína no meio reacional (para verificar se ocorre desorção da lipase do suporte) etc.;
- b) Avaliação da adição escalonada do álcool, visto que a literatura cita valores de conversão variados dependendo da forma com que o álcool é adicionado ao meio reacional;
- c) Aprimoramento das características físico-químicas do sebacato de dioctila, de modo a melhorar seu desempenho quando utilizado como único óleo lubrificante.
- d) Caracterização de um lubrificante semi-sintético, utilizando o sebacato de dioctila misturado com frações de um óleo básico mineral.
- e) Remoção do ácido presente no produto obtido.
- f) Tentativa de conversão do mono-éster em di-éster para diminuir o índice

de acidez do produto de reação.

g) Utilização de sistema contínuo na síntese do sebacato de dioctila.

h) Utilização de uma lipase de laboratório.

REFERÊNCIAS

BON, Elba P. S.; FERRARA, Maria A.; CORVO, Maria L. *Enzimas em biotecnologia* – Produção, Aplicações e Mercado, Interciência, 2008.

CONN, Eric; STUMPF. *Introdução à Bioquímica*. São Paulo: Edgard Burcher, 1980.

MORRISON, R.; BOYD, R. 4. ed., Fundação Calouste Gulbenkian, 1983.

McMURRY, John. *Química Orgânica 2*. Volume 2. São Paulo: Pioneira Thomson Learning. 2005.

ÍNDICE Merck, EUA. Merck & CO. 1976

RUNGE, Peter; DUARTE, Gilson. *Lubrificantes na Indústria*. São Paulo: Triboconcept. ,1989.

AKERMAN, Cecilia Orellana et. al. Biolubricants synthesis using immobilized lipase: Process optimization of trimethylolpropane oleate production. Sweden. *Process Biochemistry* v.46, p.2225-2231, 2011.

ALI, Sami H. et al. Synthesis of esters: Development of the rate expression for the Dowex 50 W x 8-400 catalyzed esterification of propionic acid with 1-propanol. Kuwait. 2007. *Chemical engineering science* v. 62, p.3197-3217, 2007.

AYRES-BARROS, Maria R. Biocatálise em solventes orgânicos. *B.Biotecnol.* Lisboa, n.72, p. 2-13, 2002.

CARVALHO, Patricia O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. Bragança Paulista. 2002. *Química Nova*, vol. 26, n.1, p.75-80, 2003.

CARVALHO, Walter et al. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. 2006. *Revista Analytica*, n. 23, p.60-70, 2006.

CRESPO, Janaina et al. The use of lipases immobilized on poly(ethylene oxide) for the preparation of alkyl esters. Santa Catarina. 2004. *Process Biochemistry* v.40 p. 401-409, 2005.

DALLA-VECCHIA, Roberto et al. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. Itajaí. 2004. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p.623-63, 2004.

DÖRMÖ, N. et al. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. Oberhausen. Alemanha. 2004.

Biochemical Engineering Journal. v. 21, p. 229-334, 2004.

DUAN, Zhang-Qun et al. Novozym 435 1,3-diacylglycerol preparation via esterification in t-butanol system. Beijing. China. 2009. Process Biochemistry. (2010) 10.1016/j.procbio.2010.03.007.

GHAMGUI, Hanen et al. 1-Butyl synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. Tunisia. Enzyme and Microbial Technology v.35, p.355-363, 2004.

GOMES, Fabricio M. et al. Avaliação das condições reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila empregando lipase *Candida rugosa*. Lorena. 2004. Rev. Bras. Cienc. Farm. v. 40, n.2. , 2004.

GOMES, Fabricio M. et al. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. São Paulo. Química Nova, v.29, n. 4, p. 710-718, 2006.

GRYGLEWICZ, Stanislaw. Enzyme catalysed synthesis of some adipic esters. Wroclaw. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic v.15, p.9-13, 2001.

GRYGLEWICZ, Stanislaw. Lipase catalysed synthesis of sebáico and phthalic esters. Wroclaw. Enzyme and microbial technology v. 33, p. 952-957, 2001.

GRYGLEWICZ, Stanislaw. et al. Esters of dicarboxylic acids as additives for lubricating oils. Wroclaw. Tribology International v.39, p. 560-564, 2006.

HALLING, Peter J. et al. Inactivation of enzymes at the aqueous-organic interface. Glasgow. Stability and stabilization of biocatalysts. p. 365-372, 2006.

IYER, Padma V.; ANANTHANARAYAN, Laxmi. Enzyme stability and stabilization – Aqueous and non-aqueous environment. Mumbai. Process Biochemistry. 43, (2008) 1019-1032.

KLIBANOV, Alexander M. Improving enzymes by using them in organic solvents. Massachusetts. Nature, Vol. 409 (2001) 241-246.

KLIBANOV, Alexander M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? Massachusetts. Tibtech, Vol. 15 (1997) 97-101.]

KRAAI, G. N. et al. Kinetic studies on the *Rhizomucor miehei* lipase catalyzed esterification reatem of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system. Netherlands. Biochemical Engineering Journal 41 (2008) 87-94.

LEE, Moo-Yeal; DORDICK, Jonathan. Enzyme activation for nonaqueous media. New York. Current opinion in biotechnology 13 (2002) 376-384.

LIMA, Antônio W.; ANGNES, Lucio. *Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica*. São Paulo. Química Nova, Vol. 22, No 2 (1999).

LINKO, Yu-Yen et al. Biodegradable products by lipase biocatalysis. Raisio. Journal of biotechnology 66 (1998) 41-50.

LINKO, Yu-Yen et al. Lipase-catalyzed synthesis of its derivatives with 1,4-butanediol. Espoo. Finlândia. Journal of Biotechnology. 40 (1995) 133-138.

LORTIE, Robert. Enzyme catalyzed esterification. Montreal. Biotechnology Advances. 15 (1997) 1-15.

OLIVEIRA, Pedro C. et al. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. Lorena. Química Nova, Vol. 23, No 5, 2000, 632-636.

QUINCHIA, L. A. et al. Viscosity modification of high-oleic sunflower oil with polymeric additives for the design of new biolubricant formulations. Huelva. Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 2060-2065.

REETZ, Manfred T. Lipases as practical biocatalysts. Kaiser. Current opinion in chemical biology, 6 (2002) 145-150.

REETZ, Manfred T.; JAEGER, Karl-Erich. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas lipases*. Germany. Chemistry and Physics of Lipids 93 (1998) 3-14.

RODRIGUES, Rafael C. Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual [dissertação]. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Curso de Engenharia Química. Departamento de Engenharia Química; 2009.

SALIH, Nadia; SALIMON, Jumat; YOUSIF, Emad. The physicochemical and tribological properties of oleic acid based trimeric biolubricants. Baghdad. Industrial Crops and Products 34 (2011) 1089-1096.

SERDAKOWSKI, Anne L.; DORDICK, Jonathan S. Enzyme activation for organic solvents made easy. New York. 2007.

TORRES, Carlos; OTERO, Cristina. Part III. Direct enzymatic esterification of lactic acid with fatty acids. Madrid. *Enzyme and microbial technology* 29 (2001) 3-12.

TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida Antarctica* lipase. Bahía Blanca. *Enzyme and microbial technology* 40 (2007) 716-722.

VILLENEUVE, Pierre et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. Montpellier. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic* 9 (2000) 113-148.

WU, Jin-Chuan et al. Esterification reactions catalysed by surfactant-coated *Candida rugosa* lipase in organic solvents. Tianjin. *Process Biochemistry* 37 (2002) 1229-1233.

YANG, Lu et al. Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. New York. *Biophysical journal*, Vol. 87 (2004) 812-821.

ZAKS, Aleksey; KLIBANOV, Alexander M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. Massachusetts. *The journal of biological chemistry*, Vol. 263, No 7 (1988) 3194-3201.

ZAKS, Aleksey; KLIBANOV, Alexander M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. Massachusetts. *Biochemistry*, Vol. 82 (1985) 3192-3196.

ZAKS, Aleksey; KLIBANOV, Alexander M. The effect of water on enzyme action in organic media. Massachusetts. *The journal of biological chemistry*, Vol. 263, No 17 (1988) 8017-8021.

ANEXO I – ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Neste anexo serão apresentados os cromatogramas obtidos conforme metodologia descrita no ítem 3.7.

Os cromatogramas obtidos para as reações do ácido sebácico com 1-octanol (reação utilizando 0,02 mol de ácido, 0,120 mol de 1-octanol e 5 % m/m de lipase Novozym 435, na temperatura de 100 °C) são apresentados a seguir, nos pontos 0 (Figura A) e 150 minutos (Figura B).

De acordo com os cromatogramas dos seguintes produtos puros: ácido sebácico (Figura C), bis(2-etilhexil) sebacato (Figura D), e comparando seus tempos de retenção com os tempos de retenção dos picos obtidos nos cromatogramas da reação de esterificação, os pontos foram identificados como se segue:

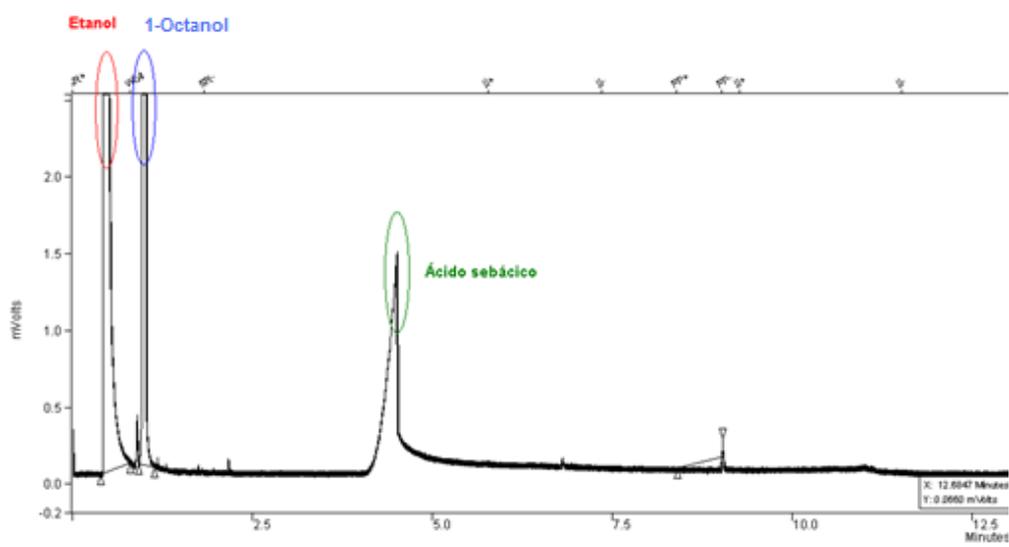


Figura A. Cromatograma da reação de esterificação do ácido sebácico com 1-octanol no tempo 0 min, a 100 °C, utilizado 5 % m/m de Novozym 435, razão molar ácido/álcool de 1:5.

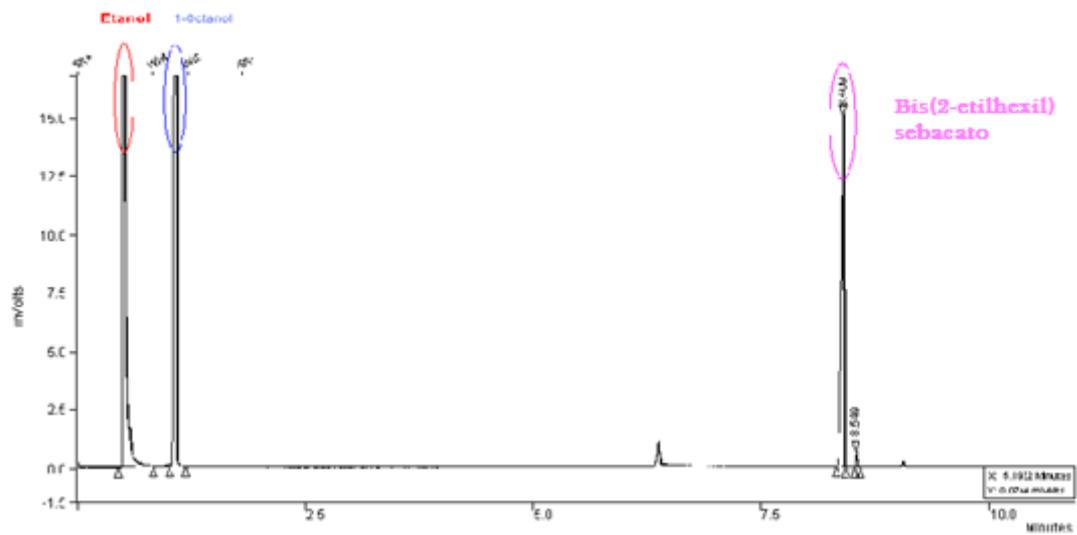


Figura B. Cromatograma da reação de esterificação do ácido sebácico com 1-octanol no tempo 150 min, a 100 °C, utilizado 5 % m/m de Novozym 435, razão molar ácido/álcool de 1:5.

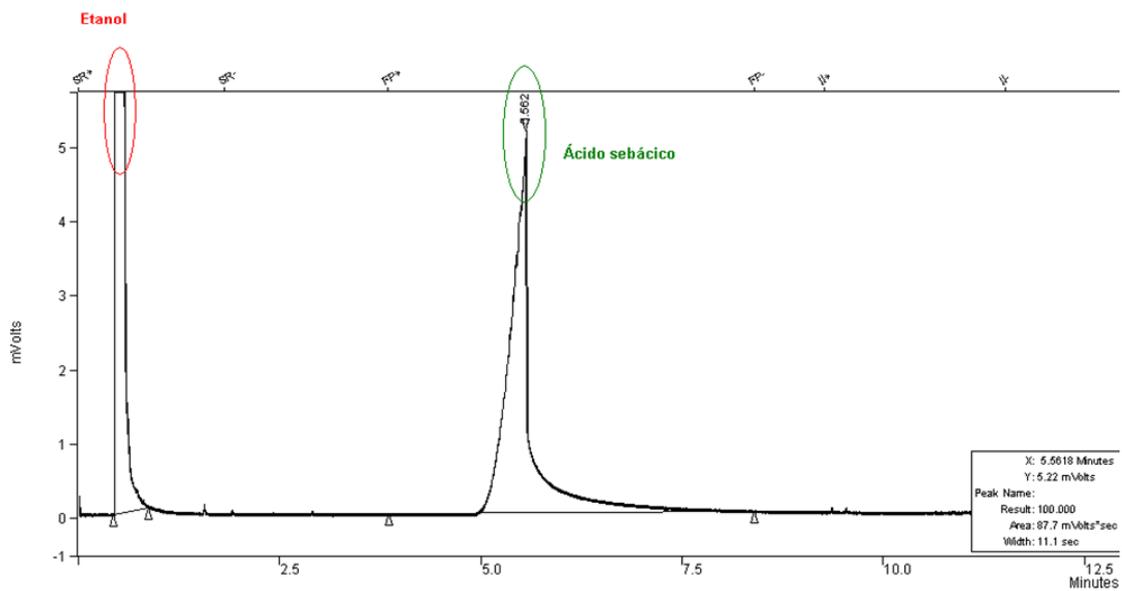


Figura C. Cromatograma padrão para o ácido sebácico.

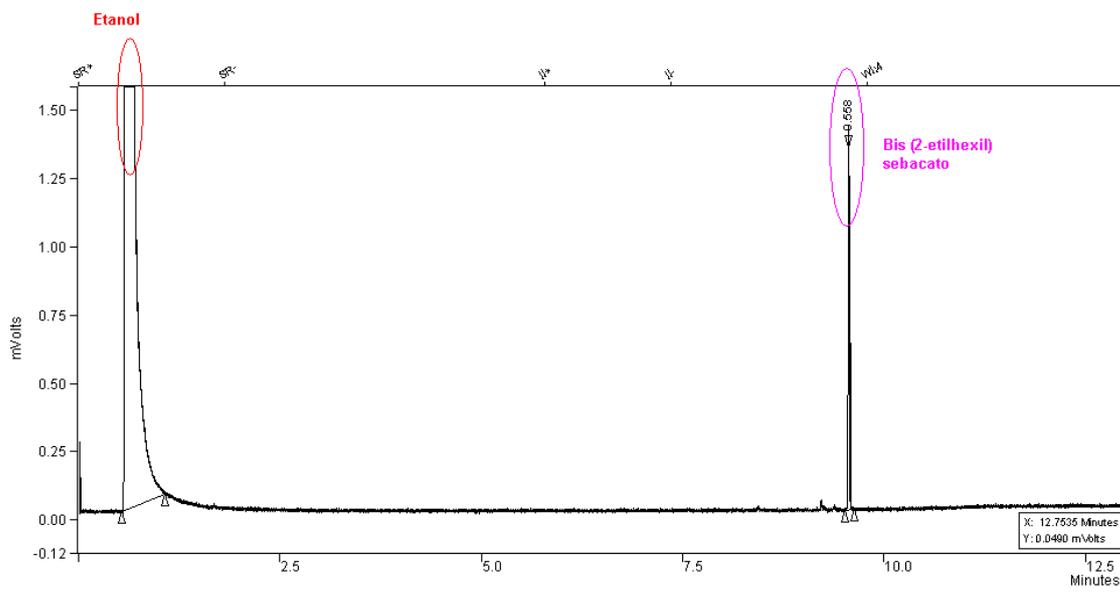


Figura D. Cromatograma padrão para o bis (2-etilhexil) sebacato