

PRODUÇÃO DE MENTIL ACETATO VIA ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

Production of Mentyl Acetate by Enzymatic esterification in
solvente-free system

CHIARADIA, V.
DETOFOL, M.
CANSIAN, R. L.
DALLAGO, R. M.
OLIVEIRA, D.
PAROUL, N.

Recebimento: 12/08/2011 - Aceite: 11/10/2011

RESUMO: Este trabalho apresenta resultados de estudos de otimização de produção de mentil acetato em sistema livre de solvente orgânico através da esterificação enzimática usando (\pm) mentol e anidrido acético como agente acilante e lipase comercial Novozym 435 como catalisador. A melhor conversão (49,7%) na produção de mentil acetato foi determinada a 60°C, razão molar de 5:1 (anidrido acético:mentol), concentração de enzima 10% (m/m substrato), 150rpm, em 6 horas de reação. O estudo do efeito da razão molar mentol:anidrido acético na cinética da produção enzimática de mentil acetato demonstrou que conversões acima de 45% podem ser obtidas usando razão molar 1:1, temperatura 50°C, concentração de enzima 5,5% (m/m substrato), agitação de 150rpm, em 6 horas de reação. Os dados experimentais para a produção de mentil acetato relatados neste trabalho mostram uma perspectiva promissora de uso de tecnologias limpas e possível substituição de síntese de ésteres catalisados por ácidos na produção de aromatizantes.

Palavras-chave: Esterificação. Mentol. Anidrido acético. Mentil acetato. Novozyme 435.

ABSTRACT: This This work reports the optimization of menthyl acetate production by esterification of (\pm) menthol and acetic anhydride as acylating agent in a solvent-free system using a commercial lipase Novozym 435 as

catalyst. The operating conditions that optimized menthyl acetate production were determined to be 60°C, menthol to acetic acid molar ratio of 5:1, 150rpm and 10wt% of enzyme, with a resulting reaction conversion of about 49,7%. After determining the optimum reaction parameters, a kinetic study was carried out evaluating the influence of substrates molar ratio. Results obtained in this step allowed the conclusion that relatively low enzyme concentration (5.5 wt%), temperature of 50°C and substrates molar ratio of 1:1 afforded reaction conversion after 6h. of reaction. New experimental data on enzymatic esterification of (\pm) menthol and anhydride acetic for menthyl acetate production are reported in this work, showing a promising perspective of the technique to overcome the well-known drawbacks of the chemical-catalyzed route.

Keywords: Esterification. Menthol. Acetic anhydride. Menthyl acetate. No-vozym 435.

Introdução

A produção de ésteres naturais por vias biotecnológicas vem sendo objeto de estudo intenso nos últimos anos, devido ao fato de que o mercado de aromas, no mundo, está em expansão e, provavelmente, a demanda por produtos “naturais” deverá continuar nos próximos anos.

Na indústria química, os aromatizantes e flavorizantes são sintetizados pelos processos de esterificação ou transesterificação, usando como catalisadores ácidos minerais fortes (ATHAWALE; MANJREKAR, 2000) que, geralmente, levam à formação de subprodutos indesejáveis, além de produzirem ésteres opticamente inativos (racematos) e gerarem alto consumo de energia. A fim de superar os inconvenientes relatados no uso destes catalisadores, e para tornar o processo ambientalmente favorável, estuda-se então o uso de lipase como catalisador.

Lipases são catalisadores altamente estereosseletivos, de grande valor para a indústria química moderna e indústrias farmacêuticas. Muitos artigos científicos (GANDHI, 1997; BASAK et al., 2000; WANG et al., 2002;

KOBAYASHI et al., 2004) falam sobre as aplicações bioquímicas e biotecnológicas de lipases, revelando oportunidades únicas para a resolução de misturas racêmicas de compostos orgânicos.

O mentol natural é extraído de várias espécies de menta. Também conhecido como 5-metil-2-isopropilciclo-hexanol, é um álcool secundário terpênico e tem oito isômeros opticamente ativos com características organolépticas e propriedades biológicas diferentes. O (-)-mentol apresenta sabor característico de menta e, em função de seu sabor refrescante, vem sendo amplamente utilizado em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (SHIMADA et al., 1999).

A esterificação de (\pm) mentol usando enzimas enantiosseletivas é um método altamente eficaz para a resolução racêmica do reagente de partida, que apresenta uma mistura equimolar de (+) - e (-)-mentol. Atualmente, existe uma maior demanda por enantiômeros opticamente puros usados como blocos de construção para farmacêuticos e agroquímicos (KAMIYA et al., 1995).

A revisão bibliográfica forneceu dados interessantes quanto ao estado da arte da

temática considerada, tanto na academia quanto no setor industrial, dando indícios de um grande potencial para o desenvolvimento sustentável e sem danos ao meio ambiente.

Neste contexto, o presente artigo busca otimizar as condições operacionais que possam conduzir as boas conversões das reações de produção enzimática de mentil acetato, com a utilização da lipase de *Candida antarctica* na resolução da esterificação de (\pm) - mentol para a formação de bioaromas. Foi desenvolvido, assim, um processo biotecnológico em sistema livre de solvente orgânico, avaliando o efeito das variáveis do processo (razão molar, concentração de enzima e temperatura), empregando técnicas de planejamento experimental.

Experimental

Materiais

Para as reações de esterificação foram usados mentol (SIGMA-ALDRICH, 97% pureza), anidrido acético (Vetec, 97% pureza) e peneira molecular (4Å Sigma-Aldrich). Utilizou-se a lipase comercial *Candida antarctica* (Novozym 435) da Novozymes Brazil (Araucária, PR, Brazil).

Esterificação enzimática do (\pm) mentol

A reação de esterificação enzimática foi realizada em erlenmeyers onde a mistura reacional foi mantida sob agitação e temperatura controlada em agitador orbital (Shaker Marconi). O tempo de reação e agitação do sistema foram fixados, respectivamente, em 6 horas e 150rpm, conforme definido no planejamento de experimentos. A mistura reacional foi preparada com mentol e anidrido acético nas razões (1:1, 1:3 e 1:5) e enzima (1; 5,5 e 10% m/m).

Determinação da conversão da reação

A quantificação dos ésteres foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de sílica fundida INOWAX (30m x 250 μ m i.d.), 0,25 μ m de espessura de filme, detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40-180°C (3°C/min), 180-230°C (20°C/min), 230°C (20min), temperatura do injetor 250°C, detector a 275°C, modo de injeção split, razão de split 1:100, gás de arraste H₂ (56KPa), volume injetado 0,4 μ L de amostra diluída em n-hexano (1:10). A determinação da conversão das reações foi feita acompanhando a redução da área do sinal do agente limitante e apresentada como conversão no produto mentil acetato.

Otimização da produção de mentil acetato

Foi realizado um planejamento fatorial completo 2³ com triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos (Tabela 1).

Tabela 1 - Variáveis e níveis estudados no primeiro planejamento fatorial completo 2³ para produção enzimática de ésteres de mentol

Variáveis/ Níveis	Temperatura (°C)	Razão Molar (mol/mol) (anidrido/ mentol)	Concentração de enzima (% m/m substrato)
-1	40	1:1	1
0	50	3:1	5,5
1	60	5:1	10

Estudo cinético da produção enzimática de mentil acetato

Após otimizar as condições experimentais das variáveis estudadas no processo enzimático, os efeitos da razão molar (RM) na cinética da reação foram avaliados para cada sistema reacional.

Alíquotas foram retiradas do meio reacional nos tempos 0,5 até 24 horas.

Resultados e Discussão

Para avaliar os efeitos das variáveis no processo de esterificação, um planejamento experimental fatorial completo 2³ foi realizado. As variáveis independentes estudadas foram temperatura, concentração de enzima e razão molar (anidrido:mentol). A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as conversões em mentil acetato.

A partir desta tabela pode ser observado que maiores taxas de conversão (49,5% e 49,7%) foram obtidas com altas concentrações de enzima e excesso de anidrido acético. Os resultados de conversão apresentados na Tabela II foram tratados estatisticamente. Os efeitos estimados estão apresentados na forma de Gráfico de Pareto (Figura 1).

Tabela 2 - Matriz do primeiro planejamento experimental completo com as respostas em termos de conversão em mentil acetato.

Ensaio	T (°C)	RM anidrido/mentol	[E] (%) (m/m)	Conversão (%)
1	-1 (40)	-1 (1:1)	-1 (1)	33,21
2	1 (60)	-1 (1:1)	-1 (1)	29,24
3	-1 (40)	1 (5:1)	-1 (1)	41,46
4	1 (60)	1 (5:1)	-1 (1)	47,05
5	-1 (40)	-1 (1:1)	1 (10)	32,28
6	1 (60)	-1 (1:1)	1 (10)	27,01
7	-1 (40)	1 (5:1)	1 (10)	49,48
8	1 (60)	1 (5:1)	1 (10)	49,68
9	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,5)	44,59
10	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,5)	40,01
11	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,5)	42,33

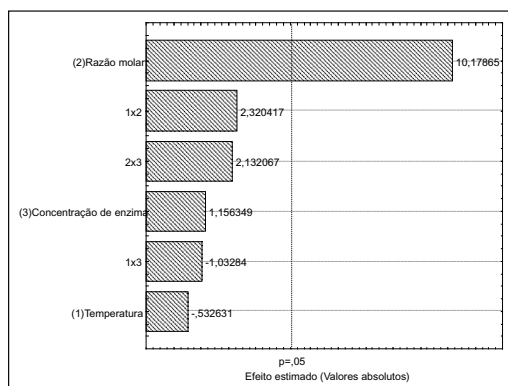


Figura 1- Gráfico de Pareto da produção de mentil acetato (6 horas de reação).

Observou-se que em 6 horas da reação somente a razão molar teve o efeito significativo positivo ($p < 0,05$) na conversão (Figura 1).

Dados estatísticos permitiram a obtenção de um modelo empírico codificado para produção de mentil acetato na faixa investigada em função das variáveis avaliadas, o qual está apresentado na Equação 1.

$$\text{Conversão mentil acetato CMA (\%)} = 39,67 - 0,43 * T + 8,24 * RM + 0,94 * E + 1,87 * T * RM - 0,84 * T * E + 1,73 * RM * E$$

Análise estatística de variância (Tabela 3) demonstrou que o coeficiente de correlação R obtido foi de 0,94 e o F calculado (9,82) foi maior que o valor tabelado (6,16), validando estatisticamente um modelo empírico ($p < 0,05$) permitindo a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 2.

O modelo permitiu a construção das superfícies de resposta para conversão de mentil acetato em sistema livre de solvente orgânico através da reação enzimática com a lipase Novozym 435, apresentadas na Figura 2.

Tabela 3 - Análise de variância para produção de mentil acetato.

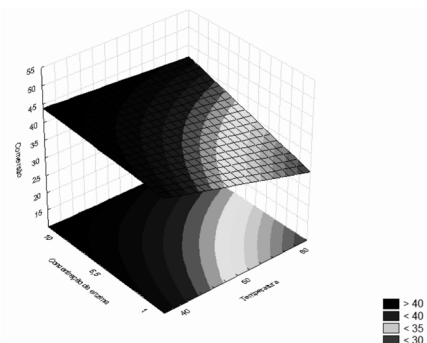
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	609,52	6	101,59	9,82
Residual	41,39	4	10,35	
Falta de Ajuste	30,90	2		
Erro Puro	10,49	2		
Total	650,91	10		

R=0,94; F_{0,05;6,4} = 6,16

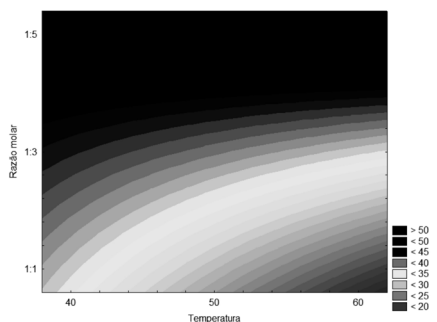
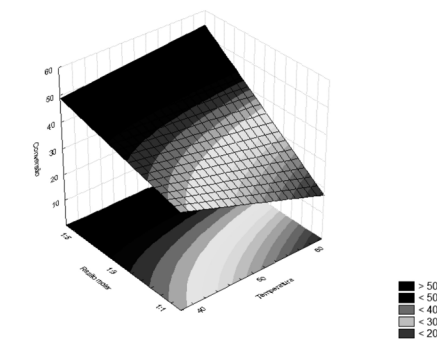
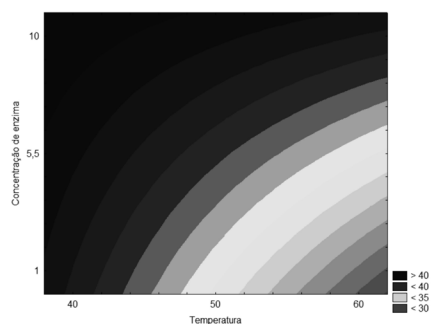
Kobayashi et al. (2004) estudaram a síntese de L-Mentil ésteres de ácidos graxos poliinsaturados em sistemas livres de solvente orgânico usando lipases produzidas a partir de *Candida rugosa* (Lipase-AY, Amano Enzyme Inc. e Aichi) como biocatalisadores e L-Mentol, ácidos eicosanopentenóico, linolênico e α -linoléico como substratos. Maiores conversões foram obtidas à temperatura de 30°C, razão molar 1,2:1 mol/mol, atividade de água de 20% e concentração de enzima de 1600U/g. O equilíbrio da reação foi alcançado após 3 dias de reação com 75% de rendimento para L-Mentil eicosapentenoato usando Lipase-AY. Outros dois ácidos também foram testados nas mesmas condições reacionais. Entretanto os rendimentos das reações foram inferiores, alcançando 54% para L-Mentil linoleniato e 41% para L-Mentil α -linolenato, após 4 dias de reação.

Como pode ser observado na Figura 2 tanto a temperatura como a concentração de enzima não tiveram efeito na produção de mentil acetato (a) e (b), o aumento da temperatura não influenciou significativamente na produção, mas a razão molar teve efeito positivo na taxa de conversão (Fig. 2 (b) e (c)).

(a)



(b)



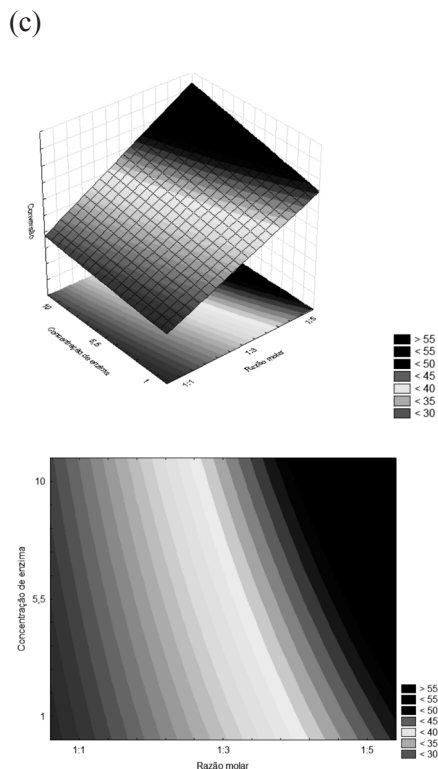


Figura 2 - Superfícies de resposta para produção de mentil acetato em função da concentração de enzima e temperatura (a), em função da temperatura e razão molar (b), em função da concentração de enzima e razão molar(c).

A partir dos resultados obtidos na condução do planejamento experimental foi realizado um estudo cinético, visando a verificar a influência da razão molar anidrido:mentol na produção de mentil acetato. Os experimentos para o estudo do efeito da razão molar anidrido:mentolacético foram realizados fixando a temperatura em 50°C, concentração de enzima em 5,5% (m/m substrato) e agitação em 150rpm. A Figura 3 apresenta as curvas de conversão obtidas em função do tempo, variando a razão molar anidrido acético:mentol em 1:1, 3:1, 5:1, 7:1. As taxas iniciais obtidas (5,67; 4,57; 3,48 e 2,06 min⁻¹, respectivamente) demonstraram que o aumento da concentração de anidrido acético no meio reacional diminui a taxa inicial de reação, desfavorecendo a formação dos produtos (Figura 3).

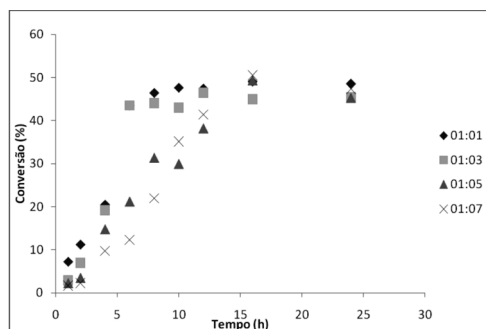


Figura 3. Efeito da razão molar sobre a conversão em mentil acetato à temperatura 60°C, concentração de enzima de 5,5% (m/m substratos) e agitação 150rpm.

Babali et al. (2000) realizou a esterificação de (-)-mentol e (±)-mentol com ácido láurico em isoctano. A reação foi catalisada com sucesso por um surfactante comercial não-iônico (monoestearato de sorbitano) revestido a partir da lipase de *Candida rugosa* (Lipase AY “Amano” 30) na proporção molar de 1:1 e em 35°C usando 1,5g de enzima e 0.1g de peneiras moleculares. Após 1h, a conversão molar de (-)-mentol atingiu 81%. O equilíbrio foi alcançado após 4h, dando ao (-)-mentol conversão molar de 94%. Nas mesmas condições, a mesma lipase não revestida catalisou a esterificação de (-)-mentol e ácido láurico para produzir uma conversão molar de 93% após 72h. O revestimento da lipase com monoestearato de sorbitano aumentou as taxas de esterificação para (-)-mentol e (±)-mentol com ácido láurico. Após 6h, as conversões de (-)-mentol e (±)-mentol foram 94 e 62%, respectivamente.

Esterificação enantiosseletiva do (±)-mentol foi realizada por Yuan, Bay e Sun (2006), utilizando lipase de *Candida rugosa* (CRL) em líquidos iônicos (1-butil-3-metil-imidazólio hexafluorofosfato ([BMIM][PF₆]) e 1-butil-3-metil-imidazólio tetrafluoroborato) e solventes orgânicos de hidrofobicidades diferentes. Anidrido propiônico foi empregado como um agente acilante. Como a enzima apresentou maior rendimento de conversão (40,2% e 41%) e enantioseletividade (ee_p(%) 84,5 e 76,5) em [BMIM] [PF₆] e hexano

respectivamente em uma reação de 24 h, o trabalho foi focado utilizando esses dois solventes em meios reacionais.

Cabe salientar que esta etapa de trabalho não teve como objetivo a realização de estudos completos sobre a capacidade da Novozym 435 conduzir a resolução enantiomérica de (\pm)-mentol em síntese de mentil acetato sugerindo desta forma, a continuidade de pesquisa focada para este problema. Tendo como base estes aspectos, os resultados obtidos neste trabalho, em confronto aos apresentados na literatura, podem ser considerados promissores.

Conclusões

O presente trabalho permitiu avaliar a influência da razão molar álcool:anidrido

acético, concentração de enzima e temperatura na conversão do processo, podendo-se concluir que:

- a melhor condição para produção de mentil acetato (49,7% em 6 horas) foi de 60°C, 150rpm, razão molar álcool:anidrido acético 1:5 e concentração de enzima (m/m substratos) 10%;

- o estudo do efeito da razão molar mentol:anidrido acético na cinética da produção enzimática de mentil acetato demonstrou que conversões acima de 45% podem ser obtidas a partir de 6 horas de reação usando razão molar 1:1, temperatura 50°C, concentração de enzima 5,5%,

- após 15 horas de reação um equilíbrio é atingido nas diferentes faixas de razão molar estudadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à URI – Campus Erechim pelo auxílio financeiro.

AUTORES

Viviane Chiaradia - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim. Graduanda do curso de Química Industrial (URI-Campus de Erechim). E-mail: viviane.chiaradia@hotmail.com

Maiki Detofol - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim. Graduando do curso de Química Industrial (URI-Campus de Erechim). E-mail: maiki.rd@hotmail.com

Rogério Luis Cansian - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim. Professor, Doutor em Ecologia pela Universidade Federal de São Carlos. E-mail: cansian@uricer.edu.br

Rogério Marcos Dallago - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim. Professor, Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria. E-mail: dallago@uricer.edu.br

Débora de Oliveira - Universidade Federal de Santa Catarina, Professora, Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. E-mail: odebora@uricer.edu.br

Natalia Paroul - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim. Professora, Mestre em Química pela Universidade de Amizade dos Povos, Moscou. E-mail: nparoul@uricer.edu.br

REFERÊNCIAS

ATHAWALE, V.; MANJREKAR, N. Enzymatic synthesis of the acrylic esters: a comparative study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. n. 10, p. 551-554, 2000.

BABALI, B.; AKSOY, H.A.; TURER, M.; USTUN, G. Enzymatic esterification of (-)-Menthol with lauric acid in isooctane by sorbitan monostearate-coated lipase from *Candida rugosa*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 78, n. 2, p. 53-56, 2001.

BASAK, A.; NAG, A.; BHATTACHARYA, G.; MANDAL, S.; NAG, S. Chemoenzymatic synthesis of anti-inflammatory drugs in enantiomerically pure form. **Tetrahedron Asymmetry** v.11, n. 11, p. 2403-2407, 2000.

GANDHI, N.N. Application of lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.

KAMIYA, N.; GOTO, M.; NAKASHIO, F. Surfactant-Coated Lipase Suitable for the Enzymatic Resolution of Menthol as a Biocatalyst in Organic Media. **Biotechnology Progress**. v.11, n. 3, p. 270-275, 1995.

KOBAYASHI, T.; NAGAO, T.; KAWASHIMA, A.; WATANABE, Y.; SHIMADA, Y. Synthesis of polyunsaturated fatty acid L-menthyl esters through lipase-catalyzed esterification in an organic solvent-free system. **Journal of Oleo Science**. v.53. n. 6, p. 309-312, 2004.

SHIMADA, Y.; HIROTA, Y.; BABA, T.; KATO, S.; SUGIHARA, A.; MORIYAMA, S.; TOMINAGA, Y.; TERAJ, T. Enzymatic Synthesis of L-Menthol Esters in Organic Solvent-Free System. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.76, n. 10, p. 1139-1142, 1999.

WANG, D.L.; NAG, A.; LEE, G.C.; SHAW, J.F. Factors affecting the resolution of DL-menthol by immobilized lipase-catalyzed esterification in organic solvent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, n. 2, p. 262-265, 2002.

YUAN, Y.; BAI, S.; SUN, Y. Comparison of lipase-catalyzed enantioselective esterification of (\pm)-menthol in ionic liquids and organic solvents. **Food Chemistry**. v.97, n. 2, p. 324-330, 2006.