



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DESENVOLVIMENTO
DE PROCESSOS QUÍMICOS

Esterificação enzimática para síntese de acrilato de sacarose

Msc. Denise Silva de Aquino

Orientadora: Prof^a Dra. Telma Teixeira Franco

Co-orientador: Prof^o Dr Gustavo Paim Valença

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título Doutor em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo

10/2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

Aq56e Aquino, Denise Silva de
Esterificação enzimática para síntese de acrilato de
sacarose / Denise Silva de Aquino. --Campinas, SP:
[s.n.], 2010.

Orientadores: Telma Teixeira Franco
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Carboidratos. 2. Ácido acrílico. 3. Lipase. 4.
Ésteres. 5. Sacarose. I. Franco, Telma Teixeira. II.
Valença, Gustavo Paim. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV.
Título.

Título em Inglês: Enzymatic esterification of sucrose acrylate

Palavras-chave em Inglês: Carbohydrate, Acrylic acid, Lipase, Esters,
Sucrose

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

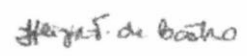
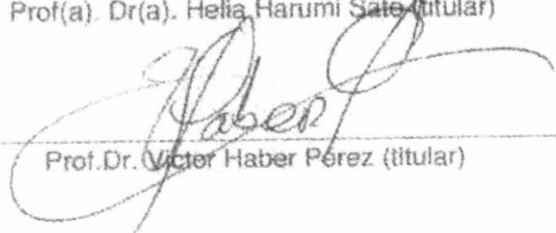
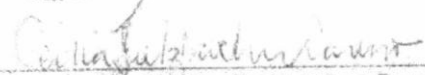
Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Heizir Ferreira de Castro, Helia Harumi Sato, Victor
Haber Pérez, Cecília Sulzbacher Caruso

Data da defesa: 18/10/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Denise Silva de Aquino e aprovada em
18 de outubro de 2010 pela banca examinadora constituída pelos doutores:


Prof(a). Dr(a). Telma Teixeira Franco - Orientador
Prof(a). Dr(a). Heizer Ferreira de Castro (titular)
Prof(a). Dr(a). Helia Harumi Sato (titular)
Prof.Dr. Victor Haber Perez (titular)
Prof(a). Dr(a). Cecilia Sulzbacher Caruso (titular)

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke, positioned above a solid horizontal line.

Telma Teixeira Franco (orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: a minha mãe Elza, o meu pai Jair, minha irmã Danielly, meu irmão Luis Fernando e a minha sobrinha Ana Caroline. Sem o apoio e as palavras de conforto, eu não teria a perseverança em buscar meus objetivos e superar a saudade de vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha orientadora Telma Teixeira Franco, pela orientação e compreensão.

Ao meu co-orientador Gustavo Paim Valença, pela atenção, sugestões e dedicação.

A FAPESP pela bolsa concedida.

Aos colegas de laboratório Paula, Kity, Eduardo, Camilo, Talita e Érika, pelo convívio do dia-a-dia, pelas risadas e pelas conversas.

A Bianca Ayres e Junko Tsukamoto por todas as informações e apoio que foram essenciais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A minha amiga irmã Érika Koroishi em ouvir as minhas lamentações e dar uma palavra amiga nas horas de desânimos.

A minha amiga Carol Costa pelo bom convívio diário nos quatro anos que moramos juntas e por ser minha conselheira em vários momentos.

As minhas amigas Alessandra, Ivana e Rílvia pela amizade verdadeira.

As colegas de trabalho da Amyris pelo apoio e compreensão nas dias que precisei me ausentar.

Enfim, num trabalho de quatro anos, foram tantas as pessoas que conheci e me ajudaram que é impossível citar todas. Por isso, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para conclusão deste trabalho meus sinceros agradecimento.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu estado original.”

Albert Einstein

RESUMO

O presente trabalho determinou as constantes cinéticas e de equilíbrio para a produção de acrilato de sacarose a partir da esterificação direta do ácido acrílico com sacarose catalisada pela lipase comercial de *Candida antarctica* (Novozym 435). Para alcançar o objetivo proposto foram estudadas as melhores condições para a síntese do acrilato de sacarose, tais como: quantidade de biocatalisador, presença inicial de água no sistema reacional e razão molar dos substratos (sacarose/ácido acrílico). Na esterificação enzimática a formação do subproduto água deve ser controlada para evitar a hidrólise dos ésteres. A adição de peneira molecular 3 Å ao sistema foi investigada para remoção da água produzida e favorecimento do deslocamento do equilíbrio para síntese dos ésteres. O interesse na produção deste éster é devido a alta capacidade de absorção de água. Além disso, os carboidratos são a fonte renovável mais abundante na natureza e, conseqüentemente, uma das matérias primas mais promissora para o desenvolvimento de compostos de origem renovável. A maior conversão da sacarose (76 %) em acrilato de sacarose foi atingida nas seguintes condições: 78 g/L de lipase Novozym 435, razão molar de 1:6 (sacarose:ácido acrílico), ausência de água inicial no sistema reacional e 400g/L de peneira molecular. Com o conjunto de dados obtidos, foi proposto o mecanismo Pingue-Pongue Bi-Bi. Portanto, foi desenvolvida uma equação que representa o mecanismo proposto para a sequência de reações envolvida na esterificação da síntese do acrilato de sacarose. A estimativa dos parâmetros K_1 , K_2 , K_3 , K_8 , K_9 e β foi obtida utilizando a expansão em série de Taylor, ajuste pela equação de uma reta e pelo não linear por meio do programa computacional POLYMATH 6.0. O critério estabelecido para avaliação da qualidade do ajuste foi o 95% de confiança entre o valor experimental e o valor calculado pela equação ajustada.

Palavras-chaves: sacarose, esterificação enzimática, lipase e ácido acrílico.

ABSTRACT

In this work the equilibrium and kinetics constants of the direct esterification of sucrose with acrylic acid catalyzed by lipase *Candida antarctica* (Novozym 435) were determined. The optimal conditions were studied such as: different amounts of enzyme and water, sucrose to acrylic acid molar ratio and molecular sieves content. Enzymatic esterifications are equilibrium reactions whose subproduct is water. The presence of this must be controlled to allow esterification of the lipase and to avoid hydrolysis of esters. The addition of molecular sieve 3 Å to the system was investigated to remove of produced water and to shift the equilibrium to the synthesis of ester. The interest in the sugar ester production is due the high capacity to absorb water. Renewable sugars are interesting alternative carbon sources for the production of chemicals by biotechnological routes. The highest sucrose conversion (76%) in sucrose acrylate was reached on the following conditions: 78 g/L of lipase, molar ratio 1:6 (sucrose:acrylic acid), without initial water and 400g/L of molecular sieve. The Ping-Pong Bi-Bi mechanism was proposed. Therefore, the equation represents the mechanism for the reaction sequence involved in the synthesis of sucrose acrylate was developed. The estimates of the parameters of the K_1 , K_2 , K_3 , K_8 , K_9 and β were obtained using the Taylos series expansion, set by a line equation and set non-linear by the computer program Polymath 6.0. The criterion used to value the quality of data fit was 95 % confidence level

Key words: sucrose, enzymatic esterification, lipase and acrylic acid.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. Introdução	21
CAPÍTULO II. Conceitos Fundamentais e Revisão da Literatura.....	23
II.1 Sacarose	23
II.1.1 Solubilidade dos carboidratos em solvente orgânico.....	25
II.2 Ácido acrílico e acrilatos de açúcares	26
II.4 Biocatálise.....	31
II.4.1 Lipases	33
II.5 Referências Bibliográficas	43
CAPÍTULO III. Materiais e Métodos.....	53
III.1 Desidratação dos solventes com peneiras moleculares	53
III.2 Determinação da solubilidade dos carboidratos	53
III.3 Esterificação enzimática da sacarose com ácido acrílico.	54
III.4 Determinação dos efeitos da concentração da enzima, da presença de água e da razão molar (sacarose:ácido acrílico) na conversão da sacarose em acrilatos de sacarose.	54
III.5 Esterificação e Hidrólise enzimática	56
III.6 Efeito da adição de peneira molecular.....	56
III.7 Taxa de liberação de água da lipase Novozym 435.....	57
III.8 Mecanismo cinético	57
III.9 Determinação da concentração dos carboidratos	58
III.10 Determinação de água por Karl Fisher	59
CAPÍTULO V. Solubilidade de açúcares em álcool terciário.....	61

CAPÍTULO IV – Mecanismo cinético da esterificação enzimática da sacarose com ácido acrílico.	77
CAPÍTULO VIII. Sugestões para trabalhos futuros.....	107
ANEXOS	109
A.1 CONCENTRAÇÕES DOS PADRÕES DOS CARBOIDRATOS UTILIZADOS NO CLAE.....	109
A.2 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DOS CARBOIDRATOS	110
A3 CROMATOGRAMA DA ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DA SACAROSE COM ÁCIDO ACRÍLICO.	116
A4 TAXA DE LIBERAÇÃO DE ÁGUA	117
A5 CINÉTICA ENZIMÁTICA E MECANISMO CINÉTICO	120

LISTA DE FIGURAS

Figura II. 1 Estrutura química da sacarose.	24
Figura II. 2 Representação esquemática de um mecanismo cinético pingue-pongue para uma reação de transferência de grupo. O doador A reage com E para formar um complexo enzimático; P é liberado antes da ligação do aceptor, B, onde A e B são substratos, E a enzima e P e Q os produtos formados (SEGEL, 1979).	35
Figura II. 3 Reação de esterificação.	36
Figura A3. 1 após 5 horas de reação nas seguintes condições: 20% de conversão de sacarose, razão molar de 1:6 (sacarose:ácido acrílico), 1,95 g de lipase Novozym 435 a 200rpm a 65°C.....	116
Figura A4. 1 Comparação da umidade presente na mistura constituída por TBA, lipase Novozym 435 (TBA) e na meio reacional (REAÇÃO) em função do tempo.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela II. 1 Valores de Log P para solventes utilizados em reações catalisadas pela lipase (VILLENEUVE, 2007).	39
Tabela II. 2 Solubilidade máxima de solventes orgânicos em água versus o valor de log P do solvente orgânico (LAANE et al., 1987).	40
Tabela III. 1 Composição das misturas de reação utilizadas para avaliar a influência da presença de água e da quantidade do biocatalisador.....	55
Tabela III. 2 Composição das misturas da reação utilizadas para avaliar a influência da razão molar de sacarose:ácido acrílico.	55
Tabela A1. 1 Concentrações dos padrões dos carboidratos utilizados nas análises por CLAE.	109
Tabela A2. 1 Resultados da determinação da solubilidade da sacarose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 55°C.....	110

Tabela A2. 2 Resultados da determinação da solubilidade da sacarose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 65°C.	111
Tabela A2. 3 Resultados da determinação da solubilidade da frutose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 55°C.	111
Tabela A2. 4 Resultados da determinação da solubilidade da frutose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 65°C.	112
Tabela A2. 5 Resultados da determinação da solubilidade da glicose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 55°C.	112
Tabela A2. 6 Resultados da determinação da solubilidade da glicose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 65°C.	113
Tabela A2. 7 Resultados da determinação da solubilidade da maltose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 55°C.	113
Tabela A2. 8 Resultados da determinação da solubilidade da maltose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 65°C.	114
Tabela A2. 9 Resultados da determinação da solubilidade da xilose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 55°C.	114
Tabela A2. 10 Resultados da determinação da solubilidade da xilose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 65°C.	115
Tabela A5. 1 Tabela estequiométrica da reação de esterificação da sacarose com o ácidoacrílico catalisado pela Novozym 435.....	122
Tabela A5. 2 Parâmetros cinéticos K1, K2 e K3 da síntese de acrilatos de sacarose.	124
Tabela A5. 3 Parâmetros cinéticos K8, K9 e β da esterificação da sacarose com ácido acrílico utilizando a Novozym 435.....	126
Tabela A5. 4 Dados utilizados para a estimativa dos parâmetros cinéticos K1, K2, K3, K8, K9 e β	127

CAPÍTULO I. Introdução

A sacarose (β -D-fructofuranosil (2 $\rightarrow$ 1) α -D-Glucopiranosideo) é um dissacarídeo constituído pelas moléculas de glicose e uma de frutose. É produzido em escala industrial a partir da cana-de-açúcar e da beterraba. Sua estrutura química, baixo custo e a disponibilidade no Brasil tornam esta matéria-prima uma atraente fonte de carbono para a síntese de novos produtos por rotas químicas e biotecnológicas.

Nos últimos anos, polímeros de açúcares têm recebido atenção devido às suas propriedades únicas: por exemplo, acrilatos de açúcares são materiais altamente absorventes, conhecidos como hidrogéis, os quais podem ser usados na absorção de água e podem servir como aditivos reológicos, espessantes, gel cromatográfico e materiais biológicos (QUENEAU *et al.*, 2007). Hidrogéis são polímeros interligados por ligações cruzadas com capacidade de inchar na presença de água.

Os acrilatos de açúcares podem ser obtidos tanto pela esterificação química quanto pela esterificação enzimática. No processo enzimático as reações são conduzidas a temperaturas mais baixas quando comparado ao processo químico. (HAGSTORÖM *et al.*, 2009; NORDBLAD & ADLERCREUTZ, 2008, VILLENEUVE, 2007, SABEDER *et al.*, 2005 HOYDONCKX *et al.*, 2004, SOLUTANI *et al.*, 2001). Além disso, as reações enzimáticas são bastante seletivas e apresentam menos produtos secundários (VILLENEUVE, 2007; SABEDER *et al.* 2006; FERRER *et al.*, 2005).

Lipases são utilizadas em síntese orgânica em reações quimio, regio e estereoseletivas. A maioria das lipases utilizadas como catalisadores em química orgânica são de origem microbiana e algumas extraídas de tecidos animais e em geral toleram solventes orgânicos na mistura reacional. (SHARMA, 2001).

Neste trabalho, foi estudado a síntese de acrilato de sacarose por meio da esterificação direta da sacarose com o ácido acrílico utilizando a lipase Novozyme 435 como biocatalisador.

Desta forma, os objetivos principais deste trabalho foram:

- Estudar a solubilidade da sacarose nos solventes orgânicos, terc-butanol e 2-metil-2-butanol.
- Avaliar os efeitos concentração da enzima lipase, da presença de água e da razão molar (sacarose:ácido acrílico) na conversão da sacarose.
- Determinar as constantes cinéticas da reação, bem como o mecanismo cinético da esterificação enzimática da sacarose com o ácido acrílico.

CAPÍTULO II. Conceitos Fundamentais e Revisão da Literatura

II.1 Sacarose

Há uma crescente necessidade de substituir materiais provenientes de fontes fósseis por fontes renováveis. Os carboidratos, por ser a fonte renovável mais abundante na natureza é, conseqüentemente, uma alternativa interessante de fonte de carbono para a síntese de produtos químicos com aplicações industriais tais como surfactantes e blocos construtores para polimerização (QUENEAU *et al.*, 2007). O baixo custo e a disponibilidade de sacarose no Brasil fazem com que esta seja uma matéria-prima desejável para a elaboração de novos produtos comerciais. A sacarose é produzida em escala industrial por meio da extração da cana-de-açúcar e da beterraba. O processo de fabricação de açúcar é iniciado pela extração do caldo de cana. O caldo é submetido a um processo de evaporação, transformando-se em xarope. Após, o xarope é enviado para a etapa de concentração e cozimento que resulta em uma mistura de cristais com melaço. Os cristais são separados do melaço pelo processo de centrifugação obtendo o açúcar cristal (CIA UNIÃO). A sacarose é comercialmente disponível em grande quantidade. Sua produção mundial em 2008 foi de 166 milhões de toneladas (MAPA/ACS, 2009) sendo que a produção brasileira de sacarose safra 2008/2009 foi de 31 milhões de toneladas (MAPA/ACS, 2009).

Recentemente a crescente preocupação com a escassez de recursos fósseis tem incentivado projetos direcionados para novos e eficientes processos que utilizam matérias-primas renováveis, incluindo a sacarose e outros carboidratos, tais como amido, celulose, quitina e polissacarídeos (QUENEAU *et al.*, 2007).

A sacarose (β -D-fructofuranosil (2 $\rightarrow$ 1) α -D-Glucopiranosideo) é um dissacarídeo constituído de uma molécula de glicose e outra de frutose ligadas pelos seus carbonos anoméricos (Figura II.1). Entretanto, não contém ligação hemiacetalica e é por isso um açúcar não redutor.

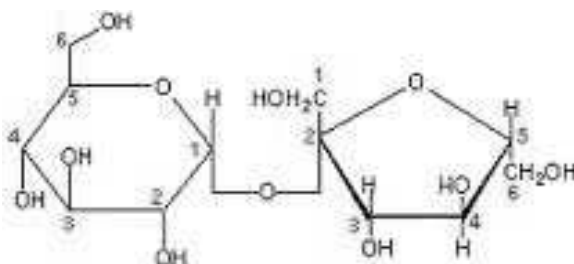


Figura II. 1 Estrutura química da sacarose.

A sacarose é uma substância branca e cristalina apresenta baixa solubilidade em solventes orgânicos por causa da presença de oito grupos hidroxil. São solúveis apenas em solventes polares como água, dimetilsulfóxido, dimetilformamida e piridina. Estudos estruturais dos cristais de sacarose mostraram a existência de duas pontes de hidrogênio, a primeira entre 6'-OH e o átomo de oxigênio do anel piranose e a segunda entre 1'-OH e o átomo de oxigênio do grupo C(2)OH (citado por JAROSZ & MACH, 2002). Os oito grupos hidroxilas (3 primários (6, 1',6') e os 5 secundários (2, 3, 4, 3', 4')) estão disponíveis para reagir e a possível combinação para substituição de todas as posições pode produzir 255 diferentes compostos. Entretanto, a taxa relativa de reação de todos os grupos hidroxil depende do tipo de transformação e da condição da reação, fornecendo dois tipos de seletividade, o grau de substituição e a regioquímica. Ambos são fatores chaves nas propriedades do produto e consequentemente nas possíveis aplicações. (QUENEAU *et al.*, 2007).

II.1.1 Solubilidade dos carboidratos em solvente orgânico

Solventes orgânicos como meio para reações enzimáticas contribuem no deslocamento do equilíbrio para síntese de ésteres quando enzimas hidrolíticas são utilizadas (FLORES *et al.*, 2002b; TASSIOS & SPILIOTIS, 2000). Entretanto, diferentes estratégias já foram estudadas para superar os problemas de solubilidades dos carboidratos em solvente orgânico. Os solventes apropriados para solubilizar os carboidratos incluem a piridina, o dimetilsulfóxido e a dimetilformamida, mas a maioria das lipases são inativadas na presença destes solventes polares. Além disso, o uso destes solventes é indesejável quando os produtos são destinados para o consumo ou o uso tópico em humanos. (FLORES *et al.*, 2002b, WARD *et al.*, 1997, MUTUA & AKOH, 1993).

Para evitar o uso destes solventes, e ao mesmo tempo explorar o uso de lipases nessas reações, solventes menos prejudiciais têm sido usados para a produção de ésteres de açúcares com alta seletividade e bom rendimento, tais como terc-butanol, 2-metil-2-butanol, cetonas, acetonitrila e hexano os quais solubilizam parcialmente o carboidrato (TUSUKAMOTO *et al.*, 2008; TSUZUKI *et al.*, 1999; ZHANG & HAYES, 1999; DEGN *et al.*, 1999; OGUNTIMEIN *et al.*, 1993). O 2-metil-2-butanol e outros álcoois terciários não podem ser usados como substrato pela maioria das lipases, por causa dos fatores estéricos que limitam a sua acessibilidade no sítio ativo. Por outro lado os carboidratos possuem baixa solubilidade nesses solventes podendo limitar a reação (FLORES *et al.*, 2002b). Um bom contato entre os substratos deve ser obtido e o solvente selecionado deve dissolvê-los pelo menos parcialmente. Portanto, meios reacionais com polaridade intermediária são frequentemente escolhidos e os álcoois terciários são bons candidatos (VILLENEUVE, 2007).

Tsadas *et al.* (2002a) solubilizaram a sacarose em 2-metil-2-butanol, mas utilizaram água como co-solvente para aumentar a solubilidade do carboidrato neste álcool terciário. Plou *et al.* (2002) desenvolveram um sistema para acilação de sacarídeos com ácidos graxos catalisado por lipases usando um meio reacional composto por dois solventes miscíveis, dimetilsulfóxido e 2-metil-2-butanol. Os carboidratos foram dissolvidos em uma pequena quantidade de solvente hidrofílico, dimetilsulfóxido, e a seguir foi adicionado o 2-metil-2-butanol. Esta mistura aumentou substancialmente a solubilidade do carboidrato. Dentre os carboidratos estudados, estavam sacarose e maltose. A enzima foi pouco inativada pelo fato da maior parte do meio reacional ser composta por 2-metil-2-butanol aonde a maioria das lipases são estáveis. Voutsas *et al.* (2002) desenvolveram um procedimento para acilação de glicose e sacarose no qual dois solventes miscíveis são empregados: álcool terciário e dimetil sulfóxido (DMSO) como co-solvente.

II.2 Ácido acrílico e acrilatos de açúcares

O ácido acrílico é um “commodity” químico produzido pela oxidação parcial do propeno. Os acrilatos são compostos industrialmente importantes com ampla aplicação comercial tais como tintas, plásticos, adesivos, flocculantes poliméricos entre outras (SYREN *et al.*, 2010; STRAATHOF *et al.*, 2005).

Nos últimos anos diversos pesquisadores estudaram a síntese de acrilatos de açúcares por lipases em solventes orgânicos devido às suas promissoras aplicações como materiais absorventes de água, aditivos para o tratamento de água e para fins biomédicos. (STAPLES *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2004 a, PARK *et al.*, 2004 b; FERREIRA *et al.*, 2000; LIU & DORDICK, 1999).

O ácido acrílico é altamente hidrofílico devido à presença de grupo carboxílico na sua estrutura e capaz de esterificar com o grupo hidroxila dos açúcares. Além disso, possui um grupo vinílico que pode ser polimerizado. Portanto, os ésteres acrílicos são monômeros eficientes para produção de polímeros de açúcares hidrofílicos, os quais são chamados de hidrogéis (PARK *et al.*, 2004a). A sacarose, por sua vez, apresenta uma elevada capacidade de se dissolver em água, o qual sugere elevado nível de bicompatibilidade e confere seu potencial como material para preparação de géis FERREIRA *et al.*, 2000).

Nordeblad and Adlercreutz (2008a) realizaram a reação de esterificação do ácido acrílico com o octanol na presença da lipase Novozym 435 e verificaram redução catalítica da atividade enzimática da lipase pelo ácido acrílico, entretanto este efeito pôde ser amenizado pela adição de bases organo-solúveis.

Nordeblad and Adlercreutz (2008b) observaram que a esterificação enzimática direta do ácido acrílico com o 1-octanol foi bastante lenta devido a diminuição da atividade da lipase em concentrações do ácido carboxílico acima de 500 mM. Sendo assim, estudaram a transesterificação 1-octanol com acrilato de etila catalisado pela Novozym 435 e observaram que a reação enzimática foi mais rápida, pois não houve o efeito de inibição da enzima pelo ácido carboxílico.

A introdução de açúcar na molécula de polímero pode acrescentar novas propriedades, tais como aumento da polaridade, quiralidade e biodegradabilidade. Polímeros contendo sacarose na sua estrutura podem ter a estrutura principal do carboidratos na cadeia polimérica ou resíduos de sacarose como ramificação servindo como grupos funcionais polares (QUENEAU *et al.*, 2007).

Os polímeros de sacarose podem ser obtidos por polimerização ou copolimerização e os monômeros são preparados por síntese de múltiplas etapas, conduzindo a compostos definidos e posteriormente bem controlados pelo processo de polimerização ou pela reação direta da sacarose desprotegida, levando a mistura de isômeros, i.e., uma mistura mais complexa de polímeros. Notavelmente, monômeros mono substituídos conduzem a polímeros lineares, visto que derivados polisubstituídos conduzem matérias com ligações cruzadas (cross-linked) e os hidrogéis podem assim ser preparados (QUENEAU *et al.*, 2007).

Hidrogéis são polímeros interligados por ligações cruzadas que tem capacidade de intumescer em água. Os hidrogéis atuam como um meio de transporte de soluto e como um plastificador, permitindo que estes materiais sejam viscoelásticos. Pela elevada capacidade de absorver água, os hidrogéis são amplamente usados como superabsorventes. Hidrogéis são altamente hidrofílicos e apresentam baixa densidade. Os hidrogéis estão sendo utilizados na engenharia biomédica, devido à capacidade de transportar soluto, pela semelhança física com o tecido humano e pela sua influência na permeabilidade do soluto. Em geral, hidrogéis são excelentes matrizes para sistema de liberação de fármacos e para suportes de imobilização de enzimas (HOARE & KOHANE, 2008).

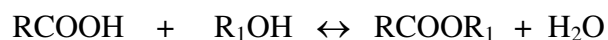
A síntese de acrilatos com glucosídeos catalisado enzimaticamente, com o objetivo de produzir acrilatos de açúcares poliméricos, bem como monoacrilato de poliol tem sido descrito pela empresa alemã BASF (2003).

II.3 Esterificação enzimática

Os acrilatos de açúcares podem ser obtidos tanto pela esterificação quanto pela transesterificação e estas por sua vez podem ser catalisadas por catalisadores químicos ou bioquímicos. Nas últimas décadas, o avanço biotecnológico levou ao desenvolvimento de métodos bioquímicos aplicáveis à obtenção de ésteres de açúcares em condições mais brandas, com maiores seletividades e menores toxicidades (LINDNER, 2005).

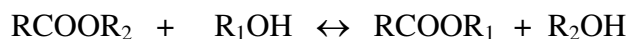
A esterificação e a transesterificação são as reações de maior importância na produção de produtos químicos renováveis. A esterificação consiste na reação entre um ácido e um álcool. A transesterificação é a reação entre um éster e um álcool. Ambas podem necessitar da presença de um catalisador para aumentar significativamente a velocidade da reação e a conversão (HOYDONCKX *et al.*, 2004).

Esterificação Direta



Ácido Álcool Éster Água

Transesterificação



Éster Álcool Éster Álcool

O excesso de um dos reagentes pode ser usado para deslocar o equilíbrio. Outras estratégias tais como a remoção de produtos do meio reacional à medida que eles são formados (*in-situ extraction*) também são utilizadas. Por exemplo, a água pode ser

removida continuamente por adsorção por agentes secantes, por destilação ou por membranas seletivas à água (HOYDONCKX *et al.*, 2004).

A reatividade dos álcoois e dos ácidos carboxílicos na esterificação depende dos impedimentos estéricos de ambos. Desta forma, a reação de esterificação com ácidos e álcoois terciários é lenta e a taxa diminui na seguinte forma (HOYDONCKX *et al.*, 2004, MORRISON e BOYD, 1981):



Onde R = CH₃, R₁ = (CH₃)₂ e R₃ = (CH₃)₃

O grau de conversão de esterificação depende das condições de reação. A adição de solventes orgânicos ao meio, como forma de impedir a hidrólise e aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos, torna mais viável esta reação (HOYDONCKX *et al.*, 2004).

Uma boa alternativa para catálise clássica é o uso de enzimas para esterificação, tais como proteases e lipases. Para fazer com que estas enzimas (que normalmente hidrolisam ligações de amido e éster) atuem na direção inversa (esterificação) a reação precisa ser realizada em meio orgânico com somente uma pequena quantidade de água necessária para preservar sua conformação ativa (QUENEAU *et al.*, 2007; VILLENEUVE *et al.*, 2007; SABEDER *et al.*, 2005; SOULTANI *et al.*, 2001; PAIVA *et al.*, 2000).

A dificuldade nestas reações está também em encontrar as condições compatíveis do solvente e temperatura tanto para a solubilidade dos substratos como a para estabilidade e atividade da enzima (QUENEAU *et al.*, 2007).

II.4 Biocatálise

Um dos principais objetivos da química moderna é o desenvolvimento de um processo químico sustentável. Dentro deste contexto, a utilização de enzimas como biocatalisadores é uma alternativa promissora para a química convencional (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). O termo biocatálise inclui o conceito dos processos em que um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato num produto de interesse. Para estabelecer um processo de biotransformação eficaz é necessário a análise detalhada dos fatores que condicionam o desenvolvimento e otimização do mesmo (AIRES-BARROS, 2002). A catálise enzimática tem se tornado uma técnica padrão dentro da química orgânica, e a lipase representa a classe de biocatalisadores mais utilizados (HOLLMANN, *et al.*, 2009).

As vantagens das reações catalisadas por enzimas são que estas são altamente específicas, atuam em condições suaves (temperaturas moderadas e pressão atmosférica), além de ser um processo menos agressivo ao meio ambiente (HOLLMANN, *et al.*, 2009; BONMARIUS & RIEBEL, 2004). Sendo assim, são utilizadas em setores industriais como agro-alimentares, químicos, farmacêuticos e indústria de detergentes

Atualmente, o enorme potencial de aplicação das enzimas no desenvolvimento de processos biotecnológicos é uma realidade inquestionável. No entanto, foi apenas na década de 80 que a biocatálise sofreu o seu maior impulso, quando pesquisadores constataram que muitas enzimas operam *in vivo* em ambientes ricos em lipídeos hidrofóbicos, e concluíram que estes meios, predominantemente não aquosos, são igualmente adequados à expressão de atividade biocatalítica. O uso exclusivo de água como solvente de meios de biotransformações restringia a gama de aplicações dos

biocatalisadores, bem como limitava a produtividade de diversos processos, principalmente os que envolviam substratos hidrofóbicos. A convergência destes dois aspectos conduziu à incorporação de solventes orgânicos, fluidos supercríticos, fases gasosas ou fases sólidas ao meio reacional, aos quais se convencionou atribuir a designação de meios não-convencionais (AIRES-BARROS, 2002).

As principais razões para a utilização de meios não convencionais são essencialmente o fato destes permitirem: 1) a solubilização de substrato e/ou produtos hidrofóbicos, levando ao desenvolvimento de processos e produtividade elevada; 2) a redução de possíveis efeitos inibitórios e/ou tóxicos por parte do substrato e/ou dos produtos, em que o solvente orgânico pode ser selecionado de modo a funcionar como diluente, reduzindo a concentração interfacial na fase aquosa (por partição) de substrato e/ou produtos; 3) o deslocamento do equilíbrio no sentido do favorecimento da reação de esterificação, através do controle da atividade da água, no caso das enzimas hidrolases, que em meio aquoso catalisam reações de hidrólise (AIRES-BARROS, 2002).

As mais diversas reações orgânicas (esterificação, interesterificação, transesterificação e hidrólises) podem ser realizadas empregando catalisadores químicos/bioquímicos. Por causa das suas vantagens citadas anteriormente é cada vez maior o interesse da aplicação de catalisadores bioquímicos em síntese orgânica. Entre esses, especial atenção tem sido dedicada às hidrolases, em função de sua alta atividade catalítica exibida em diversos meios orgânicos, catalisando a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores (PAULA *et al.*, 2005).

II.4.1 Lipases

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3) e catalisam tanto hidrólise quanto a reação de síntese de éster, sendo os acilgliceróis seu substrato natural. (JAEGER, *et al.*, 1998). As lipases são obtidas de plantas, animais e microrganismos. Uma grande quantidade de lipases obtidas de fungos filamentosos já foi estudada tanto do ponto de vista bioquímico quanto genético, sendo os melhores microrganismos produtores os do gênero *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor* (FEVRIER *et al.*, 2001; KIRAM & DIVAKAR, 2001). Grande número de lipases são também produzidas por leveduras, sendo as mais importantes as do gênero *Candida*, bastante utilizadas em processos biotecnológicos (SANCHEZ *et al.*, 2000; CARDENAS *et al.*, 2001).

As lipases são atraentes devido à estereoespecificidade (capacidade das lipases de discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica), regioseletividade (capacidade de discriminar grupos funcionais em uma molécula), baixo consumo de energia, atuam em vários substratos, possuem estabilidade em solvente orgânico e além da hidrólise, as hidrolases podem catalisar a reação inversa, a esterificação (VILLENEUVE *et al.*, 2000, TORRES & OTERO, 2000, OLIVEIRA *et al.*, 2000, JAEGER & REETZ, 1998, BORNSCHEUER & KAZLAUSKAS, 1999).

O estudo sobre a cinética é de fundamental importância, não somente para elucidar o mecanismo de reação, mas porque a informação sobre a taxa de formação de produto são necessárias para o projeto de reatores e posteriormente, ao escalonamento para escala industrial. Vários estudos focados na cinética de esterificação enzimática foram realizados e modelos diferentes foram propostos, tais como: mecanismo de Michaelis-Mentem, uni-bi e

Pingue-Pongue Bi-Bi (PAIVA et al., 2000; JANSSEN *et al.*, 1999). Geralmente o mecanismo aceito para as reações catalisadas pela lipase é o mecanismo Pingue-Pongue Bi-Bi, pois essas enzimas em geral catalisam reações entre dois substratos e podem tanto catalisar a reação de hidrólise quanto a reação inversa, a esterificação. (YU *et al.*, 2008, DANESHFAR *et al.*, 2007, FLORES & HALLING, 2002a, ARCOS *et al.*, 2001, JANSSEN *et al.*, 1999).

No mecanismo Pingue-Pongue Bi-Bi, um produto é liberado entre a adição de dois substratos. O ácido carboxílico liga-se a enzima e em seguida o primeiro produto é liberado para formar o complexo acil-enzima. O açúcar liga-se ao complexo acil-enzima para formar o segundo produto, éster de açúcar, e regenerar a enzima (FLORES & HALLING, 2002; ARCOS et al., 2001; SEGEL 1975).

Arcos et al. (2001) apresentaram um modelo cinético de primeira ordem baseado no mecanismo Pingue-Pongue Bi-Bi para esterificação da glicose com ácido láurico catalisado pela lipase Novozym 435. Esses autores concluíram que o modelo proposto teve um bom ajuste aos dados experimentais.

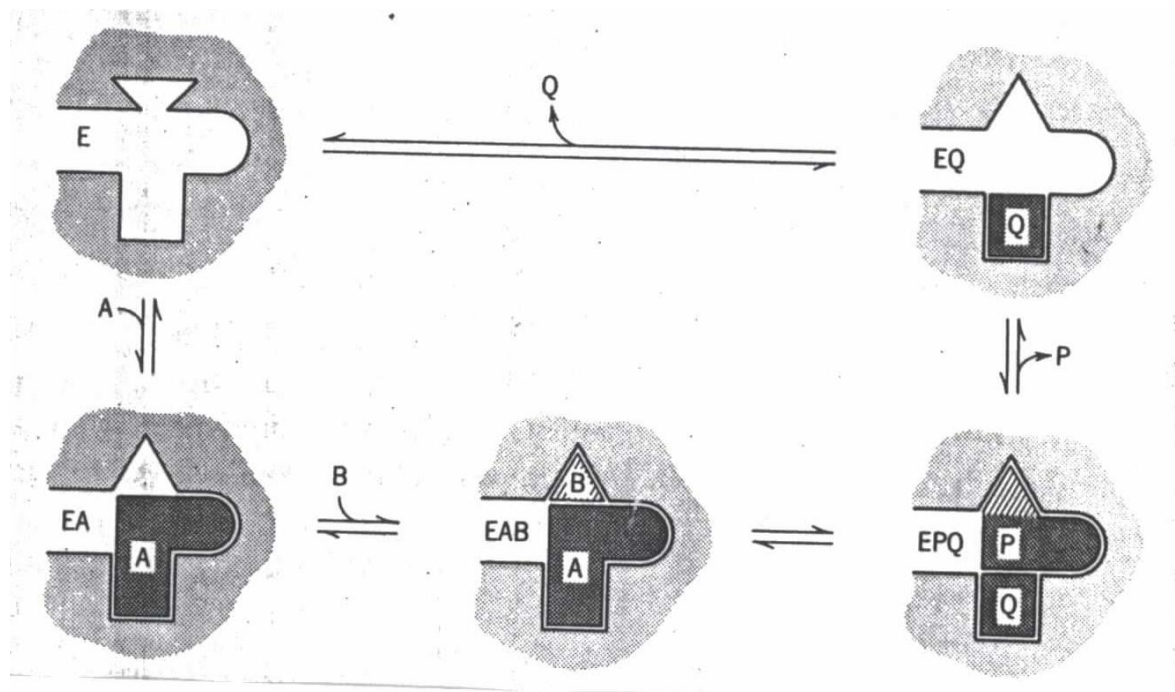


Figura II. 2 Representação esquemática de um mecanismo cinético pingue-pongue para uma reação de transferência de grupo. O doador A reage com E para formar um complexo enzimático; P é liberado antes da ligação do aceptor, B, onde A e B são substratos, E a enzima e P e Q os produtos formados (SEGEL, 1979).

A reação de esterificação utilizando a lipase como biocatalisador sofre influência da água produzida durante a reação, bem como do solvente orgânico. Portanto, são apresentados a seguir a influência destes dois compostos.

a) Influência da água

Nas reações de esterificação, a água é um subproduto importante no equilíbrio químico (Figura II.3). Além disso, a quantidade de água é um parâmetro importante, pois afeta a atividade enzimática da lipase no meio. O nível de hidratação da enzima tem grande influência na flexibilidade da proteína e consequentemente na sua atividade catalítica. Por isso, é necessário controlar a quantidade de água nas reações de esterificação. A quantidade

de produto formado pode variar dependendo do meio reacional e da quantidade de água presente no mesmo (FORESTI *et al.*, 2007, CHAMOLEAU *et al.*, 2001, AIRES-BARROS, 2002).



Figura II. 3 Reação de esterificação.

A água apresenta diferentes papéis neste sistema. Para favorecer a reação inversa, a atividade termodinâmica da água deve ser mantida tão baixa quanto possível. Entretanto, como a água afeta a atividade catalítica e a estrutura tridimensional das proteínas em solução bem como no estado sólido, foi verificado que a quantidade da mesma presente em meio orgânico é importante para a estabilidade térmica e para a atividade enzimática (AIRES-BARROS, 2002, LORTIE, 1997).

A água pode ser também um inibidor competitivo na síntese de éster catalisado por lipase. Portanto, dependendo do solvente empregado na reação enzimática, diferentes técnicas de remoção da água produzida podem ser empregadas para deslocar o equilíbrio da reação, como peneiras moleculares, sílica gel, misturas azeotrópicas, pervaporação, solução saturada de sais e o solvente previamente desidratado (PETERSSON, *et al.*, 2007; SAKAKI *et al.*, 2006; LORTIE, 1997). O solvente afetaria a relação entre atividade de água (a_w) e o conteúdo de água no sistema, mas apresenta pouco efeito sobre a relação entre a_w e a quantidade de água na enzima. A baixa a_w , a quantidade de água ligada a enzima é independente do tipo de solvente, portanto a_w é raramente utilizada em experimentos devido a dificuldade de sua determinação (YAHYA *et al.*, 1998)

Chamouleau *et al* (2001) verificaram que a atividade de água inicial afeta fortemente a esterificação da frutose com ácido palmítico catalisado pela lipase imobilizada de *Candida antarctica* e que o uso de peneira molecular 4A no meio reacional aumentou o desempenho da reação, mas a seletividade da enzima foi afetada. Além disso, observaram por microscopia eletrônica que água forma uma camada envolvendo a partícula do biocatalisador impedindo o acesso de substratos lipofílicos aos sítios catalíticos da enzima, evidenciando a necessidade de se ajustar o teor ótimo de água durante a reação.

Giacometti *et al.* (2001) estudaram o efeito da remoção da água produzida durante a esterificação do ácido oléico com glicerol catalisado pela lipase imobilizada de *Mucor miehei*. Concluíram que 3 g de peneira molecular em 75 mL de meio reacional foi eficiente para absorver a quantidade de água livre no sistema e aumentar o rendimento do produto.

Park *et al.* (2004b) investigaram o efeito da adição de peneira molecular de 0 a 150 mg em 10 mL da reação de esterificação de β -glicosídeo com o ácido acrílico (1:15) à temperatura de 50 °C, e observaram a redução da formação do produto. Portanto, acreditam que o uso de peneiras moleculares neste trabalho causou a redução da quantidade de água mínima necessária ao redor da enzima atuando como inibidor.

Peneira molecular 3 Å foi adicionada para remoção da água produzida durante a esterificação do ácido acrílico com a frutose utilizado a lipase Novozym 435 como biocatalisador. As conversões de frutose após 24 h de reação foram 24 %, 65 %, 79 %, 86 %, 84 % e 85 % com 0 g, 1 g, 2 g, 3 g, 4 g ou 5 g de PM respectivamente, enquanto na ausência de PM foi obtido conversão de 24 % da frutose (AYRES, 2010).

Tsuzuki *et al.* (1998) observaram que água contida na mistura reacional afetava a conversão da glicose na reação de síntese de palmitato de glicose catalisada por uma lipase

modificada, uma vez que a conversão da glicose foi maior que 90% na presença da peneira molecular, enquanto que na ausência do meio dessecante a conversão foi menor que 20%.

b) Influência do meio orgânico

A seleção do solvente orgânico é um fator importante na catálise enzimática em meio não aquoso, devido à interferência direta do solvente na atividade, estabilidade e especificidade da enzima (VILLENEUVE, 2007, STRAATHOF & ADLERCREUTZ, 2000, PAULA *et al.*, 2005, CASTRO, 1995). Os solventes menos prejudiciais às enzimas são os mais hidrofóbicos, ou seja, solventes apolares, por não interagirem significativamente com a água necessária à enzima. Solventes hidrofílicos, por serem substâncias polares, tendem a retirar a água essencial da camada protéica, levando à perda da atividade enzimática. As enzimas, quando em suspensão em solventes hidrofóbicos, requerem uma quantidade substancialmente menor de água para manutenção de sua atividade em comparação às enzimas suspensas em solventes hidrofílicos (PAULA *et al.*, 2005, CASTRO, 1995).

O parâmetro mais utilizado para escolha do solvente é o valor do log P, o qual é definido como o logaritmo do coeficiente de partição, P, de uma substância no padrão de sistemas de duas fases 1-octanol/água (VILLENEUVE, 2007, STRAATHOF & ADLERCREUTZ, 2000; PEDERSEN *et al.*, 2000; LAANE *et al.*, 1987). Entretanto, deve-se escolher um meio apropriado, no qual a enzima se manterá ativa e não se desnaturará rapidamente. Geralmente, este é o caso de solventes com $\log P > 3$, como por exemplo n-hexano e n-heptano (Tabela II.1). Contudo, estes solventes não são apropriados em reações onde dois substratos diferem em termos de polaridade. O melhor exemplo para mostrar esta

dificuldade é a síntese de ésteres de ácidos graxos com açúcares onde uma molécula hidrofílica (açúcar) deve ser ligada com uma molécula lipofílica (ácido graxo). Neste caso, o solvente com $\log P > 3$ não é adequado uma vez que a solubilidade do açúcar é muito baixa ou nula. Solventes com valores mais baixos de $\log P$ devem ser utilizados, como por exemplo acetonitrila, terc-butanol e 2-metil 2-butanol. Um bom contato entre os dois substratos deve ser obtido e o solvente escolhido deve solubilizá-los pelo menos parcialmente. Portanto, uma polaridade média é escolhida. Alcoóis terciários são bons candidatos, pois não são substratos para a lipase, não possuem um forte efeito na desativação da enzima e apresentam baixa toxicidade (VILLENEUVE, 2007).

Tabela II. 1 Valores de Log P para solventes utilizados em reações catalisadas pela lipase (VILLENEUVE, 2007).

Solvente	Log P	Solvente	Log P
n-heptano	+4,00	Tetrahidrofurano	+0,49
n-hexano	+3,50	Acetona	-0,26
Tolueno	+2,50	Acetonitrila	-0,36
Benzeno	+2,00	Etil metil cetona	-0,80
2-metil 2-butanol	+1,30	Dimetilformamida	-1,00
Terc-butanol	+0,83	Dioxano	-1,10
Piridina	+0,71	Dimetilsulfoxido	-1,30

Nordeblad and Adlercreutz (2008a) estudaram influência de oito solventes orgânicos, acetona, éter metil 2-butanona, terc-butílico (MTBE), éter diisopropílico (Dipe), tolueno, ciclohexano e isooctano, na atividade enzimática da lipase Novozym 435, biocatalisador da esterificação do ácido acrílico com 1-octanol. Foi verificado que a

atividade específica da enzima aumenta com o aumento do logP. A utilização dos solventes mais hidrofóbicos resultou em maiores atividades enzimáticas bem como os maiores rendimentos quando comparados aos solventes polares. Foram escolhidos o terc-butanol, o tolueno e o ciclohexano para estudar o curso completo da reação.

Laane et al. (1987), estudaram a atividade catalítica em solventes orgânicos de enzima imobilizada (lipase pancreática), e de duas lipases não imobilizadas (uma de levedura e a outra de fungo filamentoso). Dividiram os solventes em três grupos de acordo com o seu valor de log P e a solubilidades em água (Tabela II.2). Os solventes com $\log P \leq 2$ não foram adequados em sistemas com lipases livres, uma vez que apresentaram maior solubilidade em água, esses solventes modificaram a camada essencial de água inativando ou desnaturando os biocatalisadores. Os solventes com log P entre 2 e 4 apresentaram solubilidade menor em água. Altas atividades catalíticas foram favorecidas em solventes orgânicos com $\log P \geq 4$, os quais incluem solventes hidrofóbicos. Para a lipase imobilizada, a matriz utilizada na imobilização da enzima ajudou a proteger o biocatalisador contra as alterações da camada de água ao seu redor, portanto altas atividades foram encontradas em solventes orgânico com $\log P < 4$.

Tabela II. 2 Solubilidade máxima de solventes orgânicos em água versus o valor de log P do solvente orgânico (LAANE et al., 1987).

log P	Solubilidade em água (20°C).
≤ 2	$> 0,4\%$
$2 - 4$	$0,04 - 0,4\%$
≥ 4	$< 0,04\%$

Fonseca (2008) estudou o reciclo da lipase Novozym 435 na esterificação direta da frutose com ácido acrílico utilizando terc-butanol como solvente. Foram realizadas cinco

reações consecutivas, onde a atividade do catalisador foi avaliada em termos de conversão de frutose. Foi verificado que entre a primeira e a quinta reação houve diminuição na conversão de frutose de 44 para 31%, ou seja, nas condições utilizadas, a lipase Novozym 435 perdeu cerca de 30% de sua atividade inicial indicando a viabilidade de reutilização desse catalisador.

c) Aplicação industrial das lipases

Lipases são biocatalisadores que apresentam vasta e diversificada gama de aplicações, razão pela qual a sua participação no mercado mundial de enzimas industriais está crescendo significativamente (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2009; VILLENEUVE, 2007; CASTRO *et al.*, 2004). As lipases constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas (ROBLES -MEDINA *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2009; VILLENEUVE, 2007; HASAN, *et al.*, 2006).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente bem como aplicações em meios não convencionais, ampliando consideravelmente o potencial das enzimas como catalisadores em processos industriais (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2004)

Embora, o uso das lipases esteja concentrado na produção de detergentes, novas aplicações vêm se estabelecendo dentre as indústrias farmacêuticas, cosméticos, química fina, óleoquímica, couros, polpa de celulose e papel, produção de biodiesel e no tratamento de resíduos industriais. As lipases vêm deste modo conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009; VILLENEUVE, 2007; HASAN, *et al.*, 2006; CASTRO *et al.*, 2004).

Dentre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres parece ser bastante promissora em função da importância de inúmeros ésteres na vida cotidiana. Produtos naturais, tais como triglicerídeos, fosfolipídeos, esteróides, aromatizantes e fragrâncias apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas que possuem (PAULA *et al.*, 2005).

No presente trabalho foram estudados os efeitos da composição do meio reacional com o objetivo de maximizar a conversão de sacarose em acrilato de sacarose. Em seguida foi estudada a cinética da reação de esterificação enzimática onde foram determinadas as constantes de equilíbrio e as constantes cinéticas da esterificação da sacarose com ácido acrílico catalisado pela lipase Novozym 435. Foi proposta uma equação que representa o mecanismo das sequências reações envolvidas na síntese de acrilato de sacarose.

II.5 Referências Bibliográficas

- AIRES-BARROS, M. R., Bioacatálise em solventes orgânicos, **Boletim de Biotecnologia**, n. 72, p.2-12, 2002.
- AYRES, B. M. T. **Obtenção de acrilatos de frutose por biocatálise**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Dissertação de Mestrado, 2010.
- ARCOS, J. A.; HIIL JR, C. G.; OTERO, C., Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 73, n. 2, p. 104-110, 2001.
- BASF, Boeckh, D., B. Hauer and D. Haering (2003). Enzymatic synthesis of sugar acrylates. **WO 03/042227**. (BASF Aktiengesellschaft, Germany).
- BEZBRADICA, D. The *Candida rugosa* lipase catalyzed sunthesis of amyl isobutyrate in organic solvent and solvent-free system: A kinetic study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, p. 11-16, 2006.
- BOMMARIUS A. S., RIEBEL B. R. **Biocatalysis: Fundamentals and applications**. Weinheim, Willey-VCH. Wiley-VCH:, 2004.
- BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in Organic Synthesis: Régio- and Stereoselective Biotransformations**. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, Wiley VCH Verlag, 1999.
- CARDENAS, F.; DE CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M; SINISTERRA, J.V.; VALMESEDA, M.; Elson, S.W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: Catalytic

- activity in reaction in organic media, **Enzyme and Microbial Technology**, 28,145-154, 2001.
- CASTRO, H. F., Fine chemical by transformation using lipases, **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C., AGUIAR, C. L., Modificação de óleos e gorduras por biotransformação, **Química Nova**, v. 27, n. 1, p.146-156, 2004
- CHAMOULEAU, F.; COULON, D.; GIRARDIN, M.; GHOUL, M., Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalized synthesis in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 949-954, 2001.
- CIA UNIÃO, **Fabricação do açúcar cristal**. Disponível em <<http://www.ciauniao.com.br/site/biblioteca/uniao-cristal.htm>> Acesso em: 27 de julho de 2010
- DANESHFAR, A. et al., Synthesis of 2-ethylhexyl-2-ethylhexanoate catalyzed by immobilized lipase in n-hexane: A kinetic study. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p. 279-284, 2007.
- DEGN, P.; PEDERSEN, L. H.; DUUS, J.; ZIMMERMANN, W. Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid esters in *tert*-butanol. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 275-280,1999.

- FERNANDEZ-LAFUENTE, R., Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as a industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 62, p. 197-212, 2010.
- FERREIRA, L. *et al.* Preparation and characterisation of gels based on sucrose modified with glycidyl methacrylate. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 15-24, 2000.
- FEVRIER, P., GUÉGAR, P., YVERGNAUX, F., CALLEGARI, J.P, DUFOSSÉ, L. BISSET, A. Evaluation of regioselectivity of lipase based on synthesis reaction conducted with propyl alcohol, isopropyl alcohol and propylene glycol, **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic** 11, 445-453, 2001.
- FLORES, M. V.; HALLING, P. J.; Full model for reversible kinetics of lipase-catalyzed sugar-ester synthesis in 2-methyl 2-butanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 7, 795-801, 2002a.
- FLORES, M. V.; NARAGHI, K.; ENGASSER, J. M.; HALLING, P. J., Influence of glucose solubility and dissolution rate on the kinetics of lipases catalyzed synthesis of glucose laurate in 2-methyl-2-butanol, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 7, p. 817-821, 2002b.
- FONSECA, E. V. **Obtenção de acrilatos de frutose por catálise enzimática**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Dissertação de Mestrado, 2008.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED; A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 235-251, 2006.

- HOARE, T. R.; KOHANE, D. S., Hydrogel in drug delivery, **Polymer**, v. 49, p. 1993-2007, 2008.
- HOLLMANN, F.; ET AL. On the inactivity of *Candida antarctica* lipase B towards strong acids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 57, p. 257-261, 2009.
- HOYDONCKX, H.E.; DE VOS, D.E; CHAVAN, S.A.; JACOBS P.A. Esterification and transesterification of renewable chemicals. **Topics in Catalysis**, v. 27, p. 83-96, 2004.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T.; Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, **Trends Biotechnology**, v. 16, p.396 – 403, 1998.
- JANSSEN, E. M.; SJURSNES, B. J.; VAKUROV, A. V.; HALLING, P. J.; Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: Correct model and solvent effects on parameters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 463-470, 1999.
- JARORZ, S.; MACH, M. Regio- and stereoselective transformations of sucrose at terminal positions. **Europe Journal of Organic Chemistry**.p.769-780, 2002.
- KIRAN, K.R.; DIVAKAR, S. Lipase catalyzed synthesis of organic acid esters of lactic acid in non-aqueous media, **Journal of Biotechnology**, 87, 109-121, 2001.
- LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 486-493, 1987.

- LINDNER, A., SCHUSCHARDT, U. **Síntese de surfactantes altamente biodegradáveis pela transesterificação de ésteres de ácidos graxos com sacarose**. Campinas: Instituto de Química, UNICAMP, Dissertação de Mestrado, 2005.
- LIU, X. C.; DORDICK, J.S. Sugar acrylate-based polymers as chiral molecularly imprintable hydrogel. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**. v. 37, p. 1665-1671, 1999.
- LORTIE, R. Enzyme catalyzed esterification, **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 1997.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento / Secretaria de Produção e Agroenergia. **Anuário Estatístico da Agroenergia**, 2009.
- MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. Trad. de M. Alves da Silva. 7.ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian., 1981.
- NORDBLAD, M.; ADLERCREUTZ, P.; Effects of acid concentration and solvent choice on enzymatic acrylation by *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Biotechnology**, v. 133, p 127-133, 2008a.
- NORDBLAD, M.; ADLERCREUTZ, P.; Efficient enzymatic acrylation through transesterification at controlled water activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, p 1518-1524, 2008b.
- OGUNTIMIN, G. B.; ERDMANN, H.; SCHMID, R.D., Lipase catalyzed synthesis of sugar ester in organic solvents, **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 2, p. 175-180, 1993.

- OLIVEIRA, A. C.; ROSA, M. F.; AIRES-BARROS; CABRAL, J.M.S, Enzymatic esterification of ethanol by an immobilised *Rhizomucor miehei* lipase in a perforated rotating disc bioreactor, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 446- 450, 2000.
- PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology** v. 27, p. 187-204, 2000.
- PARK, D.W.; HAAM, S.; AHN, I. S.; LEE, T. G.; KIM, H.S.; KIM, W.S. Chemoenzymatic synthesis of sugar-containing biocompatible hydrogels: crosslinked poly (β -methylglucoside acrylate) and poly(β -methylglucoside methacrylate). **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 71A, p. 497-507, 2004 a.
- PARK, D.W.; HAAM, S.; AHN, I. S.; LEE, T. G.; KIM, H.S.; KIM, W.S. Enzymatic esterification of β -methylglucoside with acrylic/methacrylic acid in organic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 151-160, 2004 b.
- PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S.; CASTRO, H. F., Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 792-796, 2005.
- PEDERSEN, N. R.; WIMMER, R.; EMMERSEN, J.; DEGN, P.; PEDERSEN, L. H. Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-

- catalysed esterification of disaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1179-1184, 2002.
- PLOU, ET AL, Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent, **Journal of Biotechnology**, v. 96, p. 55-66, 2002.
- QUENEAU, Y.; JAROSZ, S.; LEWANDOWSKI, B.; FITREMANN, J.; Sucrose chemistry and applications of sucrochemicals. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 61, p.217-292, 2007.
- REIS, P.; HOLMBERG, H.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 147-148, p. 237-250, 2009.
- ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. **Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production**. v.27, p. 398-408, 2009.
- SABEDER, S.; HABULIN, M.; KNEZ, Z. Lipase –catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 880-886, 2006.
- SÁNCHEZ, A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÁ, C. Highly enantioselective esterification of racemic ibuprofen in a packed bed reactor using immobilized *Rhizomucor miehei* lipase, **Enzyme and Microbial Technology**, 27, 157-166, 2000.
- SEGEL, I. H. Enzyme Kinetics. New York; John Wiley & Sons, 1975

- SOULTANI, S.; ENGASSER, J.M.; GHOUL, M. Effect of acyl donor chain length and sugar / acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 725-731, 2001.
- STAPLES, C. A.; MURPHY, S. R.; MCLAUGHIN, J. E.; LEUNG, I. W.; CASCIERI, T. C.; FARR, C. H. Determination of selected fate and aquatic toxicity characteristics of acrylic acid and a series of acrylic esters. **Chemosphere**, v. 40, p. 29-38, 2000.
- STRAATHOF, A, J. J. SIE, S., FRANCO, T. T., VAN DER WIELEN, L.A.M., Feasibility of acrylic acid production by fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 67, p. 727-734, 2005.
- TASSIOS, D.; SPILIOTIS, N.; A Unifac model for phase equilibrium calculations in aqueous and nonaqueous sugar solutions, **Fluid Phase Equilibria**, v. 173, p. 39-55, 2000.
- TORRES, C.; OTERO, C. Part III, Direct enzymatic esterification of lactic acid with fatty acids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 3-12, 2001.
- TSADAS, P.; POLYDOROU, S.; VOUTAS, E. C.; MAGOULAS, K. G.; NARAGHI, K.; HALLING, P. J., Sucrose solubility in mixtures of water, alcohol, ester and acid. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 47, p. 513-517, 2002a
- TSAVAS, P.; et al. Solubility of glucose in mixture containing 2-methyl-2-butanol, dimethyl sulfoxide, acids, esters and water. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 47, p. 807-810, 2002b.

TSUKAMOTO, J.; HAEBEL, S.; VALENÇA, G. P; PETER, M. G.; FRANCO, T. T.

Enzymatic direct synthesis of acrylic acid esters of mono- and disaccharides. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1486-1492, 2008

TSUKAMOTO, J. **Esterificação enzimática direta de carboidratos com ácido acrílico em meio orgânico**. Tese de doutorado, Unicamp, Campinas, Brasil, 2006.

TUZUKI, W.; KITAMURA, Y.; SUZUKI, T.; KOBAYASHI, S. Synthesis of sugar fatty acid esters by modified lipase. **Biotechnology Bioengineering**, v. 64, p. 267-271, 1999.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**. v. 25, p. 515-536, 2007.

VOUTSAS, E. C; TSADAS, P.; MAGOULAS, K.; TASSIOS, D., Solubility measurements of fatty acid glucose and sucrose esters in 2-methyl-2-butanol and mixtures of 2-methyl-2-butanol with dimethyl sulfoxide. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 47, p. 1517-1520, 2002.

ZHANG, X.; HAYES, D. G. Increased rate of lipase-catalyzed saccharide-fatty acid esterification by control of reaction medium. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p. 1495-1500, 1999.

YAHYA, A.R.M., ANDERSON, W.A., MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, p.438-450, 1998.

YU, J.; ZHANG, J.; ZHAO, A.; MA, X., Study of glucose ester synthesis by immobilized lipase from *Candida sp.* **Catalysis Communications**, v. 9, p. 1369-1374, 2008.

CAPÍTULO III. Materiais e Métodos

III.1 Desidratação dos solventes com peneiras moleculares

Amostras de peneira molecular (PM) 3Å foram pesadas em cadinhos e colocadas em forno mufla por 5 horas a 500°C. A seguir foram retiradas e colocadas imediatamente dentro de um dessecador sem sílica. Todo o ar do dessecador foi retirado com o auxílio de uma bomba de vácuo. Após a PM atingir a temperatura ambiente, as mesmas foram transferidas para o um frasco contendo o terc-butanol na proporção de 3 gramas de PM por 50 mL de terc-butanol (TBA) e 2-metil-2-butanol (2M2B). Os frascos ficaram fechados por 3 dias. A PM absorveu aproximadamente 70% da água presente nos solventes, a quantidade de água removida foi verificado pelo titulador coulométrico Karl Fisher.

III.2 Determinação da solubilidade dos carboidratos

Foi determinada a solubilidade dos carboidratos, sacarose, frutose, glicose, xilose e maltose, em TBA e em 2M2B. Amostras de 1g de carboidratos foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 50 mL fechado com tampa esmerilhada contendo 20 mL do álcool TBA ou 2M2B previamente desidratado com PM. Os frascos foram agitados a 200 rpm a 55°C ou 65°C. Foram retiradas alíquotas de 600 µL das amostras com micropipeta automática ao longo do intervalo de tempo pré-determinado. As alíquotas foram transferidas para seringas descartáveis de 1 mL conectadas a filtros MILIPORE de 0,45 µm e filtradas dentro de frascos de 1 mL. Todos experimentos foram realizados em duplicata (Anexo A2).

Para cada açúcar, foi preparado uma curva padrão na faixa correspondente de acordo com a metodologia de Tsukamoto (2006). Foram injetados 20 µl de cada solução padrão no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), assim pontos referentes a diferentes concentrações foram relacionados as áreas dos respectivos picos cromatográficos (Anexo A1).

III.3 Esterificação enzimática da sacarose com ácido acrílico.

A sacarose foi solubilizada previamente em TBA na concentração de 0,85 mg/mL a 65°C, 200 rpm por 12 horas, estes parâmetros foram definidos no ensaio de solubilidade. A reação de esterificação foi realizada em Erlenmeyers de 50 mL com tampa de vidro esmerilhada, sob agitação constante de 200 rpm em agitador (TECNAL, modelo TE-420), na temperatura de 65°C durante 5 horas. Foram retiradas alíquotas ao longo da reação para determinação da umidade do sistema em um titulador coulométrico Karl Fisher e da concentração da sacarose por CLAE.

III.4 Determinação dos efeitos da concentração da enzima, da presença de água e da razão molar (sacarose:ácido acrílico) na conversão da sacarose em acrilatos de sacarose.

a) Influência da presença de água e da quantidade de biocatalisador na reação de esterificação da sacarose com ácido acrílico.

Foi estudada a influência da quantidade de água e de biocatalisador na síntese de acrilato de sacarose. Quatro experimentos foram realizados com base na composição

apresentada na Tabela III.1. A reação de esterificação foi realizada conforme metodologia apresentada no item III.3. Todos experimentos foram realizados em duplicatas.

Tabela III. 1 Composição das misturas de reação utilizadas para avaliar a influência da presença de água e da quantidade do biocatalisador.

	Sem adição de água		Com adição de água	
Razão molar (sacarose:ácido acrílico)	1:6	1:6	1:6	1:6
Lipase Novozym 435 (g/L)	26	78	26	78
Água (% v/v)	0	0	0,10	0,10

b) Influência da razão molar dos substratos sacarose e ácido acrílico.

Além de verificar a influência da presença de água e quantidade de biocatalisador, foi analisada também a influência da razão molar entre os dois reagentes (sacarose/ácido acrílico) na esterificação enzimática. Portanto, dois frascos foram preparados conforme apresentado na Tabela III.2. A reação de esterificação foi realizada conforme metodologia apresentada no item III.3. Todos experimentos foram realizados em duplicatas.

Tabela III. 2 Composição das misturas da reação utilizadas para avaliar a influência da razão molar de sacarose:ácido acrílico.

	Sem adição de água	
Razão molar (sacarose:ácido acrílico)	1:12	1:6
Lipase Novozym 435 (g/L)	78	78

III.5 Esterificação e Hidrólise enzimática

Com o objetivo de estudar a hidrólise do produto acrilato de sacarose, foi realizada a hidrólise do mesmo após a esterificação enzimática da sacarose com o ácido acrílico na razão molar de 1:6 e 1,95g de lipase em 100 mL de solvente. Após a esterificação em Erlenmeyer de 250 mL com tampa de vidro esmerilhada, sob agitação constante de 200 rpm em agitador (TECNAL, modelo TE-420), a 65°C por 2 horas. Foi adicionado água em excesso, aproximadamente 9 µL (10 vezes a quantidade estequiométrica da água) no meio reacional para hidrólise nas mesmas condições por 48 horas. Foram retiradas alíquotas para determinação da água do sistema em um titulador coulométrico Karl Fisher e da concentração da sacarose foi determinada por CLAE.

III.6 Efeito da adição de peneira molecular

Foi realizado a esterificação enzimática da sacarose com o ácido acrílico na presença de quatro quantidades de PM, 10, 7,5, 5 e 2,5 gramas em 25 mL de meio reacional. Primeiramente, a sacarose foi solubilizada previamente em TBA na concentração de 0,85 mg/mL a 65°C, 200 rpm por 12 horas. O meio reacional foi constituído de razão molar de 1:6 (sacarose/ácido acrílico), 1,95 g de lipase novozym 435, totalizando 25 mL. Foi adicionado imediatamente a PM. A reação foi realizada sob agitação constante de 200 rpm em agitador (TECNAL, modelo TE-420), na temperatura de 65°C durante 5 horas. Foram retiradas alíquotas ao longo da reação para determinação da umidade do sistema em um titulador coulométrico Karl Fisher e da concentração da sacarose foi determinada por CLAE.

III.7 Taxa de liberação de água da lipase Novozym 435.

A quantidade de água liberada da preparação enzimática comercial da lipase foi realizada incubando-se os frascos Erlemeyer de 50 mL contendo 25 mL de terc-butanol previamente desidratado, 1,95g de enzima na ausência e presença de PM (2,5 g, 5 g, 7,5 g e 10 g). Os frascos foram mantidos em shaker a 200rpm e a 65°C. Todo o experimento foi realizado em duplicata. Foram retiradas alíquotas durante o processo de liberação de água.

A umidade presente nas amostras foram medidas pelo titulador Coulométrico Karl Fisher imediatamente após sua retirada (Anexo A4).

III.8 Mecanismo cinético

Foi proposto inicialmente que a esterificação direta da sacarose com ácido acrílico catalisada pela lipase Novozym 435 segue o mecanismo Pingue-Pongue Bi-Bi. Portanto, foi desenvolvida uma equação que representa o mecanismo proposto para a sequência de reações envolvida na esterificação da síntese do acrilato de sacarose. As seguintes reações estão envolvidas na esterificação.



Onde E representa a enzima, A o ácido acrílico, W a água, S a sacarose e M o produto.

Com os dados cinéticos obtidos nos itens III.4 e III.5, foi possível resolver numericamente a equação para a estimativa dos parâmetros cinéticos, K_1 , K_2 , K_3 , K_8 , K_9 e β com o auxílio dos seguintes métodos matemáticos: expansão de série de Taylo, ajuste por uma reta e pelo método de regressão não linear da equação cinética. Este último método foi realizado com o auxílio do software POLYMATH versão 6.0 (Anexo A4).

III.9 Determinação da concentração dos carboidratos

Para a quantificação dos carboidratos, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida Waters constituído de bomba 514, injetor automático 717 e detector índice de refração 410. Foi utilizada a coluna SHODEX SH 1011 (8×300mm) conectada à pré-coluna SHODEX SH-G (6×50 mm, 10 μ m o tamanho da partícula) e 0.001N H_2SO_4 como fase móvel em fluxo de 1mL/min. Foram injetados 20 μ L da amostra. A coluna e o detector foram mantidos à 50°C. Os dados foram processados pelo software EMPOWER versão 2.0.

A conversão do substrato foi expressa em conversão molar empregando a Equação III.11:

$$\%Molar = \left[\frac{(C_0 - C)}{C_0} \right] \times 100 \quad \text{III.11}$$

Onde, C_0 é a concentração inicial do reagente e C é a concentração do reagente num dado tempo.

III.10 Determinação de água por Karl Fisher

A determinação do teor de água foi realizada por um titulador coulométrico Karl Fisher (831 KF Coulometer, Metrohm, Switzerland), com eletrodo de platina, sendo a corrente, necessária para a titulação, gerada através de um eletrodo sem diafragma. As alíquotas das amostras foram retiradas com uma seringa, pesadas e um determinado volume foi injetado no vaso titulador contendo a solução Karl Fisher (Riedel-deHaën - Hidranal Coulomat AG).

CAPÍTULO V. Solubilidade de açúcares em álcool terciário

Este capítulo é referente a primeira versão do artigo “*Solubility of Sugar in Tertiary Alcohol*” o qual será corrigido e submetido para publicação.

Os objetivos do presente artigo foram estudar a solubilidade dos carboidratos, sacarose, frutose, glicose, maltose e xilose, em dois solventes orgânicos, TBA e 2M2B, e em duas temperaturas, 55 e 65°C, devido a importância da solubilidade do carboidrato em meio orgânico para aumentar o rendimento na síntese de ésteres de açúcar. Para todos os açúcares estudados, o solvente mais adequado para solubilizar os carboidratos foi o TBA. A frutose foi o açúcar que apresentou maior solubilidade em TBA (29 g/L). A solubilidade da sacarose foi a menor entre os carboidratos estudados, pois sua solubilidade foi em média 0,89 g/L. Além da escolha do melhor solvente para solubilizar os açúcares, foi analisado a influência da temperatura na solubilidade. Para todos os carboidratos, a temperatura de 65°C apresentou os maiores valores de solubilidade. A solubilidade da sacarose mostrou forte dependência da temperatura em TBA, visto que a diferença dos valores entre as duas temperaturas foi superior a três vezes. Para a solubilidade da xilose, a temperatura não apresentou interferência, pois para ambos os solventes os valores da solubilidade nas duas temperaturas foram próximos.

SOLUBILITY OF SUGAR IN TERTIARY ALCOHOL

Denise Silva de Aquino, Gustavo Paim Valença and Telma Teixeira Franco

School of Chemical Engineering, State University of Campinas, UNICAMP, P.O. Box, 13083-970,
Campinas-SP, Brazil

Abstract

The solubility of sucrose, fructose, glucose, xylose and maltose in tert-butanol and 2-methyl 2-butanol at 55 and 65°C and temperature effect was investigated. Fructose solubility was the highest among sugars studied and sucrose had the lowest solubility. The carbohydrates solubilities in tert-butanol are higher than in 2-methyl 2-butanol. The temperature did not influence the xylose solubility, since solubility at 65°C was close to the solubility at 55°C, but the high solubilities for the others sugars were obtained at 65°C

1. Introduction

There has been an increasing interest in the production of esters containing sugar molecules because of their wide employment as surfactants in detergent and pharmaceutical industries, as well as for medical and technical. Moreover, these esters are biodegradable, biocompatible and essentially non-toxic (KITAGAWA *et al.*, 2002; MUTHUKRISHNSN *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2004a; PARK *et al.*, 2003).

Acrylates are esters of acrylic acid that can cross-link through radical polymerisation of the double bond of the acid. In chemical process, the reactions would involve are normally carried out at high temperatures. Then, biocatalysis is an attractive option and the main advantage in using an enzyme in such an application is that this allows much lower temperatures to be used than required for chemical catalysis. Moreover, an enzyme enables milder and more specific catalysis. Moreover, enzymatic processes are highly specific with very few side reactions or products (VILLENEUVE, 2007; SABEDER *et al.*, 2006; FERRER *et al.*, 2005).

Lipases are the intuitive choice for enzymatical-catalysed acrylation. This enzymes are one of the first classes of enzyme to be employed in non-conventional media. Lipases are among the most useful enzymes for organic. Lipases have shown themselves to be highly efficient catalysts with a wide range of applicability (FERRER *et al.*, 2005; SOULTANI *et al.*, 2001, JAEGER *et al.*, 1998).

Enzymatic synthesis using lipases in organic medium is based on the ability of this enzyme to catalyze reverse hydrolysis, i.e. the formation of esters. When this reaction takes place in a medium with low water activity, the thermodynamic equilibrium is shifted towards the synthesis of ester instead of its hydrolysis (DORDICK, J. S., 1992). However, a major problem found in the synthesis is the choice of an appropriate solvent to solubilize substrates and products possessing different polarities (FLORES *et al.*, 2002).

Recent advanced in biocatalysis have suggested the use of nonaqueous solvent as the medium for enzymatic reactions. Organic solvents present certain advantages shifting equilibrium conversions towards the synthesis of esters (when hydrolytic enzymes are used) among others (TASSIOS & SPILIOTIS, 2000). Therefore, different strategies had

been used to overcome solubility problems. Solvents, such as pyridine, have been used to solubilize both the saccharides and the acylating agents (MUTUA & AKOH, 1993). However, most lipases are inactivated in those polar solvents. Furthermore, the major concern for their use is that these solvents are not compatible with the application of esters as food additives or probably in the pharmaceutical industry (FLORES *et al.*, 2002).

Less harmful solvents have also been used for the preparation of monoesters directly from solid carbohydrates with high selectivity and good yields. Acetonitrile, acetone, hexane, 2-methyl-2-butanol, and co-solvents such as dimethylsulfoxide have been used as solvents (TUSUKAMOTO *et al.*, 2008; TSUZUKI *et al.*, 1999; ZHANG & HAYES, 1999; DEGN *et al.*, 1999; OGUNTUNGBIN *et al.*, 1993). 2-methyl-2-butanol and other tertiary alcohols cannot be used as a substrate by most lipases because of steric factors that limit their accessibility to the active site. However, carbohydrate solubility is rather poor in all these alternative solvents, so there has to be a concern that the synthesis may be limited by substrate solubility and/or dissolution rate (FLORES *et al.*, 2002). A good contact between the two substrates must be obtained and the selected solvent must solubilize them at least partially. Therefore, intermediate polarity media are often chosen. Tertiary alcohols are especially good candidate (VILLENEUVE, 2007).

Voutsas *et al.* (2002) developed a new procedure for di- and trisaccharides acylation in which two miscible solvents were employed: tertiary alcohol as bulk solvent and dimethyl sulfoxide (DMSO) as cosolvent.

The aim of this work is to study the solubility of fructose, glucose, sucrose, xylose and maltose in two tertiary alcohols, TBA and 2M2B, and analyze the effect of temperature on the solubility. Two temperatures were studied, 55 and 65° C.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Sucrose (99,5%), fructose (99,5%), glucose (99,5%), maltose (99,5%) and 2-methyl 2-butanol (2M2B) (99%) were purchased from Aldrich Co. and xylose (99%) from Merck. Tert-butyl alcohol (TBA) was provided by Tedia. Both solvents were dried with molecular sieves 3Å (Sigma, 24506156), for 2 days before use.

2.2. Solubility measurements

Sample of 1g carbohydrate was added to 25 mL of TBA or 2M2B. The flasks were closed with a glass stopper and were placed in a shaker at 200rpm for 5 hours. Samples of 600 µL were withdrawn from the solution flasks during reaction for HPLC analysis. All experiment was carried out in duplicate.

2.3. Determination of carbohydrate concentration

The liquid chromatography system had a Waters 515 pump, a Waters 717 automatic injector and a Waters 410 differential refraction index detector. Millennium 32 software, version 3.05.01 (Waters Co., Milford, MA, USA) was used to control the system and to process signals. A Shodex SH1011 column (8×300 mm, 6 µm particle size) connected to a Shodex SH-G guard column (6×50 mm, 10 µm particle size) (SHOWA DENKO KK, Japan) filled with the same phase was used for separation of reaction products. The column was kept at 50°C. The mobile phase was a 0.001 N solution of sulfuric acid, with a flow

rate of 1 mL min^{-1} . The injection volume for the samples was $20 \text{ }\mu\text{L}$. Quantification of substrates was based on a calibration curve obtained from standard sugar solutions.

3. Results and discussion

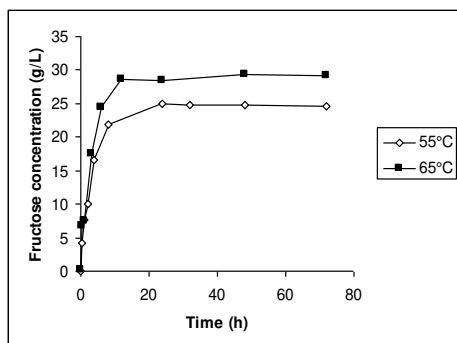
Effect of two organic solvent on sugar solubility was studied. It is important, that select organic solvent dissolves enough substrate to allow the lipase-catalyzed esterification. Furthermore, it should not affect lipase activity and selectivity (SABEDER *et al.*, 2006).

3.1. Carbohydrate solubility in TBA

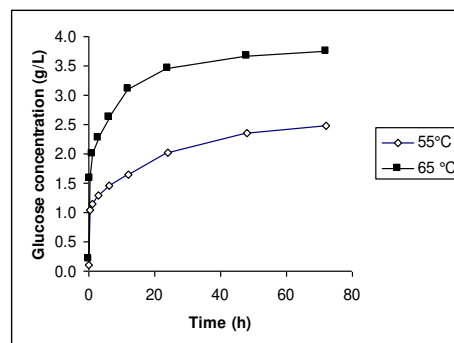
The carbohydrates solubilities in TBA were measured at two temperatures, 55 and 65°C. The results are presented in Figure 01. Fructose was more soluble than the others sugars studied (24g/L at 55°C and 29g/L at 65°C). Sucrose solubility was the lowest among carbohydrate (0,8g/L at 65°C). The temperature affected the carbohydrate solubility, because solubility at 65°C was higher than 55°C, but the temperature did not influence the xylose solubility, since solubility at 65°C was close to the solubility at 55°C (13,3g/L at 55°C and 12,8 g/L at 65°C).

Pederson et al. (2002) used TBA and 9:11 TBA:Pyridine to solubilize sucrose and maltose at 45°C. In TBA, the solubility of sucrose and maltose were 1.40g/L and 4.32g/L, respectively, and in 9:11 TBA:Pyridine, sucrose and maltose concentration were 9,24g/L and 73,59g/L. However, gravimetric method was used to determine the carbohydrate

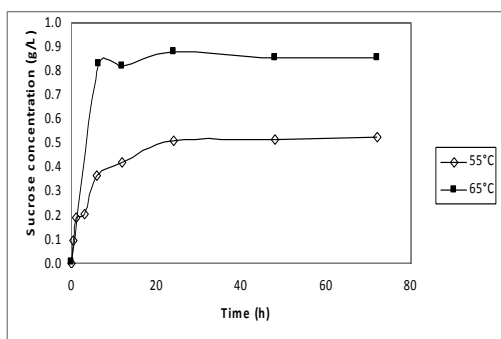
concentration. When polarity media increased the carbohydrate solubility high, but also increased the susceptibility of the enzyme to denaturation.



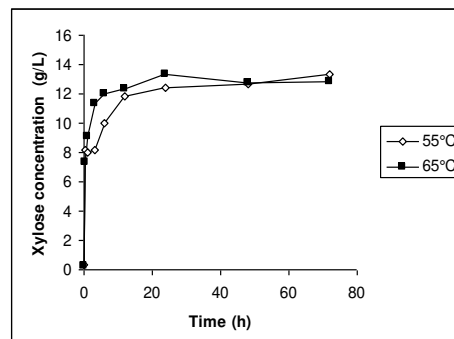
a)



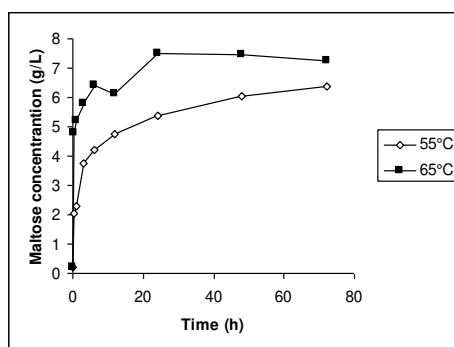
b)



c)



d)



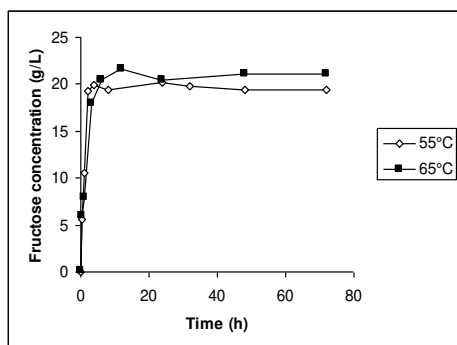
f)

Figure 01 Solubility of fructose (a), glucose (b), sucrose (c), xylose (d) and maltose (f) in TBA at 55 and 65°C.

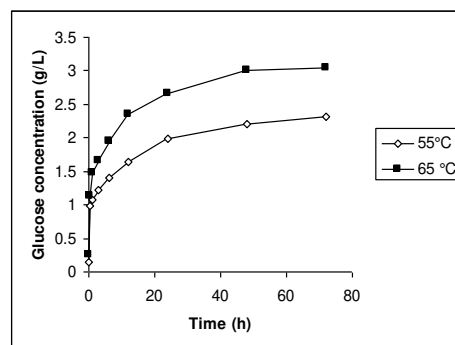
3.2. Carbohydrate solubility in 2M2B

The carbohydrates solubilities in 2M2B were measured at two temperatures, 55 and 65°C. The results are presented in Figure 02. The solubility of fructose was the highest among sugars studied (19 g/L at 55°C and 21 g/L at 65°C) while the solubility of sucrose was the lowest (0,5 g/L at 65°C). When 2M2B was used as a solvent to solubilize the carbohydrates, were found results similar to TBA, but at lower concentration. Then, similarly that it occurred with TBA, in the high temperature (65°C) obtained high solubility, except for xylose solubility (9,5 g/L at 55°C and 9,3 g/L at 65°C).

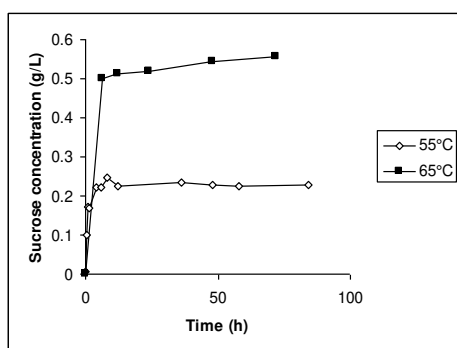
Chamouleau et al. (2001) e Soutani et al. (2001) studied fructose solubility in 2M2B at 60°C and obtained 11 e 25 g/L, respectively. From the work of Scheckermann et al (1995) fructose solubility in 2M2B at 55°C was 10 g/L. The solubility of glucose was studied in 2M2B at 60°C by Tsavas et al. (2002a) and Flores et al. (2002), fructose concentration found was 2,4 and 2,6g/L, respectively. Tsavas et al. (2002b) solubilized sucrose in 2M2B at 30°C and 60°C, and obtained 0,21 g/L and 0,42 g/L, respectively.



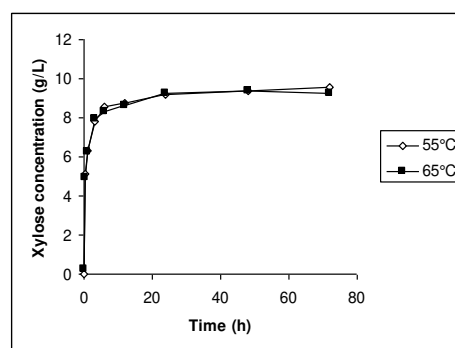
a)



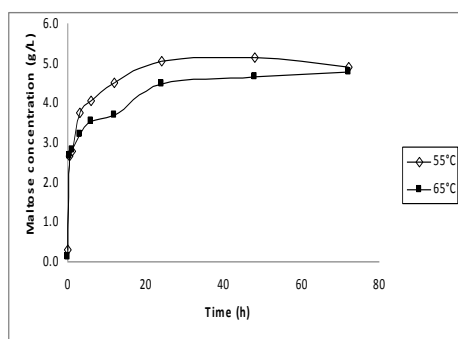
b)



c)



d)



f)

Figure 02 Solubility of fructose (a), glucose (b), sucrose (c), xylose (d) and maltose (f) in 2M2B at 55 and 65°C.

4. Conclusion

In this work new data were measured for the solubility of sucrose, fructose, glucose, xylose and maltose in TBA and 2M2B at 55 and 65°C. Fructose was more soluble than the others sugars studied. Sucrose solubility was the lowest among carbohydrate. The results show that the carbohydrates solubilities in TBA are higher than in 2M2B, because the TBA is less polar. Therefore the TBA is suitable organic solvent required to dissolve carbohydrate used with substrate in the enzymatic esterification with acrylic acid. Furthermore, the TBA is a tertiary alcohol and it not affect lipase activity and selectivity.

The temperature did not influence the xylose solubility, since solubility at 65°C was close to the solubility at 55°C, but the high solubilities for the others sugars were obtained at 65°C

Acknowledgments

Support by FAPESP, CAPES and Cnpq Brazil is gratefully acknowledge

REFERENCES

CHAMOULEAU, F.; COULON, D.; GIRARDIN, M.; GHOU, M., Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalized synthesis in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 949-954, 2001.

- DEGN, P.; PEDERSEN, L. H.; DUUS, J.; ZIMMERMANN, W. Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid esters in *tert*-butanol. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 275-280, 1999.
- DORDICK, J. S.; Designing enzymes for use in organic solvents. **Biotechnology Progress**, v. 8, p. 259-267, 1992.
- FERRER, M. et al. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces langinosus* and *Candida Antarctica* B, and their antimicrobial properties, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 391-398, 2005.
- FLORES, M. V.; NARAGHI, K.; ENGASSER, J. M.; HALLING, P. J., Influence of glucose solubility and dissolution rate on the kinetics of lipases catalized synthesis of glucose laurate in 2-metil-2-butanol, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 7, p. 817-821, 2002.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, **Trends Biotechnology**, v. 16, n. 9, p 396-403, 1998.
- KITAGAWA M.; RAKU, T.; SHIMAKAWA, H.; FRAN, H.; TOKIWA, Y.; Effect of water on the enzyme synthesis of vinyl sugar ester in hydrophilic organic solvent. **Macromolecular Bioscience**, v. 2, p. 233-237, 2002.
- MUTHUKRISHNAN, S.; NITSCHKE, M.; GRAMM, S.; OZYREK, Z.; VOIT, B.; WERNER, C.; et al.; Immobilized hyperbranched glycoacrylate films as bioactive supports. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, p. 658-666, 2007.

- MUTUA, L. N.; AKOH, C. C.; Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida sp.* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, p. 43-46, 1993.
- NORDBLAD, M.; ADLERCREUTZ, P.; Effects of acid concentration and solvent choice on enzymatic acrylation by *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Biotechnology**, v. 133, p 127-133, 2008.
- OGUNTIMEIN, G. B.; ERDMANN, H.; SCHMID, R.D., Lipase catalyzed synthesis of sugar ester in organic solvents, **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 2, p. 175-180, 1993.
- PARK, D. W.; HAAM S.; IK-SUNG, A.; LEE T.G.; KIM, H. S.; KIM, W. S.; Enzymatic esterification of β -methylglucoside with acrylic/methacrylic acid in organic solvents, **Journal of Biotechnology**, v 107, p. 151-160, 2003.
- PARK, D. W.; HAAM S., LEE T.G.; KIM, H. S.; KIM, W. S.; Chemoenzymatic synthesis of sugar-containing biocompatible hydrogel: Crosslinked poly(β -methylglucosideo acrylate) and poly(β -methylglucosideo methacrylate), **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v 71A, n° 3, p. 497-507, 2004.
- PEDERSEN, N. R.; WIMMER, R.; EMMERSEN, J.; DEGN, P.; PEDERSEN, L. H. Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalysed esterification of disaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1179-1184, 2002.
- SABEDER, S.; HABULIN, M.; KNEZ, Z. Lipase –catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 880-886, 2006.

- SCHECKERMANN, C.; SCHLOTTERBECK, A.; SMIDT, M.; WRAY, V.; LANG, S.
Enzymatic monoacylation of fructose by two procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 157–162, 1995.
- SOULTANI, S.; ENGASSER, J.M.; GHOUL, M. Effect of acyl donor chain length and sugar / acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 725-731, 2001.
- TASSIOS, D.; SPILIOTIS, N.; A Unifac model for phase equilibrium calculations in aqueous and nonaqueous sugar solutions, **Fluid Phase Equilibria**, v. 173, p. 39-55, 2000.
- TSADAS, P.; POLYDOROU, S.; FAFLIA, I.; VOUTAS, E. C.; TASSIOS, D., Solubility of glucose in mixtures containing 2-methyl-2-butanol, dimethyl sulfoxide, acids, esters, and waters. **Journal of chemical and Engineering Data**, v. 47, p. 1517-1520, 2002a.
- TSAVAS, P.; et al. Solubility of glucose in mixture containing 2-methyl-2-butanol, dimethyl sulfoxide, acids, esters and water. **Journal of chemical and Engineering Data**, v. 47, p. 807-810, 2002b.
- TSUKAMOTO, J.; HAEBEL, S.; VALENÇA, G. P; PETER, M. G.; FRANCO, T. T.
Enzymatic direct synthesis of acrylic acid esters of mono- and disaccharides. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1486-1492, 2008
- TUZUKI, W.; KITAMURA, Y.; SUZUKI, T.; KOBAYASHI, S. Synthesis of sugar fatty acid esters by modified lipase. **Biotechnology Bioengineering**, v. 64, p. 267-271, 1999.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**. v. 25, p. 515-536, 2007.

VOUTSAS, E. C; TSADAS, P.; MAGOULAS, K.; TASSIOS, D., Solubility measurements of fatty acid glucose and sucrose esters in 2-methyl-2-butanol and mixtures of 2-methyl-2-butanol with dimethyl sufoxide. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 47, p. 1517-1520, 2002.

ZHANG, X.; HAYES, D. G. Increased rate of lipase-catalyzed saccharide-fatty acid esterification by control of reaction medium. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p. 1495-1500, 1999.

CAPÍTULO IV – Mecanismo cinético da esterificação enzimática da sacarose com ácido acrílico.

Este capítulo é referente ao artigo “*Kinetic mechanism of the enzymatic esterification of sucrose with acrylic acid*” o qual foi submetido no periódico *New Biotechnology*.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da composição do meio reacional, tais como quantidade de biocatalisador, razão molar sacarose:ácido acrílico, quantidade inicial de água no sistema reacional e a quantidade de peneira molecular para remoção da água produzida durante a reação, com o objetivo de maximizar a conversão de sacarose. Foi proposto um mecanismo cinético para a reação de esterificação foi realizado o estudo cinético da reação de esterificação enzimática da sacarose com o ácido acrílico catalisada pela lipase Novozym 435. O mecanismo proposto foi o Pingue Pongue Bi Bi. Segundo a literatura, este é o mecanismo aceito para as reações catalisadas por lipases, pois essas enzimas, catalisam reações entre dois substratos e podem tanto catalisar a reação de hidrólise quanto a reação inversa, a esterificação. Foram determinadas as constantes de equilíbrio e as constantes cinéticas da reação em estudo. Portanto, foi possível obter a expressão da taxa desta reação.

Kinetic mechanism of the enzymatic esterification of sucrose with acrylic acid.

Denise S. de Aquino, Gustavo Paim Valença and Telma Teixeira Franco

School of Chemical Engineering, State University of Campinas, UNICAMP, P.O. Box 6066,
13083-970, Campinas-SP, Brazil

Abstract

The equilibrium and kinetics constants of the esterification reaction of sucrose with acrylic acid catalyzed by lipase Novozym 435 were determined and therefore it was possible to get the rate equation for this reaction. Sucrose to acrylic molar ratio of 1:6, amount of enzyme of 1.95 g, the least amount of water in the reaction media and 400g/L resulted in the highest conversion approximately 76 %. The analysis of the kinetic data showed that the esterification follows a Ping-Pong Bi Bi mechanism.

1-Introduction

Renewable sugars are interesting alternative carbon sources for the production of chemicals by biotechnological routes. The low cost and availability of sucrose in Brazil makes it a highly desirable starting material for the preparation of new commercial products. The Brazilian production of sucrose in 2008 was 31 million ton (MAPA, 2009). In addition, sucrose has been used as a model sugar substrate in many studies of chemical synthesis.

Sugar esters have received considerable attention owing to their unique properties, such as biocompatibility, and potential for medical applications (CHANG & SHAW, 2010;

QUENEAU *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2004; GRUBER & KNAUS, 2000). Various types of synthetic carbohydrate ester have been described in the scientific literature (CHANG & SHAW, 2010; QUENEAU *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2000; LIU & DORDICK, 1999).

Hydrogels are lightly cross-linked polymer networks that swell in water. Hydrogels are widely used as superabsorbent to be highly hydrophilic and to have high capacity to absorb water. Sugar-based cross-linked hydrogels are hydrophilic and biocompatible, properties that are important in medicine and biomedical engineering as superabsorbents, contact lenses, and matrices for drug delivery systems. Typically, hydrogels are excellent matrix for drug delivery system for media and immobilization of enzymes (HOARE & KOHANE, 2008, QUENEU *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2002). Sugar esters of acrylic acid have been investigated for their biomedical applications. The carboxylic group in both acrylic and methacrylic acids makes them hydrophilic. In addition, both acids are able to form esters with the hydroxyl group of sugars. Both acids also have a vinyl group that can be polymerized. Therefore, both sugar esters of acrylic and methacrylic acid are expected to be efficient monomers for sugar polymers (QUENEU *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2004).

Acrylates can be synthesized using enzyme catalysis in non-aqueous media (PROPESCU, *et al.*, 2010, NORDBLAD & ADLERCREUTZ, 2008a; NORDBLAD & ADLERCREUTZ, 2008b; FERRER *et al.*, 2005; SOULTANI *et al.*, 2001, JAEGER *et al.*, 1998). Enzymatic synthesis using lipases in organic medium is based on the ability of this enzyme to catalyze the formation of esters. When this reaction takes place in a medium with low water activity, the thermodynamic equilibrium is shifted towards the synthesis of the ester (DORDICK, J. S., 1992).

The study of kinetics is of great importance, as to elucidate mechanism of this reaction as to get reliable information about the rate of product formation that are needed for the design of reactors and for industrial scale up (BEZBRADICA *et al.*, 2006). Kinetic mechanisms have been proposed for the description of lipase-mediated reactions: for example, the Michaelis-Menten uni-uni mechanism and ping-pong bi-bi mechanism (PAIVA *et al.*, 2000). The most generally accepted mechanism for lipase-catalyzed esterification reactions is the ping-pong bi-bi mechanism, because in general lipase catalyses reaction with two substrate and can catalyses both hydrolysis and esterification reaction (HUSSON, 2010; YU *et al.*, 2008, DANESHFAR *et al.*, 2007, FLORES & HALLING, 2002, ARCOS *et al.*, 2001, JANSSEN *et al.*, 1999).

In the ping-pong bi-bi kinetic mechanism, two products are formed from two substrates. Thus, in the lipase-catalyzed esterification reaction the carboxylic acid is first bound to the enzyme. Subsequently the water is released to form an acyl-enzyme and the sugar then binds to the acyl-enzyme to yield sugar ester and regenerate the free enzyme (FLORES & HALLING, 2002; ARCOS *et al.*, 2001; SEGEL 1975).

The aim of present work was to study the kinetic of the esterification of sucrose with acrylic acid by means of immobilized lipase B from *Candida antarctica* (Novozym 435) in t-butanol. Detailed investigation at different amounts of enzyme and water, sucrose to acrylic acid molar ratio and molecular sieves content were carried out.

2- Materials and Methods

2.1. Materials

Novozym 435 (lipase B from *Candida Antarctica*, immobilized on a macroporous acrylic resin 10,000 Propyl Laurate Units per gram, PLU/g) was kindly provided by Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Denmark). Acrylic acid (AA) 99% (contained 0.02% of hydrochinonmonomethylether) and sucrose (S) were purchased from Aldrich Co. and t-butanol (TBA) was provided by Tedia Company Inc..

2.2 Enzymatic esterification

2.2.1 Saturated sucrose solution

Prior to reaction, TBA was dried with molecular sieves, as follows: 3 g of molecular sieve 3A (Sigma, 24506156) was added to 50 mL of TBA at room temperature and left in a closed flask for 72 h. Sucrose (0.85 g) was dissolved in 1 liter of TBA at 200 rpm and 65°C for 12 hours.

2.2.2 Effect of the amount of enzyme and water

Acrylic acid (0.372 mmol, 0.025 mL) was mixed to a saturated sucrose solution (0,062 mmol, 24.975mL) at sucrose to acrylic acid molar ratio of 1:6 with 0% or 0.10% (v/v) of water in a 50 mL Erlenmeyer flask. The total reaction volume was always 25 mL. The reaction was started by adding 0.65 g or 1.95 g of lipase Novozym 435 at 65°C. The vessel was closed with a glass stopper and the reaction flasks were placed in a shaker at 200

rpm for 5 hours. Samples of 1 mL were withdrawn from the reaction flasks at 30 min intervals for HPLC and Karl Fisher analysis.

2.2.3 Effect of the sucrose to acrylic acid molar ratio

Two sucrose to acrylic acid molar ratios were used, namely, 1:6 (acrylic acid 0.372 mmol, 0.025 mL) and 1:12 (acrylic acid 0.744 mmol, 0.051 mL). Acrylic acid was mixed with saturated sucrose solution in a 50 mL Erlenmeyer flask, the total reaction volume of 25 mL. Reactions were started by adding 1.95 g of lipase Novozym 435. The vessel was closed with a glass stopper and the reaction flasks were placed in a shaker at 200 rpm for 5 hours at 65°C. Samples of 1 mL were withdrawn from the reaction flasks at 30 min intervals during reaction for HPLC and Karl Fisher analysis.

2.2.4 Enzymatic esterification and hydrolysis

The enzymatic esterification was carried out mixing acrylic acid (0.372 mmol, 0.025 mL) with 24.975 mL of saturated sucrose solution of TBA in a molar ratio 1:6 (sucrose: acrylic acid) in a 50 mL Erlenmeyer flask, the total volume of 25 mL. Reaction was started by adding 1.95 g of lipase Novozym 435. The vessel was closed with a glass stopper and the reaction flasks were placed in a shaker at 200 rpm for 1 hour at 65°C. Samples of 1 mL were withdrawn from the reaction flasks at 30 min intervals during reaction for HPLC and Karl Fisher analysis. Subsequently, excess water (10 μ L) was added to the reaction mixture to shift the equilibrium to the reverse reaction, hydrolysis. The reaction flasks were placed

in a shaker at 200 rpm, at 65°C for 3.5 hours. Samples of 1 mL were withdrawn during reaction for HPLC and Karl Fisher analysis.

2.2.4 Effect of molecular sieves

Acrylic acid (0.372 mmol, 0.025 mL) was mixed to a 24,975 mL of saturated sucrose solution of TBA at a sucrose to acrylic acid molar ratio of 1:6 in a 50 mL Erlemeyer flask. The molecular sieves were added in the mixtures with the amounts of 0, 100 and 200 g/L. The total reaction volume was always 25 mL. The reaction was started by adding 0.65 g or 1.95 g of lipase Novozym 435. The vessel was closed with a glass stopper and the reaction flasks were placed in a shaker at 200 rpm for 5 hours at 65°C. Samples of 0.8 mL were withdrawn from the reaction flasks at 30 min intervals for HPLC and Karl Fisher analysis. These assays were done with dried solvent.

2.2.5 Kinetic measurement

The study of kinetic of lipase-catalyzed esterification was carried out. Then, two flasks were prepared. One flask, 0,025 mL of acrylic acid was mixed with 24,975 mL of saturated sucrose solution of TBA in a molar ratio 1:6 (sucrose: acrylic acid) in a 50 mL Erlemeyer flask, the total volume of 25 mL. The other flask the acrylic acid was mixed with saturated sucrose solution in a molar ratio 1:12 (sucrose: acrylic acid) in a 50 mL Erlemeyer flask, the total volume of 25 mL. Reaction was initiated by adding 1,95 g of lipase Novozym 435. Reactions was carried out in a shaker at 200 rpm for 30 minutes at 65°C. Samples of 1 mL were withdrawn during reaction for analysis in HPLC and Karl Fisher.

2.3 Determination of sucrose concentration

The liquid chromatography system had a Waters 515 pump, a Waters 717 automatic injector and a Waters 410 differential refraction index detector. Millennium 32 software, version 3.05.01 (Waters Co., Milford, MA, USA) was used to control the system and to process signals. A Shodex SH1011 column (8×300 mm, 6 µm particle size) connected to a Shodex SH-G guard column (6×50 mm, 10 µm particle size) (SHOWA DENKO KK, Japan) filled with the same phase was used for separation of reaction products. The column was kept at 50 °C. The mobile phase was a 0.001 N solution of sulfuric acid, with a flow rate of 1 mL min⁻¹. The injection volume for the samples was 20 µL. Quantification of substrates was based on a calibration curve obtained from standard sugar solutions.

2.4 Determination of water content

The water content of the reaction mixture was measured using the Karl Fisher method (831 KF Coulometer, Metrohm, Switzerland). The water content was automatically calculated by consumption of an organic base (HYDRANAL Coulomat AGI, Riedel-deHaën, 6247C) in % unit.

3 Results and discussion

3.1 Effect of enzyme quantity and water concentration

The effect of amount of enzyme on the sucrose conversion was determined using lipase Novozym 435. At 65°C the maximum conversion is achieved (Table 3.1) in the first

30 minutes. When 1.95 g lipase Novozym 435 was used the sucrose conversion was about 20% while when 0.65 g of lipase Novozym 435 was used the conversion was about 7%.

The concentration of water varied from 0 to 0.10 % (v/v). The solvent was dried with molecular sieve 3A prior to the use and then used in the reaction. The sucrose conversion (Table 3.1) was found to decrease with increasing amounts of water, which could be attributed to a shift in the equilibrium towards the reactant (onset of the reverse reaction) (MA *et al.*, 2002, WEHJE *et al.*, 1997, COLOMBIÉ *et al.*, 1998, HALLING, 1994).

Table 3.1 Sucrose conversion (%) for a 1:6 sucrose to acrylic acid molar ratio during 5 hours and 65°C.

Time (h)	Without Water				With Water (0.10% v/v)			
	0.65 g enzyme		1.95 g enzyme		0.65 g enzyme		1.95 g enzyme	
0	0.000 ^a	± 0.000	0.000 ^a	± 0.000	0.000 ^a	± 0.000	0.000 ^a	± 0.000
0.5	6.688 ^b	± 0.130	19.404 ^b	± 0.533	2.988 ^b	± 0.371	14.447 ^b	± 0.375
1	6.442 ^b	± 0.376	19.082 ^b	± 0.695	3.361 ^b	± 0.370	15.103 ^b	± 0.094
2	6.850 ^b	± 0.293	17.561 ^b	± 0.142	3.361 ^b	± 0.184	14.540 ^b	± 0.469
3	6.525 ^b	± 0.131	17.397 ^b	± 0.784	2.988 ^b	± 0.371	15.009 ^b	± 0.375
4	6.198 ^b	± 0.133	17.320 ^b	± 0.224	2.707 ^b	± 0.278	14.353 ^b	± 0.094
5	6.196 ^b	± 0.622	17.480 ^b	± 0.383	2.988 ^b	± 0.190	15.103 ^b	± 0.094

a and b Tukey test

The addition of water beyond a critical amount probably increases the thickness of the water layer around the enzyme and causes the diffusion problem (YADAV & LATHI,

2003). Organic substrate and product with poor solubility in aqueous media will diffuse through the water layer to the active site of the enzyme. Thus, the activity of the enzyme can depend on induced inactivation or partition of components between bulk solvent and microenvironment of enzyme (YADAV & LATHI, 2003, PÁEZ *et al.*, 2003).

3.2 Effect of molar ratio of sucrose and acrylic acid

The esterification reaction was run at different molar ratios of sucrose and acrylic acid to determine its effects on the sucrose conversion. The amount of enzyme was fixed at 1.95 g, the temperature at 65°C and the agitation speed at 200 rpm. Samples from the reactor were withdrawn at different times and analyzed for sucrose concentration as described in the previous section. The sugar conversion for esterification of sucrose with acrylic acid (Figure 3.1) after 30 minutes was 19 % for 1:6 sucrose to acrylic acid molar ratio and 10 % for 1:12 sucrose to acrylic acid molar ratio. The sucrose conversion decreased with the increasing molar ratio. The decrease in sucrose conversion can be explained by possible substrate inhibition of the enzyme by acrylic acid. Inhibitory effects caused by carboxylic acid have been reported such as for esterification of isoamyl alcohol with acetic acid and octanol with acrylic acid, both reaction were catalyzed by lipase Novozym 435 (ROMERO *et al.*, 2007, NORDLBLAD & ADLERCREUTZ, 2008).

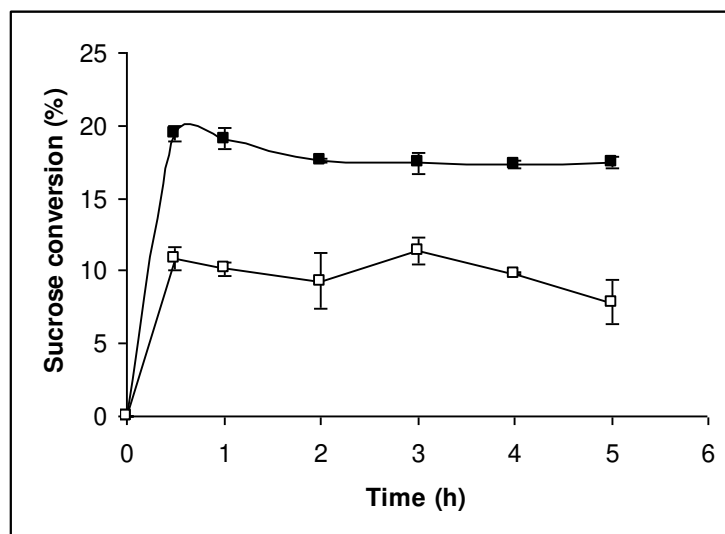


Figure 3.1 Effect of molar ratio on the esterification of sucrose with acrylic acid (■)1:6 and (□) 1:12.

Romero et al. (2007) concluded that an increase in the amount of acid results in a decrease in the pH of reaction causing a decrease in the enzyme activity depending on the acidity of the microaqueous layer around the enzyme.

3.3 Enzymatic esterification and hydrolysis

The esterification of sucrose with acrylic acid using lipase Novozym 435 was carried out. Subsequently water was added to shift the reaction equilibrium to the reverse reaction, hydrolysis.

Lipase Novozym 435 catalyzes both esterification and hydrolysis reactions. Enzymatic esterification reached equilibrium in 30 minutes with a maximum sucrose conversion about 20 % (Table 3.2) while enzymatic hydrolysis reached equilibrium in 3 hours with a sucrose conversion of about 4 % (Table 3.3).

Table 3.2 Synthesis of sucrose acrylate by esterification of sucrose with acrylic acid using Novozym 435.

Time (h)	Sucrose Conversion (%)	
0	0.000 ^a	± 0.000
0.5	20.718 ^b	± 0.972
1	18.745 ^b	± 1.537
1.5	18.958 ^b	± 0.929
2	19.168 ^b	± 0.127

Table 3.3 Sucrose acrylate hydrolysis catalyzed by Novozym 435.

Time (h)	Sucrose Conversion (%)	
0	19.521 ^a	± 0.084
1	19.591 ^a	± 0.014
2	17.477 ^b	± 0.270
3	16.420 ^c	± 0.082
6	15.434 ^d	± 0.222
15	11.205 ^e	± 0.219
24	7.541 ^f	± 0.076
36	7.822 ^f	± 0.206
48	7.611 ^f	± 0.136

The peak for the esterification product decreased after water was added to the reaction media suggesting this product was sucrose acrylate, the product of the esterification sucrose with acrylic acid in agreement with the work of Tsukamoto et al.

(2008) who confirmed the formation of sucrose monoacrylate by esterification of sucrose with acrylic acid catalyzed by Novozym 435 at 55°C using matrix assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF).

3.4 Effect of Molecular Sieves

Water produced by the esterification reaction may limit the synthesis of esters. When different amounts of molecular sieves were added to reaction media, the most of the water produced was removed from the reaction system. In this case no product inhibition of water occurred when 400g/L of molecular sieves was added and about 76% of the sucrose was converted to sucrose acrylate after 4 hours of reaction, a four fold increase in sucrose conversion. The sucrose conversion in the esterification reaction with 100 g/L, 200 g/L, 300 g/L, and 400 g/L of molecular sieve were 40%, 60%, 70% and 76%, respectively, and 20% when no molecular sieve was added to the reaction media (Fig 3.2). The sucrose conversion increased when the amount of molecular sieve added to the reaction media increased from 100 g/L to 300 g/L. When 400 g/L of molecular sieve were added to the reaction media, the increase in sucrose conversion was slightly higher than when 300 g/L were added to the reaction media. In the system with 400 g/L of molecular sieve 25% more molecular sieve was added to the reaction as compared to when 300 g/L was added. However, the sucrose conversion was only 6% higher. Similar results have been reported for the esterification of glucose with palmitic acid by lipase, where 90% of glucose was converted to glucose palmitate after 48 hours incubation, while the conversion without molecular sieves was less than 20% (TSUZUKI *et al.*, 1999). Giacometti *et al.*(2001) used lipase from *Mucor miehei* in the esterification of glycerol with oleic acid. The conversion

of oleic acid was higher in the system with molecular sieves than in the system without molecular sieves.

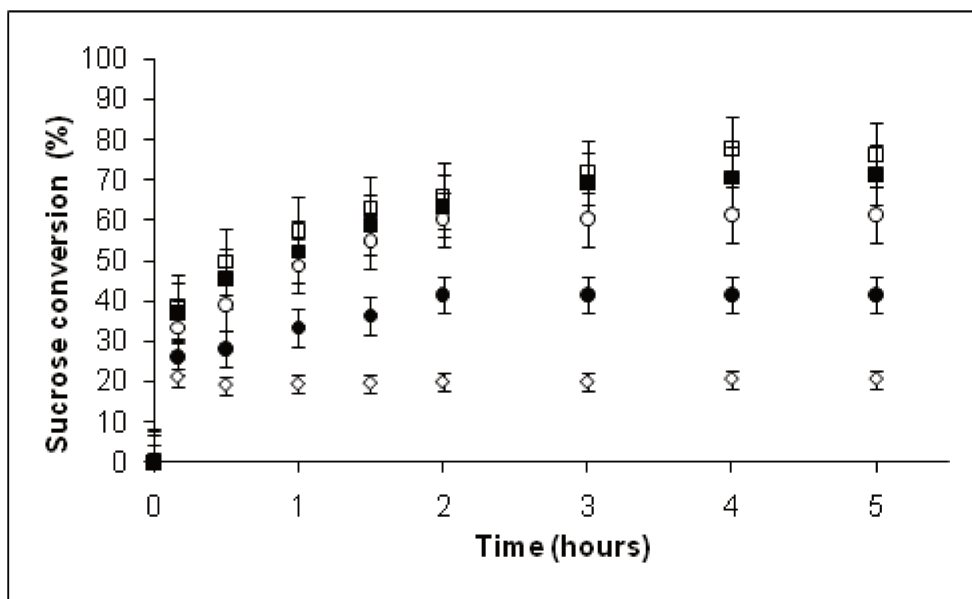


Figure 3.2 Effect of molecular sieves on the sucrose conversion on the esterification of sucrose with acrylic acid.

(□) 400g/L of molecular sieves (■) 300g/L of molecular sieves (○) 200 g/L molecular sieves, (●) 100 g/L molecular sieves and (◇) without molecular sieves.

The most of the water was entrapped by the molecular sieve (Fig. 3.3). The amount of water in the reaction system was the sum of the water produced by esterification and the water released by the biocatalyst (Fig. 3.4).

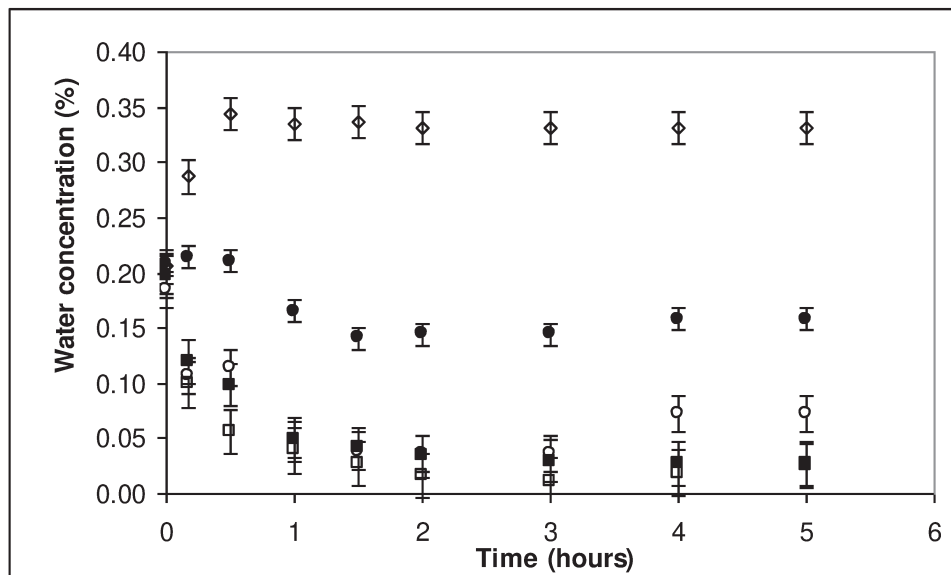


Figure 3.3 Effect of molecular sieves on the water concentration (w/w) on the esterification of sucrose with acrylic acid. . (□) 400g/L of molecular sieves (■) 300g/L of molecular sieves (○) 200 g/L molecular sieves, (●) 100 g/L molecular sieves and (◇) without molecular sieves.

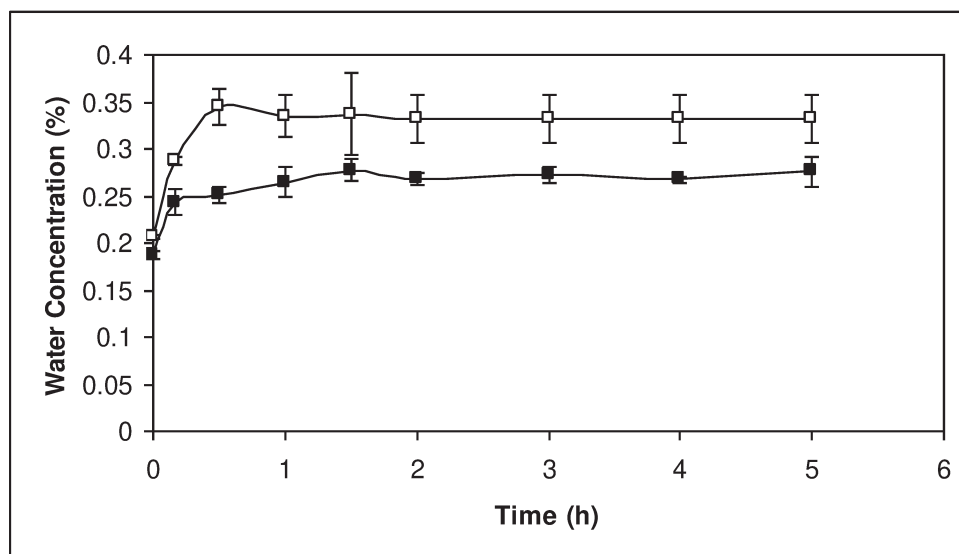


Figure 3.4 Water concentration released into medium (□) medium was TBA, sucrose, acrylic acid and lipase Novozym 435 and (■), medium was TBA and lipase Novozym 435.

As the conversion increased with an increase in the amount of molecular sieve added to the reaction media, it took longer for equilibrium to be reached (Fig 3.2). These results are in good agreement with those of Sakaki et al. (2006) who observed that a decrease in water concentration in the reaction of fructose with palmitic acid catalyzed by Novozym 435 required more time – about 32 hours – to reach equilibrium, while the fructose conversion was increased from 17% to 66%.

3.5 Kinetic mechanism

The experimental data obtained in the present study were interpreted in terms of a Ping-Pong Bi-Bi mechanism (YU *et al.*, 2008, FLORES & HALLING, 2002, ARCOS *et al.*, 2001, PAIVA *et al.*, 2000, 1999, SEGEL, 1975). In this mechanism the lipase first binds to acrylic acid, forming an acylated form of the enzyme and releases water. Next, the acylated form of the enzyme reacts with sucrose, and an ester bond is formed with one of the available hydroxyl groups on the substrate. Thus, the water in the reaction media comes from that released by lipase (Eq. 01) and formed during the esterification reaction (Eq. 03). In order to obtain the rate of sucrose consumption the following sequence of steps was first considered:



where E, A, S, W and P refer to free enzyme, acrylic acid, sucrose, water and sucrose acrylate, respectively. In the beginning of the reaction step (3) maybe taken as the rate

determining step and irreversible and steps (1) and (2) are assumed to be in equilibrium,
then the following set of equations are obtained

$$K_1 = \frac{[E \cdot A] \cdot [W]}{[E] \cdot [A]} \quad (4)$$

$$K_2 = \frac{[E \cdot A \cdot S]}{[E \cdot A] \cdot [S]} \quad (5)$$

The rate of reaction is given by the rate of reaction (3)

$$\frac{dC_s}{dt} = k_3 \cdot [E \cdot A \cdot S] \quad (6)$$

Where

$$[E \cdot A \cdot S] = K_1 K_2 \frac{[E] \cdot [A] \cdot [S]}{W} \quad (7)$$

Thus, the rate of sugar consumption at the beginning of the reaction is given by

$$\frac{dC_s}{dt} = \frac{k_3 \cdot K_1 K_2 [E_t][A] \cdot [S]}{[W] + K_1[A] + K_1 K_2[A][S]} \quad (8)$$

Equation (8) was obtained for t as a function of the sucrose conversion

$$t = \frac{\frac{C_w}{C_s^0(\theta_a - 1)} \ln\left(\frac{\theta_a - X}{\theta_a(1 - X)}\right) - \frac{K_1 C_s^0 \ln(1 - X)}{C_s^0} - K_1 K_2 C_s^{02} X}{K_1 K_2 k_3 C_{Et}} \quad (9)$$

Equation (9) was expanded as a Taylor series and fit by a linear equation for $X \ll 0$.

The results are shown in Table 3.4.

Table 3.4 Kinetics parameters for the synthesis of sucrose acrylate by esterification sucrose with acrylic acid using lipase Novozym 435.

Parameters	Value
K_1	11.118
K_2	0.4173
K_3	3.7949

In order to obtain the rate expression for the case where reaction is no longer irreversible, the following sequence of steps were considered



where E, A, S, W and P refer to free enzyme, acrylic acid, sucrose, water and sucrose acrylate, respectively. If step (12) is taken as the rate determining step and steps (10), (11), (13), (14), (15) and (16) are assumed to be in equilibrium, then the following set of equations are obtained

$$K_8 = \frac{[M.E]}{[M].[E]} \quad (17)$$

$$K_9 = \frac{[W.E]}{[W].[E]} \quad (18)$$

The rate of reaction is given by the rate of reaction (12)

$$\frac{dC_s}{dt} = k_3 \cdot [E \cdot A \cdot S] - k_3 [M \cdot E \cdot W] \quad (19)$$

Where

$$[E \cdot A \cdot S] = K_1 K_2 \frac{[E] \cdot [A] \cdot [S]}{W} \quad (20)$$

and

$$[M \cdot E \cdot W] = \beta \cdot K_8 K_9 [M][E][W] \quad (21)$$

Then, the rate of sugar consumption is given by

$$\frac{dC_s}{dt} = \frac{k_3 \cdot K_1 K_2 [E_t][A] \cdot [S] - k_3 \beta K_8 K_9 [M][E_t][W][W]}{[W] + K_1 [A] + K_1 K_2 [A][S] + \beta \cdot K_8 K_9 [M][W]^2 + K_8 [M][W] + K_9 [W]^2} \quad (22)$$

Equation (15) was obtained for t as a function of the sucrose conversion

$$t = \frac{1}{C_{Et}} \left[\frac{C_w}{\sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}}\right)^2 + 4C_s^{02}\theta_a}} \ln \left(\frac{2C_s^0 X + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}}\right) - \sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}}\right)^2 + 4C_s^{02}\theta_a}}{2C_s^0 X + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}}\right) + \sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}}\right)^2 + 4C_s^{02}\theta_a}} \right) + \dots \right. \\ \left. \dots + \frac{K_1 C_s^0}{C_{Et}} \left[\frac{1}{2C_s^0} \ln \left(C_s^0 X^2 + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}}\right) X + C_s^0 \theta_a \right) \right] + \dots \right] \quad (23)$$

$$\begin{aligned}
& \dots + \frac{K_1 C_S^0}{C_{Et}} + \frac{2C_S^0 - \left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right)}{2C_S^0 \sqrt{\left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right)^2 + 4C_S^{0^2} \theta_a}} \ln \left[\frac{2C_S^0 X + \left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right) - \sqrt{\left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right)^2 + 4C_S^{0^2} \theta_a}}{2C_S^0 X + \left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right) + \sqrt{\left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right)^2 + 4C_S^{0^2} \theta_a}} \right] + \dots \\
& \dots + \frac{K_1 K_2 C_S^{0^2}}{C_{Et}} \left[\frac{X}{C_S^0} - \frac{C_S^0(1+\theta_a) + \left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right)}{2C_S^{0^2}} \ln \left[\frac{2C_S^0 X + \left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right) - \sqrt{\left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right)^2 + 4C_S^{0^2} \theta_a}}{2C_S^0 X + \left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right) + \sqrt{\left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right)^2 + 4C_S^{0^2} \theta_a}} \right] \right] + \dots \\
& \dots + \left(\frac{\beta K_8 K_9 C_w^2 C_S^0 - K_8 C_w}{C_{Et}} \right) \left[\frac{1}{2C_S^0} \ln \left(C_S^0 X^2 + \left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right) X + C_S^0 \theta_a \right) \right] - \dots \\
& \dots - \left(\frac{\beta K_8 K_9 C_w^2 C_S^0 - K_8 C_w}{C_{Et}} \right) \left[\frac{\left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right)}{2C_S^0 D} \ln \left[\frac{2C_S^0 X + \left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right) - \sqrt{\left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right)^2 + 4C_S^{0^2} \theta_a}}{2C_S^0 X + \left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right) + \sqrt{\left(C_S^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{overall}} \right)^2 + 4C_S^{0^2} \theta_a}} \right] \right]
\end{aligned}$$

where C_S^0 is initial concentration of sucrose, C_w is concentration of water and θ_a is molar ratio between sucrose and acrylic acid. The equilibrium constant for the overall reaction is given by

$$K_{overall} = \frac{C_M C_W}{C_S C_A} = \frac{k_3 K_1 K_2}{k_3 \beta K_8 K_9} \quad (24)$$

Equation (23) was solved numerically using nonlinear regression to estimate the kinetic parameters K_8 , K_9 and β by POLYMATH 6.0 software. The results are shown in Table 3.5.

Table 3.5 Kinetics parameters for the synthesis of sucrose acrylate by esterification sucrose with acrylic acid using lipase Novozym 435.

Parameters	Value
K_8	9.6241
K_9	11.099
β	1.0206

The criterion used to value the quality of data fit was 95 % confidence level. For the regression model to be stable and statistically valid, the confidence intervals must be smaller than the respective parameter values (in absolute values). The value of 95 % confidence was small for all kinetic parameters R^2 was 0.9926 and variance 0.00502.

A plot of experimental values versus calculated value by using the above parameters gives a straight line going through origin showing that the experimental data match with the calculated values (Figure 3.5).

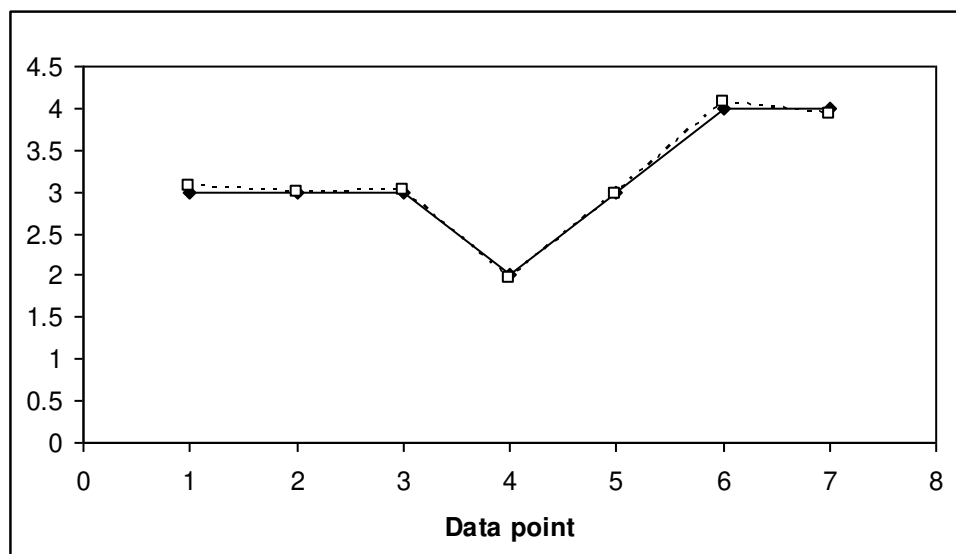


Figure 3.5 Comparison of experimental data (♦) and calculated data (□).

The analysis of the kinetic data showed that the reaction can be described by a Ping-Pong Bi-Bi mechanism in agreement with the work of Arcos et al. (2000) who proposed Ping-Pong Bi-Bi mechanism to describe the lipase-catalyzed esterification of glucose with fatty acids (lauric, palmitic and stearic) and Romero et al. (2007) who also found that the synthesis of isoamyl acetate catalyzed by enzyme Novozym 435 in n-hexane follow a Ping-Pong Bi-Bi mechanism.

4 Conclusion

The esterification of sucrose with acrylic acid catalyzed by lipase Novozym 435 was studied. Under the reaction conditions used in this work, the molar ratio sucrose:acrylic acid of 1:6 and the least amount of water in the reaction media resulted in the highest conversion. Thus, the best condition for synthesis of sucrose acrylate was a molar ratio 1:6, an amount of enzyme of 1.95 g and with no water added to the reaction medium.

To increase the sucrose conversion, the water produced during esterification was removed continuously by the addition of molecular sieves 3Å, thus removing the water formed during reaction preventing the hydrolysis reaction. The addition of 400g/L of molecular sieves led to a sucrose conversion 70%, while only 20% conversion of sucrose was observed with no molecular sieves added to the reaction medium.

The analysis of the kinetic data showed that the esterification of sucrose with acrylic by means Novozym 435 takes place according to a Ping-Pong Bi-Bi mechanism. The rate expression proposed to describe this model uses five kinetic constants that were determined by linear and nonlinear regression analysis of the experimental data. We successfully determined the numerical values of the kinetic and equilibrium constants for the first time.

Acknowledgments

Support by FAPESP, CAPES and Cnpq Brazil is gratefully acknowledge

References

- ARCOS, J. A.; HIIL JR, C. G.; OTERO, C., Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 73, n. 2, p. 104-110, 2001.
- BELL, G; HALLING, P. J.; MOORE, B. D.; PARTRIDGE, J. P.; GARENTH REES, D., Biocatalyst behavior in low-water system, **TIBTECH**, v. 13, p. 468-473, 1995.
- BEZBRADICA, D. The *Candida rugosa* lipase catalyzed synthesis of amyl isobutyrate in organic solvent and solvent-free system: A kinetic study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, p. 11-16, 2006.
- CHAMOULEAU, F.; COULON, D.; GIRARDIN, M.; GHOUL, M.; Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 949-954, 2001.
- COLOMBIÉ, S.; TWEDDELL, R. J.; CONDORET, J.; MARTY, A. Water activity control: A way to improve the efficiency of continuous lipase esterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, p. 362-368, 1998.
- DANESHFAR, A. *et al.*, Synthesis of 2-ethylhexyl-2-ethylhexanoate catalyzed by immobilized lipase in n-hexane: A kinetic study. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p. 279-284, 2007.

- DORDICK, J. S.; Designing enzymes for use in organic solvents. **Biotechnology Progress**, v. 8, p. 259-267, 1992.
- FERREIRA, L. *et al.* Preparation and characterisation of gels based on sucrose modified with glycidyl methacrylate. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 15-24, 2000.
- FERRER, M. *et al.* Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces langinosus* and *Candida antarctica B*, and their antimicrobial properties, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 391-398, 2005.
- FLORES, M. V.; HALLING, P. J.; Full model for reversible kinetics of lipase-catalyzed sugar-ester synthesis in 2-methyl 2-butanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 7, 795-801, 2002.
- GIACOMETTI, J.; ET AL. Kinetic characterization of enzymatic esterification in a solvent system: adsorptive control of water with molecular sieves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 921-928, 2001.
- GRUBER , H.; KNAUS, S. Synthetic polymers based on carbohydrates: Preparation, properties and applications. **Macromolecular Symposia**, v. 152, p. 95-105, 2000.
- HALLING, P. J.; Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 178-206, 1994.
- HOARE, T. R.; KOHANE, D. S., Hydrogel in Drug Delivery, **Polymer**, v. 49, p. 1993-2007, 2008.

- JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, **Trends Biotechnology**, v. 16, n. 9, p 396-403, 1998.
- JANSSEN, E. M.; SJURSNES, B. J.; VAKUROV, A. V.; HALLING, P. J.; Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: Correct model and solvent effects on parameters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 463-470, 1999.
- LIU, X. C.; DORDICK, J.S. Sugar acrylate-based polymers as chiral molecularly imprintable hydrogel. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**. v. 37, p. 1665-1671, 1999.
- MA, L.; PERSSON, M.; ADLERCREUTZ, P. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 1024-1029, 2002.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento / Secretaria de Produção e Agroenergia. **Anuário Estatístico da Agroenergia**, 2009.
- NORDBLAD, M.; ADLERCREUTZ, P.; Effects of acid concentration and solvent choice on enzymatic acrylation by *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Biotechnology**, v. 133, p. 127-133, 2008.
- PÁEZ, B.C.; MEDINA, A.R.; RUBIO, F. C.; MORENO, P. G.; GRIMA, E. M. Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology** v. 33, p. 845-853, 2003.

- PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology** v. 27, p. 187-204, 2000.
- PARK, D. W.; et al Chemoenzymatic synthesis of sugar-containing biocompatible hydrogel: Crosslinked poly(β -methylglucosideo acrylate) and poly(β -methylglucosideo methacrylate), **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v 71A, n° 3, p. 497-507, 2004.
- PETERSSON, A. E.V.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. A water activity control system for enzymatic reaction in organic media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 235-241, 2007.
- QUENEAU, Y.; JAROSZ, S.; LEWANDOWSKI, B.; FITREMANN, J.; Sucrose chemistry and applications of sucrochemicals. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 61, p.217-292, 2007.
- ROMERO, M. D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 269-277, 2007.
- SAKAKI, K.; *et al.* Enzymatic synthesis of sugar ester in organic solvent coupled with pervaporation. **Desalination**, v. 193, p. 260-266, 2006.
- SEGEL, I. H. Enzyme Kinetics. New York; John Wiley & Sons, 1975
- SOULTANI, S.; ENGASSER, J.M.; GHOUL, M. Effect of acyl donor chain length and sugar / acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 725-731, 2001.

- TSUKAMOTO, J.; HAEBEL, S.; VALENÇA, G. P.; PETER, M. G. and FRANCO, T. T.;
Enzymatic direct synthesis of acrylic acid esters of mono- and disaccharides. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1486-1492, 2008.
- TSUZUKI, Y.; *et al.* Synthesis of sugar fatty acid esters by modified lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 267-271, 1999.
- WANG, Q.; DORDICK, J. S.; LINHARDT, R. J.; Synthesis and application of carbohydrate-containing polymers. **Chem Mater**, v 14, p 3232-3244, 2002.
- WEHTJE, E.; KAUR, J.; ADLERCREUTZ, P.; CHAND, S. and MATTIASSON, B. Water activity control in enzymatic esterification processes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 21, p. 502-510, 1997.
- YU, J.; ZHANG, J.; ZHAO, A.; MA, X., Study of glucose ester synthesis by immobilized lipase from *Candida sp.* **Catalysis Communications**, v. 9, p. 1369-1374, 2008.
- YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 245-252, 2003.

CAPÍTULO VII. Conclusões

Foi estudada a solubilidade da sacarose, frutose, glicose, maltose e xilose em dois álcoois terciários, terc-butanol e o 2-metil-2-butanol. Em todos os casos, as maiores solubilidades foram obtidas quando foi utilizado o terc-butanol como solvente, por este ser menos polar. A frutose foi o açúcar que apresentou maior solubilidade em terc-butanol, por outro lado a solubilidade da sacarose, único carboidrato não redutor, foi a menor entre os carboidratos estudados.

Foi analisado, além da escolha do melhor solvente para solubilizar os açúcares, a influência da temperatura na solubilidade dos carboidratos. Para todos os carboidratos, a temperatura de 65°C apresentou os maiores valores de solubilidade. A solubilidade da sacarose mostrou-se ter forte dependência da temperatura em terc-butanol, visto que a diferença dos valores entre as duas temperaturas foi superior a três vezes. Para a solubilidade da xilose, a temperatura não apresentou interferência, pois os valores da solubilidade foram próximos para as duas temperaturas e este fato foi verificado nos dois solventes estudados.

Foi verificado a influência da quantidade de biocatalisador, da presença de água e da razão molar em relação a conversão de sacarose na síntese de acrilatos de sacarose. O maior valor da conversão da sacarose (19,404%) foi atingido nas seguintes condições: 1,95 g de lipase, razão molar de 1:6 de sacarose(0,062 mmol):ácido acrílico (0,372 mmol) e ausência de água inicialmente no sistema reacional.

O acrilato de sacarose possivelmente é o produto formado na reação de esterificação enzimática da sacarose com o ácido acrílico, pois foi possível verificar pelos

cromatogramas que ocorreu um consumo do pico referente ao acrilato de sacarose (Anexo A3).

Foi adicionado PM para aumentar a conversão de sacarose e favorecer a síntese de acrilato de sacarose, evitando a hidrólise. Desta forma, a água presente no meio reacional foi absorvida pelo dissecante. As conversões de sacarose após 5 horas de reação foram 40%, 60%, 70% e 76% com 2,5 g, 5 g, 7,5 g e 10g de PM em 25 mL de meio reacional, respectivamente. Enquanto que na ausência de PM apenas 20% da sacarose inicial foi convertida.

A análise dos dados cinéticos mostrou que a esterificação enzimática direta da sacarose com ácido acrílico ocorre de acordo com um mecanismo Pingue-Pongue Bi-Bi. As constantes cinéticas do modelo proposto para as diferentes condições estudadas foram determinadas pelo ajuste da equação da reta e pela análise de regressão não linear dos dados experimentais. Logo, as constantes cinéticas foram: $K_1 = 11,118$, $K_2 = 0,4173$, $K_3 = 3,7949$, $K_8 = 9,6241$, $K_9 = 11,099$ e $\beta = 1,0206$.

CAPÍTULO VIII. Sugestões para trabalhos futuros

- Estudar a alimentação da sacarose durante a reação, para maximizar a produção de acrilato de sacarose;
- Determinar a estabilidade e reutilização da lipase Novozym 435 na reação de esterificação;
- Desenvolver metodologia de purificação e caracterização dos acrilatos de sacarose;
- Estudar e desenvolver metodologia de polimerização do acrilato de sacarose;
- Utilizar leito fixo empacotado com a lipase Novozym 435 para obtenção de acrilato de sacarose.

ANEXOS

A.1 CONCENTRAÇÕES DOS PADRÕES DOS CARBOIDRATOS UTILIZADOS NO CLAE.

Na Tabela A1.1 apresenta as concentrações dos padrões utilizados na determinação da concentração dos carboidratos por CLAE.

Tabela A1. 1 Concentrações dos padrões dos carboidratos utilizados nas análises por CLAE.

Padrão	Sacarose (g/L)	Frutose (g/L)	Glicose (g/L)	Maltose (g/L)	Xilose (g/L)
1	1	30	5	10	20
2	0,8	22,5	4	8	15
3	0,6	15	3	6	10
4	0,4	7,5	2	4	5
5	0,2	1	1	2	1

A.2 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DOS CARBOIDRATOS

As Tabelas A2.1 a A2.10 apresentam os dados em duplicatas de concentração dos carboidratos (g/L) em terc-butanol e em 2-metil 2-butanol nas temperaturas de 55 e 65°C

Tabela A2. 1 Resultados da determinação da solubilidade da sacarose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 55°C.

Tempo (h)	TBA				2M2B			
	Frasco	Frasco	Média		Frasco	Frasco	Média	
	A	B			A	B		
0	0,00	0,01	0,00	± 0,00	0,01	0,00	0,01	± 0,01
0,5	0,09	0,10	0,10	± 0,00	0,08	0,12	0,10	± 0,03
1	0,19	0,19	0,19	± 0,00	0,18	0,17	0,17	± 0,01
3	0,20	0,21	0,21	± 0,00	0,21	0,24	0,22	± 0,02
6	0,36	0,37	0,36	± 0,01	0,22	0,23	0,22	± 0,01
12	0,41	0,43	0,42	± 0,01	0,21	0,24	0,23	± 0,03
24	0,50	0,52	0,51	± 0,01	0,22	0,25	0,24	± 0,02
48	0,51	0,52	0,52	± 0,01	0,22	0,23	0,23	± 0,01
72	0,52	0,53	0,52	± 0,00	0,24	0,22	0,23	± 0,01

Tabela A2. 2 Resultados da determinação da solubilidade da sacarose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 65°C.

Tempo (h)	TBA				2M2B			
	Frasco	Frasco	Média		Frasco	Frasco	Média	
	A	B			A	B		
0	0	0,011	0,01	± 0,01	0,00	0,00	0,00	± 0,00
0,5	0,12	0,15	0,14	± 0,02	0,07	0,05	0,06	± 0,01
1	0,34	0,35	0,35	± 0,01	0,15	0,18	0,17	± 0,02
3	0,57	0,61	0,59	± 0,03	0,34	0,38	0,36	± 0,03
6	0,85	0,82	0,83	± 0,02	0,51	0,50	0,50	± 0,01
12	0,82	0,82	0,82	± 0,00	0,52	0,51	0,51	± 0,01
24	0,89	0,87	0,88	± 0,02	0,54	0,50	0,52	± 0,03
48	0,82	0,88	0,85	± 0,04	0,56	0,53	0,54	± 0,02
72	0,81	0,90	0,86	± 0,06	0,59	0,53	0,56	± 0,04

Tabela A2. 3 Resultados da determinação da solubilidade da frutose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 55°C.

Tempo (h)	TBA				2M2B			
	Frasco	Frasco	Média		Frasco	Frasco	Média	
	A	B			A	B		
0	0,06	0,13	0,09	± 0,05	0,05	0,02	0,04	± 0,02
0,5	7,55	7,74	7,64	± 0,13	10,47	10,75	10,61	± 0,20
1	10,14	10,10	10,12	± 0,03	18,83	19,75	19,29	± 0,65
3	15,86	16,01	15,93	± 0,10	19,84	19,34	19,59	± 0,36
6	22,60	22,20	22,40	± 0,28	19,36	20,11	19,74	± 0,53
12	24,84	24,98	24,91	± 0,09	20,36	19,87	20,11	± 0,34
24	25,36	25,07	25,22	± 0,21	19,70	19,61	19,65	± 0,07
48	24,39	24,85	24,62	± 0,32	19,32	19,61	19,46	± 0,20
72	24,53	24,59	24,56	± 0,04	19,35	19,51	19,43	± 0,11

Tabela A2. 4 Resultados da determinação da solubilidade da frutose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 65°C.

Tempo (h)	TBA				2M2B			
	Frasco	Frasco	Média		Frasco	Frasco	Média	
	A	B			A	B		
0	0,14	0,29	0,22	± 0,11	0,16	0,14	0,15	± 0,02
0,5	7,45	5,86	6,65	± 1,13	6,18	5,86	6,02	± 0,22
1	7,58	7,43	7,50	± 0,10	8,08	7,70	7,89	± 0,27
3	18,20	16,79	17,50	± 1,00	17,76	18,18	17,97	± 0,30
6	25,03	23,80	24,41	± 0,87	20,53	20,27	20,40	± 0,18
12	29,19	28,22	28,70	± 0,68	21,46	21,68	21,57	± 0,16
24	28,60	28,23	28,42	± 0,27	20,54	20,27	20,40	± 0,19
48	29,59	29,13	29,36	± 0,33	21,26	20,90	21,08	± 0,26
72	29,60	28,83	29,22	± 0,55	21,28	21,02	21,15	± 0,18

Tabela A2. 5 Resultados da determinação da solubilidade da glicose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 55°C.

Tempo (h)	TBA				2M2B			
	Frasco	Frasco	Média		Frasco	Frasco	Média	
	A	B			A	B		
0	0,18	0,19	0,18	± 0,01	0,19	0,12	0,16	± 0,05
0,5	1,81	1,60	1,71	± 0,15	1,27	1,21	1,24	± 0,04
1	1,86	1,62	1,74	± 0,17	1,31	1,24	1,27	± 0,05
3	2,31	1,99	2,15	± 0,22	1,60	1,54	1,57	± 0,04
6	2,60	2,23	2,41	± 0,26	1,81	1,77	1,79	± 0,03
12	3,04	0,59	1,82	± 1,73	2,06	1,99	2,03	± 0,05
24	3,60	3,14	3,37	± 0,32	2,44	2,38	2,41	± 0,04
48	3,26	3,52	3,39	± 0,19	2,46	2,40	2,43	± 0,04
72	3,41	3,57	3,49	± 0,11	2,36	2,42	2,39	± 0,04

Tabela A2. 6 Resultados da determinação da solubilidade da glicose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 65°C.

Tempo (h)	TBA				2M2B			
	Frasco	Frasco	Média		Frasco	Frasco	Média	
	A	B			A	B		
0	0,00	0,00	0,00	± 0,00	0,00	0,00	0,00	± 0,00
0,5	1,77	1,59	1,68	± 0,13	0,86	1,35	1,11	± 0,35
1	1,84	1,60	1,72	± 0,17	1,32	1,35	1,33	± 0,02
3	2,47	2,26	2,36	± 0,15	1,62	1,74	1,68	± 0,08
6	3,01	2,79	2,90	± 0,16	2,01	2,05	2,03	± 0,03
12	3,44	3,33	3,38	± 0,07	2,21	2,45	2,33	± 0,17
24	3,78	3,71	3,75	± 0,05	2,55	2,76	2,65	± 0,15
48	8,06	8,30	8,18	± 0,17	5,61	6,68	6,14	± 0,76
72	8,07	8,32	8,19	± 0,18	5,67	6,64	6,16	± 0,68

Tabela A2. 7 Resultados da determinação da solubilidade da maltose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 55°C.

Tempo (h)	TBA				2M2B			
	Frasco	Frasco	Média		Frasco	Frasco	Média	
	A	B			A	B		
0	0,22	0,18	0,20	± 0,03	0,27	0,33	0,30	± 0,04
0,5	2,45	1,65	2,05	± 0,56	2,55	2,78	2,66	± 0,16
1	2,55	2,04	2,29	± 0,36	2,66	2,92	2,79	± 0,18
3	4,30	3,22	3,76	± 0,77	3,58	3,94	3,76	± 0,25
6	4,82	3,63	4,22	± 0,84	3,87	4,26	4,06	± 0,28
12	5,41	4,06	4,73	± 0,96	4,31	4,72	4,52	± 0,29
24	5,86	4,93	5,39	± 0,65	4,96	5,18	5,07	± 0,16
48	6,69	5,42	6,06	± 0,90	5,08	5,19	5,14	± 0,08
72	6,85	5,89	6,37	± 0,68	4,57	5,27	4,92	± 0,49

Tabela A2. 8 Resultados da determinação da solubilidade da maltose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 65°C.

Tempo (h)	TBA				2M2B			
	Frasco	Frasco	Média		Frasco	Frasco	Média	
	A	B			A	B		
0	0,08	0,33	0,20	± 0,18	0,16	0,09	0,13	± 0,05
0,5	4,07	5,53	4,80	± 1,03	2,33	3,02	2,68	± 0,49
1	4,93	5,51	5,22	± 0,41	2,43	3,18	2,81	± 0,53
3	5,33	6,26	5,80	± 0,66	2,92	3,50	3,21	± 0,41
6	6,00	6,83	6,42	± 0,58	3,23	3,88	3,55	± 0,46
12	6,29	5,92	6,11	± 0,26	3,53	3,88	3,70	± 0,24
24	7,60	7,43	7,52	± 0,12	4,46	4,52	4,49	± 0,05
48	7,52	7,36	7,44	± 0,12	4,61	4,71	4,66	± 0,07
72	7,41	7,11	7,26	± 0,22	4,80	4,81	4,80	± 0,01

Tabela A2. 9 Resultados da determinação da solubilidade da xilose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 55°C.

Tempo (h)	TBA				2M2B			
	Frasco	Frasco	Média		Frasco	Frasco	Média	
	A	B			A	B		
0	0,40	0,34	0,37	± 0,04	0,00	0,04	0,02	± 0,03
0,5	7,00	7,41	7,21	± 0,29	4,95	5,28	5,11	± 0,23
1	8,21	7,81	8,01	± 0,28	6,52	6,14	6,33	± 0,26
3	10,22	10,19	10,21	± 0,02	8,03	7,65	7,84	± 0,27
6	12,34	12,26	12,30	± 0,06	8,29	8,79	8,54	± 0,35
12	11,45	11,50	11,48	± 0,04	8,63	8,85	8,74	± 0,16
24	12,56	12,32	12,44	± 0,17	8,96	9,47	9,22	± 0,36
48	13,12	13,24	13,18	± 0,08	9,28	9,51	9,40	± 0,16
72	14,04	13,63	13,83	± 0,29	9,45	9,61	9,53	± 0,11

Tabela A2. 10 Resultados da determinação da solubilidade da xilose (g/L) em terc-butanol e 2-metil 2-butanol a 65°C.

Tempo (h)	TBA				2M2B			
	Frasco	Frasco	Média		Frasco	Frasco	Média	
	A	B			A	B		
0	0,12	0,34	0,23	± 0,16	0,25	0,28	0,26	± 0,02
0,5	8,14	7,49	7,82	± 0,46	5,05	4,83	4,94	± 0,16
1	9,54	8,71	9,12	± 0,59	6,00	6,48	6,24	± 0,34
3	11,25	11,38	11,31	± 0,09	7,80	8,08	7,94	± 0,20
6	12,34	11,61	11,97	± 0,51	8,40	8,26	8,33	± 0,10
12	12,46	12,21	12,34	± 0,17	8,81	8,42	8,61	± 0,28
24	13,51	13,22	13,36	± 0,21	9,20	9,26	9,23	± 0,04
48	12,77	12,76	12,77	± 0,01	4,77	4,90	4,83	± 0,09
72	12,73	12,90	12,82	± 0,11	5,00	5,00	5,00	± 0,00

A3 CROMATOGRAMA DA ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DA SACAROSE COM ÁCIDO ACRÍLICO.

Na Figura A3.1 mostra o cromatograma característico da reação de esterificação da sacarose com ácido acrílico.

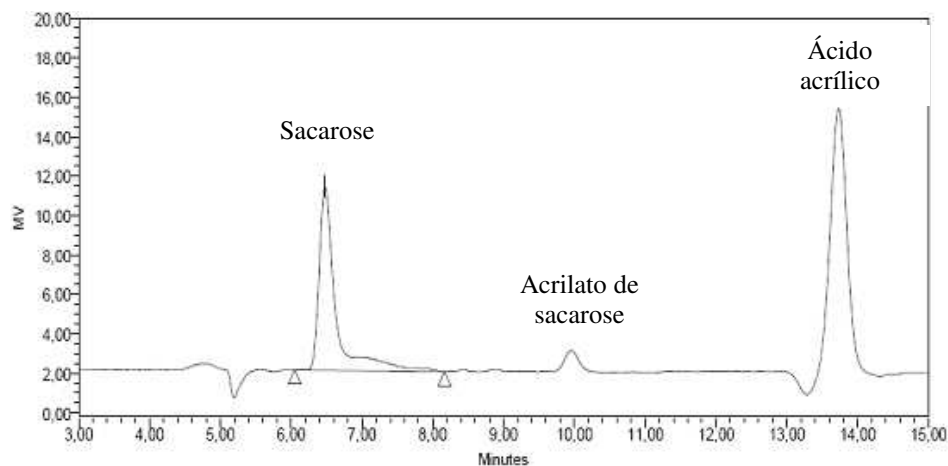
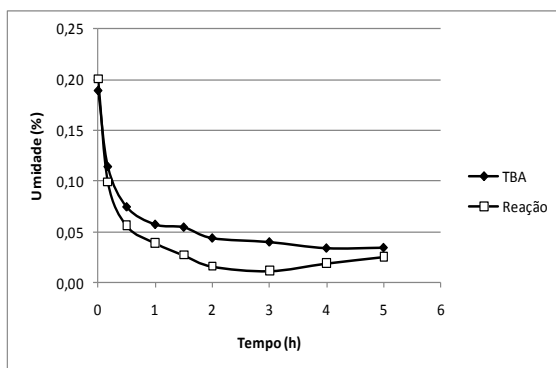


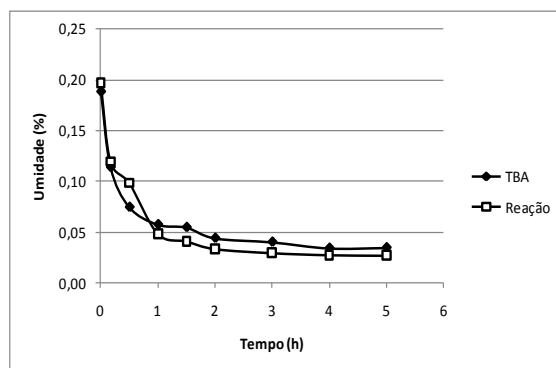
Figura A3. 1 após 5 horas de reação nas seguintes condições: 20% de conversão de sacarose, razão molar de 1:6 (sacarose:ácido acrílico), 1,95 g de lipase Novozym 435 a 200rpm a 65°C.

A4 TAXA DE LIBERAÇÃO DE ÁGUA

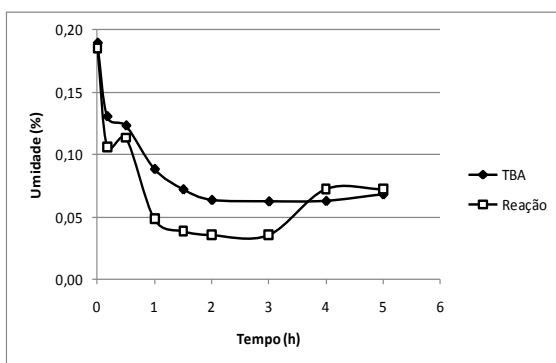
Foi testada a taxa de liberação de água da preparação comercial de lipase Novozym 435 nas misturas de 25 mL de TBA previamente desidratado, 1,95 g de enzima na ausência e presença de 2,5, 5, 7,5 e 10 g de peneira molecular 3 Å.



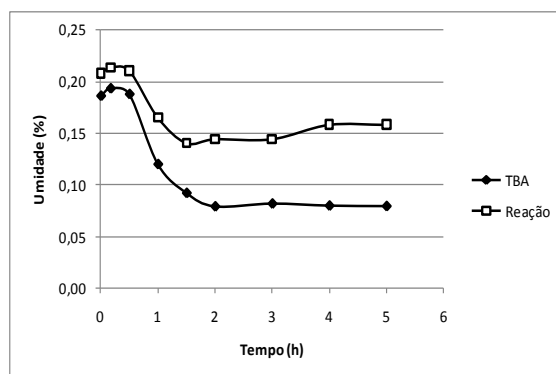
10 g de PM



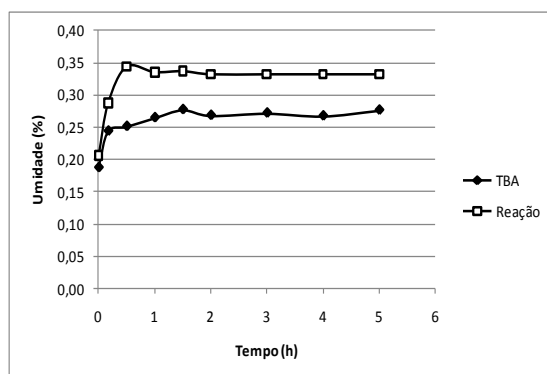
7,5 g de PM



5 g de PM



2,5 g de PM



Sem PM

Figura A4. 1 Comparação da umidade presente na mistura constituída por TBA, lípase Novozym 435 (TBA) e na meio reacional (REAÇÃO) em função do tempo.

Foi observado que a quantidade de água liberada pela enzima para o meio (terc-butanol) na ausência de PM, foi aproximadamente 0,27%. Portanto, foi possível verificar que água presente no meio reacional era composta pela água liberada pela enzima e a água

produzida pela reação de esterificação. Os sistemas com 2,5 g, 5 g, 7,5 g e 10 g de PM removeu 0,12 %, 0,13 %, 0,15 % e 0,15%, respectivamente (Figura A4.1).

Foi verificado que no sistema onde não foi adicionado PM a quantidade de água presente no meio reacional foi maior quando comparado ao meio contendo somente enzima e terc-butanol, sendo esta quantidade a soma da água liberada pela enzima e da água produzida durante a reação.

A5 CINÉTICA ENZIMÁTICA E MECANISMO CINÉTICO

Foi proposto o mecanismo Pingue-Pongue Bi-Bi. para esterificação direta da sacarose com ácido acrílico catalisada pela lipase Novozym 435. Portanto, foi desenvolvida uma equação que representa o mecanismo proposto para a sequência de reações envolvida na esterificação da síntese do acrilato de sacarose. As seguintes reações estão envolvidas na esterificação.



Onde E é a enzima, A o ácido acrílico, S a sacarose, M o monoéster e W a água.

$$K_1 = \frac{[E.AA][W]}{[E][AA]} \quad (8)$$

$$K_2 = \frac{[E.AA.S]}{[E.AA][S]} \quad (10)$$

$$K_8 = \frac{[M.E]}{[M][E]} \quad (11)$$

$$K_9 = \frac{[W.E]}{[W][E]} \quad (12)$$

$$r_3 = k_3[E.A.S] - k_{-3}[M.E.W] \quad (13)$$

Onde

$$[E.A.S] = K_1 K_2 \frac{[E][A][S]}{W} \quad (14)$$

e

$$[M.E.W] = \beta.K_8 K_9 [M][E][W] \quad (15)$$

Substituindo (14) e (15) em (13), temos

$$[E] = \frac{[E_t]}{1 + K_1 \frac{[A]}{[W]} + K_1 K_2 \frac{[A][S]}{[W]} + \beta.K_8 K_9 [M][W] + K_8 [M]} \quad (16)$$

Substituindo (14), (15) e (16) em (13), temos

$$r_s = \frac{k_3.K_1 K_2 [E_t][A][S] - k_{-3}\beta K_8 K_9 [M][E_t][W][W]}{[W] + K_1 [A] + K_1 K_2 [A][S] + \beta.K_8 K_9 [M][W][W] + K_8 [M][W]} \quad (17)$$

Sendo K_{global} a constante de equilíbrio da reação global, logo

$$K_{global} = \frac{C_M C_W}{C_S C_A} = \frac{k_3 K_1 K_2}{k_{-3} \beta K_8 K_9} \quad (18)$$

Para a reação global



Temos a seguinte tabela estequiométrica (Tabela A5.1)

Tabela A5. 1 Tabela estequiométrica da reação de esterificação da sacarose com o ácidoacrílico catalisado pela Novozym 435.

	Início	Reação	Fim
S	N_S^0	$-N_S^0 X$	$N_S = N_S^0(1 - X)$
A	N_a^0	$-N_S^0 X$	$N_a = N_S^0(\theta_a - X)$
M	-	$+N_S^0 X$	$N_m = N_S^0 X$
W	N_w^0	$+N_S^0 X$	$N_w = N_S^0(\theta_w + X)$

Onde $\theta_a = \frac{N_a^0}{N_S^0}$ e $\theta_w = \frac{N_w^0}{N_S^0}$.

A quantidade inicial de água foi afetada, pois diferentes quantidades de peneira molecular foram adicionadas ao meio reacional, portanto, o valor θ_w torna-se uma constante. O valor da constante global foi calculado em função da conversão de equilíbrio

$$K_{global} = \frac{C_M C_W}{C_S C_A} = \frac{C_w X}{C_S^0 (1 - X)(\theta_a - X)} \quad (20)$$

Para ajustar os dados experimentais à equação (17) foi realizado algumas mudanças de variáveis, tais como

- Considerar a reação no início quando a produção de monoéster é mínima.



$$r_s = \frac{k_3 \cdot K_1 K_2 [E_t][A][S]}{[W] + K_1[A] + K_1 K_2 [A][S]} \quad (24)$$

Reescrevendo a equação (24) em função da conversão da sacarose

$$r_s = \frac{k_3 \cdot K_1 K_2 C_{Et} C_S^{0^2} (1-X)(\theta_a - X)}{C_w + K_1 C_S^0 (\theta_a - X) + K_1 K_2 C_S^0 (1-X)(\theta_a - X)} \quad (25)$$

Para um reator batelada a volume constante temos

$$-r_s = \frac{dC_s}{dt} = C_s^0 \frac{dX}{dt} \quad (26)$$

Substituindo a equação (25) na equação (26) e rearranjando os termos temos

$$t = \frac{1}{k_3 K_1 K_2 C_{Et} C_S^0} \left[\int_0^X \frac{C_w dX}{(1-X)(\theta_a - X)} + \int_0^X \frac{K_1 C_S^0 dX}{(1-X)} + \int_0^X K_1 K_2 C_S^{0^2} dX \right] \quad (27)$$

cuja a solução é dada por

$$t = \frac{\frac{C_w}{C_S^0 (\theta_a - 1)} \ln \left(\frac{\theta_a - X}{\theta_a (1-X)} \right) - \frac{K_1 C_S^0 \ln(1-X)}{C_S^0} - K_1 K_2 C_S^{0^2} X}{K_1 K_2 k_3 C_{Et}} \quad (28)$$

A equação (28) foi expandida em série de Taylor e ajustada pela equação de uma reta quando $X \rightarrow 0$. Os resultados estão apresentados na Tabela A5.2.

Tabela A5. 2 Parâmetros cinéticos K1, K2 e K3 da síntese de acrilatos de sacarose.

Parâmetro	Valor
K₁	11.118
K₂	0.4173
K₃	3.7949

b) Reescrevendo a equação (17) em função da conversão da sacarose.

$$r_s = \frac{C_{Et} \left[k_3 \cdot K_1 K_2 C_S^{0^2} (1-X)(\theta_a - X) - k_{-3} \beta K_8 K_9 C_w^2 C_S^0 X \right]}{C_w + K_1 C_S^0 (\theta_a - X) + K_1 K_2 C_S^{0^2} (\theta_a - X)(1-X) + \beta \cdot K_8 K_9 C_w^2 C_S^0 X + K_8 C_w C_S^0 X} \quad (30)$$

Substituindo a equação (26) na equação (30) e rearranjando os termos foi obtida a seguinte equação

$$\begin{aligned}
 t = & \frac{1}{C_{Et}} \left[\int_0^X \frac{C_w dX}{C_S^0 (1-X)(\theta_a - X) - \frac{1}{K_{global}} C_w^2 X} \right] + \frac{1}{C_{Et}} \left[\int_0^X \frac{K_1 C_S^0 (\theta_a - X) dX}{C_S^0 (1-X)(\theta_a - X) - \frac{1}{K_{global}} C_w^2 X} \right] + \dots \\
 & \dots + \frac{1}{C_{Et}} \left[\int_0^X \frac{K_1 K_2 C_S^{0^2} (\theta_a - X)(1-X)}{C_S^0 (1-X)(\theta_a - X) - \frac{1}{K_{global}} C_w^2 X} \right] + \dots \\
 & \dots + \frac{(\beta K_8 K_9 C_w^2 C_S^0 + K_8 C_w)}{C_{Et}} \left[\int_0^X \frac{X dX}{C_S^0 (1-X)(\theta_a - X) - \frac{1}{K_{global}} C_w^2 X} \right]
 \end{aligned} \quad (31)$$

As integrais da equação (31) foram resolvidas com o auxílio das tabelas de integrais (BOIS, 1961). A solução da equação (31) é dada por

$$\begin{aligned}
 t = & \frac{1}{C_{Et}} \left[\frac{C_w}{\sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)^2 + 4C_s^{0^2}\theta_a}} \log \left(\frac{2C_s^0X + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right) - \sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)^2 + 4C_s^{0^2}\theta_a}}{2C_s^0X + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right) + \sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)^2 + 4C_s^{0^2}\theta_a}} \right) + \dots \right. \\
 & \left. + \dots + \frac{K_1C_s^0}{C_{Et}} \left[\frac{1}{2C_s^0} \log \left(C_s^0X^2 + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)X + C_s^0\theta_a \right) \right] + \dots \right. \\
 & \left. + \dots + \frac{K_1C_s^0}{C_{Et}} \left[\frac{2C_s^0 - \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)}{2C_s^0 \sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)^2 + 4C_s^{0^2}\theta_a}} \log \left(\frac{2C_s^0X + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right) - \sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)^2 + 4C_s^{0^2}\theta_a}}{2C_s^0X + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right) + \sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)^2 + 4C_s^{0^2}\theta_a}} \right) + \dots \right. \right. \\
 & \left. \left. + \dots + \frac{K_1K_2C_s^0}{C_{Et}} \left[\frac{X}{C_s^0} - \frac{C_s^0(1+\theta_a) + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)}{2C_s^{0^2}} \log \left(\frac{2C_s^0X + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right) - \sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)^2 + 4C_s^{0^2}\theta_a}}{2C_s^0X + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right) + \sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)^2 + 4C_s^{0^2}\theta_a}} \right) + \dots \right] \right. \right. \\
 & \left. \left. + \dots + \left(\frac{\beta K_8 K_9 C_w^2 C_s^0 - K_8 C_w}{C_{Et}} \right) \left[\frac{1}{2C_s^0} \log \left(C_s^0X^2 + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)X + C_s^0\theta_a \right) \right] - \dots \right. \right. \\
 & \left. \left. + \dots - \left(\frac{\beta K_8 K_9 C_w^2 C_s^0 - K_8 C_w}{C_{Et}} \right) \left[\frac{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)}{2C_s^0 D} \log \left(\frac{2C_s^0X + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right) - \sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)^2 + 4C_s^{0^2}\theta_a}}{2C_s^0X + \left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right) + \sqrt{\left(C_s^0(1+\theta_a) + \frac{C_w^2}{K_{global}}\right)^2 + 4C_s^{0^2}\theta_a}} \right) \right] \right. \right. \\
 & \left. \left. + \dots \right] \right] \quad (32)
 \end{aligned}$$

A equação (32) foi resolvida numericamente utilizando a técnica de ajuste não linear para a estimativa dos parâmetros cinéticos K_8 , K_9 e β por meio do programa computacional POLYMATH 6.0. O critério estabelecido para avaliação da qualidade do ajuste foi o 95% de confiança entre o valor experimental e o valor calculado pela equação ajustada. Para a

equação ser estatisticamente significativa, este parâmetro deve ser menor em valor absoluto, comparados com os valores encontrados. Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos estão ilustrados na Tabela A5.3.

Tabela A5. 3 Parâmetros cinéticos K_8 , K_9 e β da esterificação da sacarose com ácido acrílico utilizando a Novozym 435.

Parâmetro	Valor	95 % confiança
K_8	9.6241	0,0021
K_9	11.099	0,0005
β	1.0206	0,0035

O valor de 95 % confiança menor para todos os parâmetros cinéticos e R^2 foi 0.9926 e o coeficiente de variância 0.00502.

A Tabela A5.4 apresenta os dados utilizados para a estimativa dos parâmetros cinéticos K_1 , K_2 , K_3 , K_8 , K_9 e β . As condições reacionais escolhidas foram razão molar (1:6), 1,95g de enzima com 0, 2,5, 5, 7,5 e 10 gramas de PM sob agitação de 200 rpm a 65°C.

Tabela A5. 4 Dados utilizados para a estimativa dos parâmetros cinéticos K1, K2, K3, K8, K9 e β .

Condição	T (Horas)	[S0] (g/l)	X (%)	[W] (g/l)	[E] (g/l)
10 g de PM	4	0,70	78,17	0,15	100,52
	5	0,70	76,03	0,25	104,84
	4	0,71	77,40	0,17	100,52
	5	0,71	76,69	0,26	104,84
7,5 g de PM	3	0,72	69,93	0,3	96,53
	4	0,72	72,91	0,42	100,52
	5	0,72	70,63	0,3	104,84
	3	0,71	68,64	0,3	96,53
	4	0,71	73,96	0,42	100,52
	5	0,71	72,01	0,3	104,84
5 g de PM	2	0,69	61,56	0,35	92,86
	3	0,69	59,56	0,3	92,86
	4	0,69	63,38	0,86	96,53
	5	0,69	63,73	0,76	96,53
	2	0,68	59,09	0,36	92,86
	3	0,68	59,09	0,36	92,86
	4	0,68	59,15	0,99	96,53
	5	0,68	59,24	0,69	96,53
2,5 g de PM	2	0,71	40,48	1,43	83,33
	3	0,71	40,56	1,03	86,28
	4	0,71	41,97	1,67	89,45
	5	0,71	41,76	1,67	92,86
	2	0,71	42,34	1,46	92,86
	3	0,71	42,34	1,46	96,53
	4	0,71	41,21	1,55	96,53
	5	0,71	41,24	1,5	83,33
Sem PM	0,5	0,72	18,13	3,63	86,28
	1	0,72	20,78	3,58	89,45
	1,5	0,72	19,94	3,8	92,86
	2	0,72	20,22	3,06	92,86
	3	0,72	20,22	3,06	96,53
	4	0,72	20,77	3,06	96,53
	5	0,72	20,68	3,06	92,86
	0,5	0,71	20,28	3,25	96,53
	1	0,71	18,03	3,13	96,53
	1,5	0,71	19,30	2,93	83,33
	2	0,71	19,58	3,58	86,28
	3	0,71	19,65	3,58	86,28
	4	0,71	20,78	3,58	89,45
	5	0,71	20,80	3,59	89,45

Referência Bibliográfica

BOIS, G. P.; Tables of Indefinite Integrals. Dover Publications, INC., New York, 1961.