



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Departamento de Processos Químicos

Obtenção de Acrilatos de Frutose por Catálise Enzimática

Autor: Érica Vagetti Fonseca

Orientador: Prof^a Dr^a Telma Teixeira Franco

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Fevereiro de 2008

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

F733o

Fonseca, Érica Vagetti
Obtenção de acrilatos de frutose por catálise
enzimática / Érica Vagetti Fonseca.--Campinas, SP:
[s.n.], 2008.

Orientador: Telma Teixeira Franco
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biocatálise. 2. Ácido acrílico. 3. Esterificação
(Química). 4. Lipase. I. Franco, Telma Teixeira. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Fructose acrylates production by enzymatic catalysis

Palavras-chave em Inglês: Biocatalysis, Acrylic acid, Sugar esters, Lipases

Área de concentração: Departamento de Processos Químicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Gustavo Paim Valença, Juliana de Souza Ferreira,
Saartje Hermalsteens

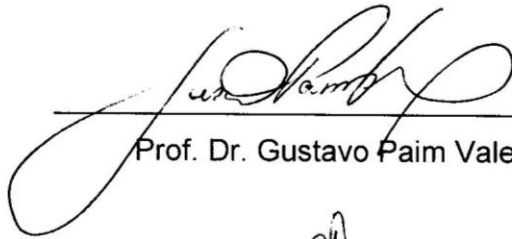
Data da defesa: 28/02/2008

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Érica Vagetti Fonseca e aprovada em 28 de fevereiro de 2008 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dra. Telma Teixeira Franco (Orientador)



Prof. Dr. Gustavo Paim Valença (Titular)



Prof. Dra. Juliana de Souza Ferreira (Titular)



Dra. Saartje Hernalsteens (Titular)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em
Engenharia Química.



Telma Teixeira Franco (Orientador)

Agradecimentos

A Deus, por guiar e conduzir meus passos.

À professora e orientadora Dra Telma Teixeira Franco, pela oportunidade de trabalho e pela orientação.

Ao professor Dr. Gustavo Paim Valença pelo auxílio no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Aos meus pais e irmão Isaura, Edson e Ericson pelo eterno apoio, incentivo e carinho.

Ao meu namorado Sérgio por permanecer ao meu lado nos momentos difíceis.

Aos companheiros e amigos do LEB, Junko, Enio, Kity, Éden, Eduardo, Arlete, Lúcio, Luciana, Bárbara e Danilo pela ajuda e pelos bons momentos em que passamos. Em especial à minha amiga, companheira de LEB Paula.

Aos meus amigos e colegas de Mestrado em especial à Marcela e Carol pelas idas às feirinhas e sessões de cinema.

Aos funcionários do Departamento de Processos Químicos que contribuíram para o progresso deste trabalho.

Aos funcionários e colaboradores da empresa GM Reis.

À CAPES pela bolsa concedida durante o trabalho de pesquisa.

RESUMO

O presente trabalho visou o desenvolvimento de um processo de aplicação para o ácido acrílico através de um bioprocesso, o qual envolveu a esterificação enzimática do mesmo em meio orgânico, catalisada por lipases e proteases para obtenção de acrilatos de açúcar. O interesse na produção de ésteres contendo moléculas de açúcar se dá devido à sua promissora aplicação como materiais absorventes de água, aditivos para o tratamento de água e para fins biomédicos. Além disso, os carboidratos são a fonte renovável mais abundante na terra e, conseqüentemente, uma das mais promissoras substâncias da química sustentável para o desenvolvimento de compostos de alta biodegradabilidade. Como reagentes, os ésteres acrílicos de frutose foram obtidos por esterificação direta da frutose com ácido acrílico em terc-butanol na presença de lipases e proteases comerciais. Foram investigados alguns parâmetros que interferem nesse bioprocessos, tais como: razão molar dos reagentes e tipo de catalisador. Verificou-se que meios reacionais contendo excesso de ácido acrílico, favorecem as maiores conversões molares de frutose. Dentre as enzimas testadas, a única a catalisar a reação de esterificação do ácido acrílico com a frutose em terc-butanol foi a lipase Novozym 435. Sendo assim, um planejamento fatorial completo com dois níveis e com repetição foi proposto para verificar a influência simultânea das variáveis x_1 (razão molar de frutose/ácido acrílico nos valores de 1:5 e 1:20) e x_2 (umidade inicial do sistema nos valores de 0,16% e 0,40%) na conversão molar de frutose, na conversão molar de ácido acrílico e na produção de seus ésteres empregando a lipase Novozym 435. A análise estatística dos dados indicou que ambos os fatores tiveram efeitos significativos na síntese dos ésteres de frutose. Assim, uma aplicação de ácido acrílico para a produção de ésteres degradáveis e com redução do impacto ambiental nos parece ser um caminho convergente dentro do âmbito da química sustentável (química verde).

Palavras-chave: biocatálise, ácido acrílico, ésteres de açúcar, lipases.

ABSTRACT

In the present work the reaction conditions for the direct enzymatic esterification of sugars with acrylic acid catalyzed by lipases and proteases in organic media was studied. There has been an increasing interest in the production of sugar esters because of their possible use as water absorbent materials, as additives in water treatment and as a biocompatible material. In addition, carbohydrates are the most abundant natural resources on earth and an ideal feedstock for the development of biodegradable materials. The esterification reaction of fructose with acrylic acid in tert-butyl alcohol was catalyzed by the commercial lipases Novozym 435, Lipozyme RM IM and Lipozyme TL IM and the proteases Novozym 539 HPF and Esperase HP F. The effects fructose/acrylic acid molar ratio and type of catalyst on the reaction were investigated. The esterification reaction was dependent on fructose/acrylic acid molar ratio, as follows: the higher the amount of acrylic acid to fructose ratio the higher the fructose conversion. Only lipase Novozym 435 catalyzed the esterification of acrylic acid with fructose. A full 2^2 factorial design was used to study the simultaneous influence of the effects of molar ratio (1:5 and 1:20) and initial moisture of the system (0,16 and 0,40%) on fructose conversion, acrylic acid conversion and amount of esters produced with the lipase Novozym 435 as catalyst. Statistical analysis of the data indicated that both factors had significant effects on the synthesis of sugar esters. Therefore, an application to acrylic acid in the production of biodegradable esters seems to be an interesting trend according with the white chemistry. The feasibility of the direct synthesis of sugar acrylates was shown in this work as well as the best reaction conditions for the production of sugar acrylates.

Keywords: biocatalysis, acrylic acid, sugar esters, lipases.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Biocatálise.....	3
2.2 Aspectos Históricos.....	4
2.3 Biocatalisadores.....	6
2.3.1 Aplicação das enzimas em síntese orgânica	7
2.4 Esterificação.....	11
2.4.1 Efeito da Água na Esterificação	13
2.4.2 Ésteres de açúcar	14
2.4.3 Cinética das reações de esterificação enzimática	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Materiais.....	23
3.1.1 Enzimas	23
3.1.2 Reagentes	24
3.2 Equipamentos Utilizados.....	24
3.3 Métodos Experimentais.....	25
3.3.1 Solubilização do Açúcar.....	25
3.3.2 Esterificação Enzimática.....	25
3.3.3 Reutilização enzimática	26
3.3.4 Planejamento Estatístico	27
3.4 Métodos Analíticos	31
3.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	31
3.4.2 Karl Fischer.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Influência do catalisador utilizado na reação de síntese da frutose	34
4.2 Efeito da razão molar dos substratos na esterificação da frutose com o ácido acrílico utilizando Novozym 435	36
4.3 Reutilização Enzimática	38

4.4	Planejamento de Experimentos	41
4.5	Avaliação Cinética.....	52
5.	CONCLUSÕES.....	57
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES	59
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
8.	APÊNDICE	69
8.1	Dados referentes ao estudo da influência do tipo de catalisador na reação de esterificação da frutose	69
8.2	Dados referentes ao estudo da influência da razão molar dos substratos na reação de esterificação da frutose	72
8.3	Dados referentes ao estudo de reutilização enzimática	72
8.4	Dados referentes ao planejamento experimental	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Classificação de sistemas biocatalíticos englobando solventes orgânicos.....	8
Figura 2.2: Estrutura química do ácido acrílico	16
Figura 2.3: Estrutura espacial da frutose.....	17
Figura 3.1: Procedimento de solubilização da frutose.....	25
Figura 4.1: Perfil de conversão molar da frutose na reação de esterificação com o ácido acrílico catalisada pela Novozym 435.....	35
Figura 4.2: Perfil de consumo da frutose na síntese de acrilatos de frutose para meios reacionais contendo frutose e ácido acrílico em diferentes razões molares	37
Figura 4.3: Conversão molar máxima alcançada nas reações de síntese de acrilatos de frutose para meios reacionais contendo frutose e ácido acrílico em diferentes razões molares	37
Figura 4.4: Perfil de conversão molar da frutose na esterificação.....	39
Figura 4.5: Umidade no sistema reacional no período de 5 dias.....	40
Figura 4.6: Conversão molar da frutose na esterificação no período de 5 dias	40
Figura 4.7: Cromatograma da reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico para o ensaio 1 no início da reação	43
Figura 4.8: Cromatograma da reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico para o ensaio 1 após 24 horas de reação.....	43
Figura 4.9: Curva de adsorção da Novozym 435 a 20°C	44
Figura 4.10: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 1	45
Figura 4.11: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 2.....	45
Figura 4.12: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 3.....	45
Figura 4.13: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 4.....	46

Figura 4.14: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 5.....	46
Figura 4.15: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 6.....	46
Figura 4.16: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 7.....	47
Figura 4.17: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 8.....	47
Figura 4.18: Distribuição dos produtos formados nas reações de esterificação da frutose com o ácido acrílico catalisada pela Novozym 435	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Enzimas utilizadas nos experimentos de esterificação.....	23
Tabela 3.2: Condições reacionais aplicadas à síntese de acrilatos de frutose	26
Tabela 3.3: Análise de Variância (ANOVA)	28
Tabela 3.4: Níveis das variáveis utilizados nos ensaios de esterificação da frutose com o ácido acrílico.....	30
Tabela 4.1: Condições reacionais aplicadas à síntese de acrilatos de frutose	34
Tabela 4.2: Lipases utilizadas nos experimentos de esterificação	35
Tabela 4.3: Condições reacionais aplicadas à síntese de acrilatos de frutose	36
Tabela 4.4: Condições reacionais aplicadas	39
Tabela 4.5: Matriz de planejamento com o efeito da razão molar e da umidade inicial do sistema na conversão de frutose e produtividade de monoéster	42
Tabela 4.6: Coeficientes do Modelo Estimados por Regressão Linear na resposta Conversão de Frutose	48
Tabela 4.7: Coeficientes do Modelo Estimados por Regressão Linear na resposta Conversão de Ácido Acrílico	49
Tabela 4.8: Coeficientes do Modelo Estimados por Regressão Linear na resposta Produção de Monoéster	49
Tabela 4.9: Coeficientes do Modelo Estimados por Regressão Linear na resposta Produção de Diéster.....	49
Tabela 4.10: Coeficientes do Modelo Estimados por Regressão Linear na resposta Produção de Triéster	50
Tabela 4.11: Análise da Variância para as respostas Conversão de Frutose, Produção de Mono, Di e Triésteres.....	51

NOMENCLATURA

ABREVIACÃO	NOME
F	Frutose
AA	Ácido Acrílico
TBA	Terc-Butanol
EA	Acrilato de Etila
BA	Acrilato de Butila
MMA	Metacrilato de Metila
ST	Estireno
HEA	2-hidroxietila
HBA	4-hidroxibutila
d	Dextrógira
l	Levógira
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMP	Dimetilpirrolidona
Ser	Serina
His	Histidina
Asp	Asparagina
Glu	Glutamina

1. INTRODUÇÃO

Na última década, o aumento dos custos de mão-de-obra, a escassez de espaço físico e a alta pressão para preservação ambiental, fizeram com que a indústria tradicional deixasse de ser competitiva e novas tecnologias fossem propostas. A biotecnologia é uma dessas promissoras tecnologias para o século XXI.

Recentemente, o interesse na produção de ésteres contendo moléculas de açúcar vem crescendo devido à sua aplicação em diversos campos da indústria, devido à sua promissora aplicação como materiais absorventes de água, aditivos para o tratamento de água e, eventualmente, para fins biomédicos (STAPLES *et al.*, 2000; PARK e CHANG, 2000). Além disso, os carboidratos são a fonte renovável mais abundante na terra e, conseqüentemente, uma das mais promissoras substâncias da química sustentável para o desenvolvimento de compostos com alta performance e biodegradabilidade.

Os ésteres de açúcares podem ser sintetizados tanto por processos químicos como enzimáticos. Devido à alta regioespecificidade das enzimas, os processos enzimáticos são caracterizados pela produção de produtos mais específicos (ex.: mono-éster de açúcar), sendo assim uma via preferencial para a fabricação desses ésteres.

Anteriormente, os ésteres de açúcar eram sintetizados, principalmente, através da esterificação em meio aquoso causando reações paralelas (hidrólise). Para prevenir essas reações, solventes apolares, como a piridina e a dimetilformamida, eram utilizados como meio de reação (FERRER *et al.*, 1999). Contudo, a solubilidade dos açúcares e a atividade enzimática eram reduzidas devido ao aumento da hidrofobicidade desses solventes orgânicos no sistema de reação. Além disso, não era possível o uso desses ésteres de açúcar como aditivos alimentícios e farmacêuticos devido à toxicidade desses solventes. Essas

desvantagens fizeram com que nos últimos anos os pesquisadores começassem a estudar a síntese dos ésteres de açúcares em meios orgânicos.

O ácido acrílico e seus ésteres são, provavelmente, um dos mais versáteis compostos que aprimoram as características performáticas de milhares de polímeros. As maiores aplicações para estes ésteres estão nas indústrias de tintas, têxteis, adesivos, papéis e plásticos. Os polímeros acrílicos são considerados como não tóxicos, pois a maioria do ácido acrílico é convertida no seu éster correspondente.

O ácido acrílico possui uma elevada hidrofiliabilidade devido à capacidade de esterificação de seu grupo carboxílico com o grupo hidroxil dos açúcares. Além do mais, ele apresenta um grupamento vinílico que pode ser polimerizado. Conseqüentemente, os ésteres acrílicos são monômeros eficientes para produção de polímeros de açúcares.

Neste trabalho, foi estudada a esterificação enzimática da d-frutose com o ácido acrílico em meio orgânico catalisada por lipases e proteases objetivando a produção de acrilatos de frutose.

Este trabalho é uma linha de pesquisa recente do grupo, sendo assim as condições reacionais de esterificação como: meio de reação, quantidade de catalisador e temperatura foram determinadas de acordo com Tsukamoto (2006).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biocatálise

Os termos biocatálise ou biotransformação abrangem os processos em que um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato através de um número limitado de etapas enzimáticas.

Um grande impulso foi dado à biocatálise quando se descobriu a possibilidade de utilizar enzimas para catalisar um grande número de reações em meios não convencionais, como solventes orgânicos (KLIBANOV, 2001). Isto foi possível através das observações, inicialmente feita pelo grupo de Alexander M. Klibanov, que enzimas imobilizadas ou liofilizadas catalisavam reações que não ocorreriam em meio aquoso (ZAKS; KLIBANOV, 1984 e 1988).

Levando em conta que o conceito de biotransformação está associado ao uso de biocatalisadores, nas quais a água é o solvente preponderante, é fácil compreender que a mesma função tenha sido desempenhada por este solvente em inúmeros estudos de cinética enzimática. Observou-se, no entanto, que o uso exclusivo de água como solvente de meios de biotransformação restringia a gama de aplicações da biocatálise, bem como limitava a produtividade de diversos processos, nomeadamente os que envolviam substratos hidrófobos. Por outro lado, a constatação de que muitas enzimas operam *in vivo* em ambientes ricos em líquidos hidrófobos, levou à conclusão de que estes meios predominantemente não-aquosos são igualmente adequados à expressão de atividade biocatalítica.

A convergência destes dois aspectos conduziu à incorporação no meio reacional, de solventes orgânicos, fluidos supercríticos, fases gasosas ou fases sólidas, aos quais se convencionou atribuir a designação de meios não-convencionais. As principais razões para a utilização de meios não-convencionais são essencialmente o fato destes permitirem:

- 1) a redução de possíveis efeitos inibitórios ou/e tóxicos por parte do substrato e/ou produto, em que o solvente orgânico pode ser selecionado de modo a funcionar como diluente, reduzindo a concentração interfacial e na fase aquosa (por partição) de substratos e/ou produtos;
- 2) o deslocamento do equilíbrio químico. Nomeadamente no caso de enzimas hidrolases, que em meio aquoso catalisam reações de hidrólise, o equilíbrio pode ser deslocado no sentido do favorecimento de reações de síntese, através do controle da atividade da água. O equilíbrio da reação pode ser também deslocado no sentido do favorecimento da formação do produto, mediante a remoção contínua deste para a fase orgânica. Os meios não convencionais para biocatálise podem ser solventes orgânicos, fluidos supercríticos e, recentemente, fluidos iônicos. (AIRES-BARROS, 2001).

Atualmente, o grande desafio da biocatálise é o desenvolvimento de processos que estejam intimamente ligados às necessidades humanas e ambientais satisfazendo os interesses econômicos. O desenvolvimento de processos ecologicamente corretos torna-se interessante à medida que agrega valor aos seus produtos e esses adquirem preferência de mercado por satisfazerem às exigências de selos de qualidade, segurança e proteção ambiental.

2.2 Aspectos Históricos

As primeiras sínteses de ésteres de açúcares eram realizadas em solventes orgânicos tóxicos e de difícil remoção, tais como dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilpirrolidona (DMP).

Um processo envolvendo solvente polar aprótico (DMS) via catálise básica, conhecido como Hass-Snell, produziu os primeiros ésteres de açúcar comercializados no mundo. Esses ésteres foram inicialmente comercializados

como aditivos de alimentos no Japão em 1959 pela Dai Nippon Sugar Manufacturing Co. Ltd. Os produtos obtidos pela reação Hass-Snell não puderam ser comercializados na Alemanha e nos Estados Unidos, pois apresentavam odor ruim e materiais tóxicos. Um processo relativamente mais limpo conhecido como Nebraska-Snell envolveu a reação de uma emulsão de açúcar com ésteres metílicos de ácidos graxos em propilenoglicol, contendo carbonato de potássio (K_2CO_3) como catalisador.

O grupo de Feuge (FEUGE *et al.*, 1970) desenvolveu um processo de transesterificação sem solvente, reagindo sacarose fundida (p.f. 185°C) e ésteres metílicos na presença de sabões de lítio, sódio e potássio como solubilizantes e catalisadores. Contudo, grande parte do açúcar é perdida por degradação a esta temperatura. Devido à baixa solubilidade de açúcares em ácidos graxos fundidos, os rendimentos e regioseletividades geralmente são baixos.

Antes dos anos 80, trabalhos baseados na síntese química mostraram que a produção de ésteres de açúcares por essa via levava, geralmente, à coloração dos produtos, toxicidade e baixa seletividade. Nos anos 80, esterificações enzimáticas de açúcares (sacarose e vários monossacarídeos) que foram desenvolvidas em meio aquoso apresentaram como resultado baixas seletividade e produtividade. Na década seguinte, grandes avanços na área de biotecnologia levaram ao desenvolvimento de métodos biocatalíticos aplicáveis à fabricação compostos de alto valor agregado (ex.: surfatantes) que puderam ser produzidos sob condições mais brandas, maiores seletividades e menores toxicidades (LINDNER, 2005).

A maior preocupação quanto aos solventes é a sua admissão na produção de alimentos, cosméticos e medicamentos, ou seja, itens de consumo humano direto. Por isso, nos últimos anos estão sendo desenvolvidos métodos para eliminar ou substituir solventes tóxicos por outros menos nocivos e, se possível, mais voláteis; entre eles estão o terc-butanol, o álcool iso-amílico, acetona e etil-metil-cetona.

2.3 Biocatalisadores

Nos últimos anos, o uso de biocatalisadores na síntese orgânica tornou-se uma alternativa atrativa e crescente em relação aos métodos químicos tradicionais.

Muitas são as vantagens em se utilizar enzimas em métodos sintéticos, mas três características são as mais importantes:

- a) Quimiosseletividade: uma vez que o propósito de uma enzima é atuar em um único tipo de grupo funcional, outras funcionalizações sensíveis, que deveriam reagir normalmente com certo grau sob catálise química, são preservadas.
- b) Regiosseletividade: devido a sua complexa estrutura tridimensional, enzimas podem distinguir entre grupos funcionais que estão quimicamente situados em regiões diferentes no mesmo substrato.
- c) Enantiosseletividade: toda enzima é feita de L-aminoácidos e assim são catalisadores quirais. Como consequência, alguns tipos de quiralidade presentes no substrato são reconhecidos. Assim um substrato pró-quiral pode ser transformado em um produto opticamente ativo, e ambos enantiômeros de um substrato, podem reagir a diferentes velocidades, dispondo de uma resolução cinética.

Além dessas vantagens, as reações catalisadas por enzimas se dão, normalmente, sob condições moderadas de temperatura e pH, o que minimiza a isomerização e racemização dos produtos. E finalmente, os processos biocatalíticos são menos perigosos, menos poluentes e consomem menos energia que as metodologias tradicionais da catálise química, especialmente aquelas que fazem uso de metais pesados como catalisadores.

Enzimas são catalisadores que aumentam a taxa de uma reação química sem sofrerem mudança química permanente. Embora um catalisador afete a taxa de uma reação química, ele não afeta o equilíbrio da reação. Algumas enzimas

são extremamente específicas, o que significa que elas podem catalisar uma única reação envolvendo somente um único substrato. A especificidade da enzima é a sua conformação que permite a formação de “sítios ativos”, ou seja, uma cavidade hidrofóbica responsável pela habilidade catalítica da enzima (BAILEY e OLLIS, 1986).

Enzimas imobilizadas são enzimas ligadas num suporte matricial macroscópico para que o catalisador resultante possa ser reutilizado. As enzimas imobilizadas oferecem inúmeras vantagens se comparadas com as enzimas solúveis. As enzimas imobilizadas são catalisadores tipicamente macroscópicos e por isso sua separação de outros compostos e uma mistura reacional é simples. Além disso, grandes concentrações de catalisador podem ser obtidas, correspondentemente grandes produtividades volumétricas são possíveis (BLANCH e CLARK, 1997).

2.3.1 Aplicação das enzimas em síntese orgânica

Do ponto de vista biotecnológico, a utilização de sistemas reacionais em solventes orgânicos apresenta muitas vantagens, como elevada solubilidade dos substratos e produtos, reversão da reação hidrolítica e modificação da especificidade da enzima (KLIBANOV, 2001, ZAKS e KLIBANOV, 1985).

A utilização de meios quase anidros em bioconversões implica o uso de enzimas imobilizadas (Figura 2.1) num suporte sólido ou na forma de pó (liofilizados ou em cristais). Nos critérios de seleção do suporte de imobilização, deve ser tomada em conta a sua afinidade para a água, na medida em que a água presente no meio se particionará entre a matriz de imobilização, a enzima e o meio reacional, afetando o micro-ambiente deste (AIRES-BARROS, 2002).

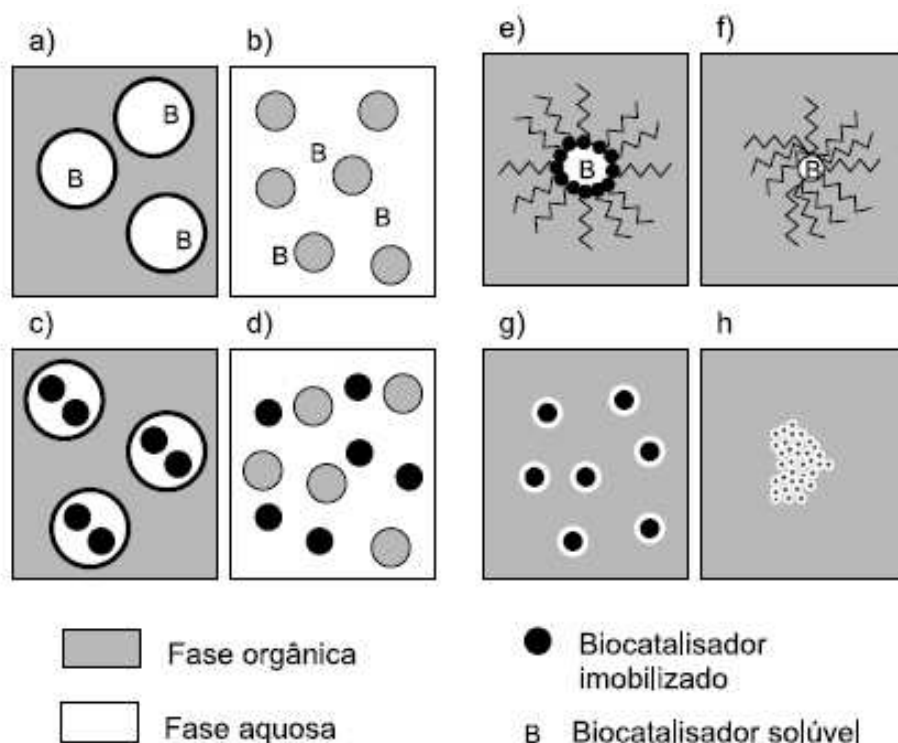


Figura 2.1: Classificação de sistemas biocatalíticos englobando solventes orgânicos: (a) sistemas de duas fases líquidas orgânico-aquosas: emulsão de meio aquoso (disperso) em meio orgânico (contínuo); (b) sistemas de duas fases líquidas orgânico- aquosas: emulsão de meio orgânico (disperso) em meio aquoso (contínuo); (c) e (d) biocatalisador immobilizado num suporte poroso, em presença de um sistema bifásico; (e) biocatalisador microencapsulado numa micela invertida; (f) biocatalisador modificado com polietilenoglicol e dissolvido em meio orgânico; (g) biocatalisador immobilizado ressuspenso em meio orgânico; (h) biocatalisador liofilizado e na forma de cristais, ressuspenso em meio orgânico.

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais comumente usados em síntese orgânica. Nessa classe, estão incluídas as amidases, proteases, esterases, nitrilases, fosfatases, epoxidases e as lipases.

2.3.1.1 Lipases

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) e atuam sobre a ligação éster de vários compostos.

Para sua identificação todas enzimas possuem um código EC do tipo A.B.C.D. Onde EC representa Enzyme Commission; A, denota o tipo principal de reação; B, indica a posição para o substrato ou da molécula transferida; C, indica a natureza do co-substrato; e D, é o número individual da enzima. Por exemplo, o código EC 3.1.1.3 corresponde a lipase de *Chromobacterium viscosum*. Neste caso, **3**, corresponde a classe das hidrolases; **3.1** atua sobre as ligações de ésteres; **3.1.1** indica que é hidrolases de ésteres carboxílicos e **3.1.1.3** é o número de série da enzima em sua subclasse.

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas.

O sucesso na aplicação de lipases na síntese orgânica se dá, em grande parte, pela sua grande estabilidade em solventes orgânicos, o que faz com que elas sejam extremamente úteis nas reações de esterificação.

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a ativação das lipases em meios orgânicos e elas incluem:

- a) uma mudança conformacional induzida interfacialmente gerando uma enzima mais ativa; isto é explicado pelo fato de que os sítios de adsorção na interface não são os sítios ativos onde ocorre a reação, desta forma, ao entrar em contato com a interface, a lipase assume uma nova conformação espacial;
- b) uma maior concentração do substrato no local;
- c) uma orientação mais favorável do substrato;
- d) um menor grau de hidratação do substrato, tendo em vista que a hidratação das moléculas de lipídeo representa uma proteção às

ligações éster. Logo, devido à redução do número de moléculas de água, esta proteção diminui, favorecendo a ação das lipases (YANG e RUSSEL, 1996).

Apesar das lipases serem usadas industrialmente há várias décadas, o número de aplicações e a quantidade de lipases manufaturadas são limitados. Conseqüentemente, a importância econômica das lipases na indústria tem sido muito restrita em comparação com as principais enzimas industriais, tais como proteases e carbohidrolases. A partir de 1984, com os estudos pioneiros de KLIBANOV *et al.* sobre o uso de lipases em solventes orgânicos contendo uma pequena quantidade de água ou mesmo sem a adição desta, novas aplicações para estas enzimas começaram a ser exploradas (YANG e RUSSEL, 1996).

2.3.1.2 Proteases

Enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases ou proteinases (EC 3.4. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. Estas endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em serina- (EC 3.4.21), cisteína- (EC 3.4.22), aspártico-proteinases ou endopeptidases (EC 3.4.23) e metalloproteinases ou metalloendopeptidases (EC 3.4.24). As enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99.

As proteases são catalisadores altamente estereoespecíficos e regioespecíficos. Requerem, geralmente, condições reacionais brandas com pH ótimo entre 6 e 8.

O uso de proteases em sínteses é feito muito antes do descobrimento de sua natureza química. Historicamente, as proteases são associadas à digestão protéica. Somente na década de 90 foram utilizadas as primeiras proteases na síntese orgânica. De toda a literatura onde as proteases são citadas, cerca de 10 % tem alguma ligação com síntese orgânica (BORDUSA, 2002).

Kodelia e Kolisis (1992) estudaram a acilação de flavonóides em solventes orgânicos catalisada por proteases.

A síntese enzimática de ésteres vinílicos de glicose catalisada pelas proteases *Streptomyces sp.* e *Bacillus subtilis* em n-n-dimetil-formamida foi estudada pelo grupo de Kitagawa (KITAGAWA *et al.*, 2002). Eles estudaram a influência de diferentes quantidades de água no meio reacional no desempenho da reação, verificando que a quantidade de água requerida é dependente do tipo de enzima utilizada.

Noritomi *et al.* (2007) examinaram a atividade de duas proteases na esterificação da n-acetil-fenilalanina em etanol (solvente miscível em água) e em octano (solvente imiscível em água) verificando que atividade da protease foi três vezes maior no solvente miscível do que no solvente imiscível em água, concluindo que a atividade das proteases em questão é afetada pela quantidade de água presente no meio reacional.

Considerando juntas as proteases, lipases e esterases fazem com que as hidrolases sejam as enzimas mais citadas na síntese orgânica.

2.4 Esterificação

A esterificação direta partindo-se de um ácido e um álcool e a transesterificação partindo-se de um éster e um álcool são as reações de maior importância na produção de químicos (HOYDONCKX *et al.*, 2004).

A esterificação direta pode ser uma reação catalisada ou até ocorrer de forma espontânea dependendo da miscibilidade dos reagentes, da temperatura e da acidez do ácido carboxílico.

Esterificações e transesterificações são reações de equilíbrio e elas freqüentemente produzem moléculas voláteis tais como: água e álcoois de baixos pesos moleculares. Na prática, pode ser usado o excesso de um dos reagentes para o deslocamento do equilíbrio ou a água pode ser continuamente removida por meio de adsorção, por agentes secantes, por destilação ou por membranas seletivas à água. A reatividade dos álcoois e ácidos carboxílicos na esterificação depende do impedimento estérico de ambos. Desta forma, as esterificações com ácidos ou álcoois terciários são lentas e a velocidade diminui na seguinte ordem (MORRISON e BOYD, 1981; HOYDONCKX *et al.*, 2004):



A relação entre as velocidades da reação direta (esterificação) e da reação inversa (hidrólise) é usualmente controlada pela quantidade de água do meio reacional.

O grau de esterificação é altamente dependente das condições de reação, em especial, do conteúdo de água reacional para que a hidrólise seja evitada. A adição de solventes orgânicos no meio tem sido usada como forma de impedir a hidrólise e aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos, tornando viável a reação de esterificação.

2.4.1 Efeito da Água na Esterificação

Nas reações de esterificação, a água é um subproduto de fundamental importância no equilíbrio químico reacional. Além do mais, a quantidade de água é um parâmetro importante, pois afeta a atividade enzimática da lipase no meio. O nível de hidratação da enzima apresenta grande influência na flexibilidade da proteína e sendo assim, influencia também sua atividade catalítica. Por isso é necessário haver um grande controle na quantidade de água nas reações de esterificação. A quantidade de produto formado pode ter grande variação dependendo do meio reacional e da quantidade de água presente no mesmo. Embora a atividade de água em um sistema enzimático em meio orgânico seja muito baixa (em torno de 0,01 % p/v), pequenas variações no conteúdo de água podem provocar grandes modificações na atividade enzimática.

A água contribui com a integridade estrutural da lipase, com a polaridade do seu sítio ativo e com a estabilidade da proteína. Ela provém interações hidrofóbicas com os resíduos polares na molécula da enzima que poderiam estar reagindo uns com os outros gerando uma estrutura conformacional incorreta. A água também pode limitar a solubilidade dos substratos hidrofóbicos ao redor da enzima. A quantidade de água necessária para cada lipase varia significativamente dependendo de sua origem. A água presente dentro do catalisador é mais importante do que a quantidade de água total do sistema reacional no que diz respeito à atividade enzimática.

Grandes quantidades de água no meio podem gerar alguma proteção para que a enzima não sofra desnaturação pelos substratos, porém esse excesso de água pode causar problemas relacionados à transferência de massa, especialmente para substratos hidrofóbicos (YAHYA *et al.*, 1998). Contudo, pequena quantidade de água no meio reacional é essencial para a atividade enzimática da lipase e um aumento ou decréscimo na concentração de água, afetará diretamente a produtividade. Por isso, é necessário a manutenção de um nível ótimo de água durante toda a reação.

A estabilidade enzimática, normalmente diminui com o aumento da quantidade de água. A água participa numa variedade de mecanismos que causam a desnaturação da proteína conduzindo à inativação das enzimas. Em micelas reversas consegue-se uma estabilidade elevada através do controle da atividade da água. Para biocatalisadores resuspensores em solventes orgânicos, obtém-se em geral estabilidades elevadas, uma vez que a quantidade de água é muito pequena (valores de atividade de água $< 0,1$ % p/v) e as enzimas adquirem uma maior rigidez conformacional). Além disso, não ocorre proteólise, outra causa comum de desnaturação em água.

Por fim, a água atua como um substrato nas reações de hidrólise e deste modo estas reações são favorecidas com o aumento da quantidade de água, e inversamente o rendimento das reações de síntese é menor (AIRES-BARROS, 2002).

2.4.2 Ésteres de açúcar

Recentemente, tem crescido o interesse na produção de ésteres contendo moléculas de açúcar devido à vasta aplicação desses compostos como surfatantes nas indústrias farmacêuticas e de detergentes. Além disso, estes ésteres são biodegradáveis, biocompatíveis e atóxicos (PARK *et al.*, 2004).

Os ésteres de açúcares constituem um grupo com excelentes aplicações em variados segmentos industriais. Essas moléculas são excelentes agentes emulsificantes, estabilizantes e condicionantes. Esses compostos são de difícil obtenção por esterificação química devido à utilização de temperaturas elevadas, a qual causa coloração do produto final. O uso de um catalisador biológico, sob condições mais brandas de reação, para a síntese de ésteres de açúcares supera esse problema e esta prática vem sendo largamente utilizada nos últimos anos (RIVA e SECUNDO, 1990).

Schlotterbeck *et al.*, (1993) analisaram a monoacilação de frutose catalisada pela lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme IM60 da Novozymes) utilizando ácido esteárico, frutose e ácido fenilborônico em hexano. Foram estudadas diferentes razões molares entre frutose/ácido fenilborônico. Os resultados obtidos mostraram que a razão de 1:1 apresentou melhor rendimento do produto.

Patil, Dordick e Rethwisch (1996) estudaram a transesterificação de acrilato de sacarose a partir de sacarose diluída em piridina anidra contendo acrilato de vinila (razão molar de 1:1,1 (açúcar: acrilato de vinila)) catalisada pela enzima Optimase M440 à temperatura ambiente. A formação dos ésteres foi monitorada por cromatografia em camada delgada em placa sílica. Rendimentos de 56 e 31% foram obtidos para mono e diacrilato.

Soultani *et al.*, (2001) utilizaram a lipase SP435 de *Candida antarctica* na reação entre frutose e ácido esteárico em 2-metil-2-butanol. Os autores verificaram que as maiores formações de ésteres ocorreram quando se utilizou o ácido graxo (ácido esteárico) em excesso, na razão de 1:5 (frutose: ácido esteárico).

Torres e Otero (2001) estudaram a esterificação enzimática direta entre ácido láctico e ácidos graxos (razão molar 10:1), catalisada pela Novozym 435 a 60°C em n-hexano obtendo um rendimento de 55% de 2-lactato de o-caproila.

Pedersen *et al.* (2002) estudaram a esterificação entre ácidos graxos (cadeia carbônica de C-4 a C-12) e açúcares, catalisada pela CalB de *Candida antarctica* em terc-butanol e piridina.

O interesse do presente trabalho na reação de síntese de acrilatos de frutose é devido, principalmente, às características funcionais dos substratos bem como a aplicação industrial dos produtos em questão.

O ácido acrílico (Figura 2.2) é altamente hidrofílico e possui elevada capacidade de esterificação de sua carboxila com as hidroxilas dos açúcares. Além disso, ele possui um grupamento vinílico que pode ser polimerizado e, conseqüentemente, os ésteres do ácido acrílico são monômeros eficientes para a

produção de polímeros de açúcar com alta hidrofilicidade e biocompatibilidade (PARK *et al.*, 2004). A incorporação de moléculas de açúcar em polímeros (isto é: poly (ésteres, amidas, acrilatos, etc)), pode aumentar significativamente a aplicação desses compostos nas áreas da síntese orgânica, entre outras (HODGE, 1988).

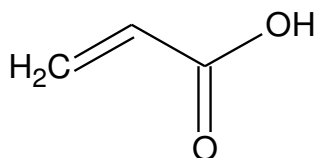


Figura 2.2: Estrutura química do ácido acrílico

A elevada hidrofilicidade do ácido acrílico se deve ao seu grupamento carboxílico, capaz de esterificar o grupo hidroxila de açúcares (Figura 2.3), além da presença de grupo vinila que pode ser polimerizado (PARK *et al.*, 2004).

Uma das razões para o grande interesse na síntese de ésteres de açúcar é que os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza. Sua fórmula geral é $(CH_2O)_n$. Quimicamente eles são de função mista poliálcool-aldeído ou poliálcool-cetona que podem ser reduzidos a álcoois de açúcares, podem ser oxidados a ácidos de açúcares e ainda seus grupos hidroxil podem ser substituídos ou derivatizados. Além disso, eles são moléculas polifuncionais com múltiplos grupos hidroxil que são sensíveis ao calor ou a condições ácidas e básicas.

Esta polifuncionalidade permite que vários compostos sejam obtidos a partir das reações mais simples. Diferentes graus de substituição resultam em diferentes propriedades físico-químicas daí a grande aplicabilidade desses compostos. Para o controle do grau de substituição, a regioseletividade do açúcar deve ser bem compreendida. Dependendo das condições de reação e do catalisador, a transformação pode ser orientada em diferentes posições.

A frutose é um monossacarídeo ($C_6H_{12}O_6$), com os carbonos dispostos em anel. O anel da frutose contém quatro átomos de carbono e um de oxigênio.

Nesse anel o primeiro e o quinto átomo de carbono estão ligados a outro carbono que está fora do anel, formando um grupo CH_2OH (Figura 2.3).

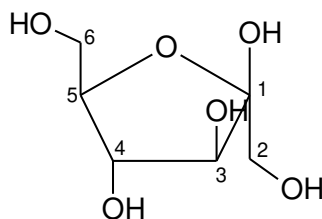


Figura 2.3: Estrutura espacial da frutose

Até o presente momento, não foram encontrados na literatura processos de esterificação direta do ácido acrílico e carboidratos utilizando lipases em meio orgânico. Entretanto, os polímeros dos mesmos são descritos pela literatura como altamente valiosos devido à propriedade de absorver elevada quantidade de água em relação ao seu peso, formando hidrogéis. Estes teriam inúmeras aplicações como materiais absorventes na indústria cosmética, médica e cirúrgica (implantes orais e outros) bem como novos produtos poderiam ser ainda desenvolvidos com os mesmos, com a vantagem de possuírem elevada composição de material de origem renovável (STAPLES *et al.*, 2000; PARK e CHANG, 2000).

2.4.3 Cinética das reações de esterificação enzimática

A modelagem cinética de qualquer reação é de extrema importância na indústria, especialmente para o projeto de reatores, para o controle e otimização dos processos reacionais e para avaliar os efeitos das condições operacionais na taxa de formação de produtos entre outros.

A implementação comercial dos processos biocatalíticos requer a determinação de expressões de taxas que descrevem a performance do reator em

termos dos fatores que controlam a reação, isto é, concentração de substratos, temperatura, umidade inicial quantidade de catalisador.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar as reações catalisadas pelas lipases: reações de pseudo-primeira ordem (OTERO *et al.*, 1990), mecanismo generalizado de Michaelis-Menten (YAMANE *et al.*, 1986), mecanismo uni-bi (WANG, 1981) e o mecanismo ordenado do tipo bi-bi (SUGIURA e ISOBE, 1976). Porém, para as reações catalisadas pelas lipases o mecanismo mais usado na literatura é o chamado mecanismo do tipo ping-pong bi-bi (SEGEL, 1975).

No mecanismo ping-pong bi-bi um produto é liberado devido à adição de dois substratos. Tanto a acilação quanto a desacilação da enzima podem ser controladas (MALCATA *et al.*, 1992). Outra evidência complementar que atesta esse tipo de mecanismo é o trabalho de Semeriva *et al.* (1974) que relatou a existência de um intermediário acetil-enzima na hidrólise do p-nitrofenil acetato. Arcos *et al.* (2001) aplicaram o mecanismo do tipo ping-pong bi-bi para descrever a taxa de acilação da glicose com ácidos graxos em acetona anidra.

Considerando que a reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico segue o mecanismo do tipo ping-pong bi-bi, têm-se as seguintes etapas de reações:



Onde S é a frutose, E a enzima, $S.E$ o complexo frutose-enzima, A o ácido acrílico, $A.E$ o complexo ácido acrílico-enzima, $S.E.A$ o complexo frutose-ácido acrílico-enzima, M o monoéster e W a água.

Considerando a reação 2.5 como sendo irreversível e a etapa determinante da seqüência de reações e assumindo que as reações 2.1, 2.2 e 2.3 são reversíveis, obtém-se as seguintes equações:

$$K_S = \frac{[S.E]}{[S][E]} \quad (2.6)$$

$$K_A = \frac{[A.E]}{[A][E]} \quad (2.7)$$

$$\alpha K_S = \frac{[S.E.A]}{[A][S.E]} \quad (2.8)$$

$$\alpha K_A = \frac{[S.E.A]}{[S][A.E]} \quad (2.9)$$

A taxa da reação é dada pela taxa da etapa (2.5):

$$-r_S = k_{15}[S.E.A] \quad (2.10)$$

Contudo, a concentração do complexo $[S.E.A]$ pode ser obtido através das equações 2.3 e 2.4, logo:

$$-r_S = k_{15}\alpha K_A K_S [A][S][E] \quad (2.11)$$

Onde:

$$[E_t] = [E] + [S.E] + [A.E] + [S.E.A] \quad (2.12)$$

Substituindo de 2.6 a 2.9, obtém-se:

$$[E_t] = [E] + K_S [S][E] + K_A [A][E] + \alpha K_S K_A [S][A][E] \quad (2.13)$$

Resolvendo para $[E]$:

$$[E] = \frac{[E_t]}{1 + K_S [S] + K_A [A] + \alpha K_S K_A [S][A]} \quad (2.14)$$

Logo, a taxa de consumo da frutose é dada por:

$$-r_s = \frac{k_{15} \alpha K_S K_A [A][E_t]}{1 + K_S [S] + K_A [A] + \alpha K_S K_A [S][A]} \quad (2.15)$$

Levando em consideração que a reação 2.5 seja reversível, ou seja, considerar que a hidrólise do monoéster também segue o mecanismo do tipo ping-pong, tem-se:

$$-r_s = \frac{(k_{15} \alpha_1 K_S K_A [S][A] - k_{-15} \alpha_{-1} K_M K_W [M][W])[E_t]}{\phi_1} \quad (2.16)$$

Onde:

$$\begin{aligned}\phi = & 1 + K_S[S] + K_A[A] + K_M[M] + K_W[W] + \dots \\ & \dots + \alpha_1 K_S K_A [S][A] + \alpha_{-1} K_M K_W [M][W]\end{aligned}\quad (2.17)$$

Se as etapas de decomposição do monoéster e do diéster (ou formação de diéster e triéster) forem consideradas, porém negligenciando as seguintes etapas de transesterificação:



Obtém-se:

$$r_1 = \frac{(k_{15}\alpha_1 K_S K_A [S][A] - k_{-15}\alpha_{-1} K_M K_W [M][W])[E_t]}{\phi} \quad (2.19)$$

$$r_2 = \frac{(k_{25}\alpha_2 K_M K_A [M][A] - k_{-25}\alpha_{-2} K_D K_W [D][W])[E_t]}{\phi} \quad (2.20)$$

$$r_3 = \frac{(k_{35}\alpha_3 K_D K_A [D][A] - k_{-35}\alpha_{-3} K_T K_W [T][W])[E_t]}{\phi} \quad (2.21)$$

Onde:

$$\begin{aligned}\phi = & 1 + K_S[S] + K_A[A] + K_M[M] + K_D[D] + K_T[T] + K_W[W] + \dots \\ & \dots + \alpha_1 K_S K_A [S][A] + \alpha_{-1} K_M K_W [M][W] + \alpha_2 K_M K_A [M][A] + \dots \\ & \dots + \alpha_{-2} K_D K_W [D][W] + \alpha_3 K_D K_A [D][A] + \alpha_{-3} K_T K_W [T][W]\end{aligned}\quad (2.21)$$

Assim, a taxa de consumo da frutose é dada por:

$$-r_S = r_1$$

Enquanto que a taxa de consumo do ácido acrílico é dada por:

$$-r_A = r_1 + r_2 + r_3$$

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Enzimas

Foram utilizadas as seguintes enzimas comerciais para a realização dos experimentos (Tabela 3.1):

Tabela 3.1: Enzimas utilizadas nos experimentos de esterificação

	Nome Comercial	Enzima	Formulação
Lipases	Novozym 435 (Lote: LC200206)	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	Imobilizada em resina acrílica macroporosa
	Lipozyme RM IM (Lote: LUX00205)	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	Imobilizada
	Lipozyme TL IM (Lote: LA35008201)	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Imobilizada em sílica
Proteases	Esperase HPF (Retirada no dia 18-05-2004 – Planta Piloto Novozymes)	Protease de <i>Bacillus lentus</i>	Congelada
	Novozym 539 HP F (Retirada no dia 26-10-2004 – Planta Piloto Novozymes)	Protease de um <i>Bacillus</i> geneticamente modificado	Congelada

* Todas as enzimas utilizadas foram gentilmente cedidas pela Novozymes

3.1.2 Reagentes

Os seguintes materiais foram usados durante o trabalho experimental:

- Ácido Acrílico ($C_3H_4O_2$), SIGMA,
PM = 72,01 g/mol; ρ = 1,051 g/mL.
- Terc-butanol ($(CH_3)_3COH$), TEDIA,
PM = 74,12 g/mol; ρ = 0,775 g/mL.
- d-Fructose ($C_6H_{12}O_6$), MERCK,
PM = 180,16 g/mol.
- Ácido Sulfúrico (H_2SO_4), MERCK,
PM = 98,08 g/mol; ρ = 1,85 g/mL.
- Peneira Molecular 5 Å.

3.2 Equipamentos Utilizados

- Shaker (TECNAL TE-420)
- Cromatógrafo Líquido (WATERS)
- Karl Fischer Coulométrico (METROHM 831)

3.3 Métodos Experimentais

3.3.1 Solubilização do Açúcar

A solubilização da frutose (Merck) em terc-butanol (Tedia) anidro foi realizada em shaker por meio de agitação constante a 200 rpm (Figura 3.1) na concentração de 0,1 M (18,32 g/L), à temperatura constante de 55 °C por 24 horas.

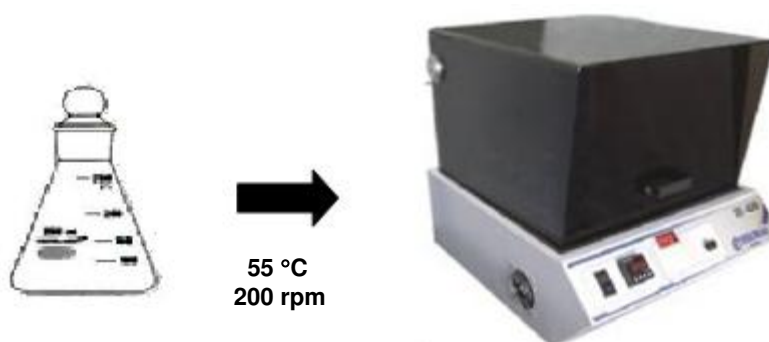


Figura 3.1: Procedimento de solubilização da frutose

As condições reacionais dos ensaios de solubilização da frutose foram baseadas na metodologia experimental de Tsukamoto (2006).

3.3.2 Esterificação Enzimática

Para a obtenção dos dados da reação de esterificação, os experimentos de síntese foram realizados em erlenmeyers de 50 mL com tampa vidro esmerilhada, sob agitação constante de 200 rpm em shaker, na temperatura de 55°C durante 24 horas.

O sistema reacional é constituído pela frutose previamente solubilizada em terc-butanol anidro, ácido acrílico, biocatalisador, totalizando um volume de 25 mL.

Foram utilizadas diferentes razões molares de frutose para ácido acrílico, diferentes tipos de catalisadores e variou-se a umidade inicial do sistema reacional. Durante o processo de síntese, foram retiradas alíquotas para posterior quantificação em HPLC e quantificação de água em Karl Fischer.

3.3.3 Reutilização enzimática

Para verificar possibilidade de reutilização da Novozym 435 na síntese da frutose, foram realizadas cinco reações de esterificação da frutose com o ácido acrílico em terc-butanol catalisada pela Novozym 435 na temperatura de 55°C durante 120 horas. As condições reacionais são apresentadas na Tabela 3.2:

Tabela 3.2: Condições reacionais aplicadas à síntese de acrilatos de frutose

Condição	Valor
Concentração de frutose em terc-butanol	18,32 g/L
Razão molar entre a frutose e o ácido acrílico	1:5
Temperatura	55°C
Tempo total de reação	24 h
Massa de catalisador	1,4 g

A cada 24 horas de reação, a enzima foi filtrada do meio e sem nenhum tipo de tratamento suplementar foi adicionada a um novo sistema reacional nas mesmas condições descritas na Tabela 3.2.

Durante o processo de síntese, foram retiradas alíquotas para posterior quantificação em HPLC e quantificação de água em Karl Fischer.

3.3.4 Planejamento Estatístico

Quando se estuda a influência de dois ou mais parâmetros na determinação de uma grandeza, a simples variação de um parâmetro mantendo o outro fixo e vice-versa, não avalia a interação de dois fatores na resposta. Diante disso, pesquisadores, com conhecimentos estatísticos, estabeleceram metodologias de planejamento experimental de forma a minimizar a quantidade de experimentos necessários para avaliar a influência de fatores (variáveis independentes) numa determinada resposta (variáveis dependentes) (BARROS *et al.*, 2001).

A metodologia de superfície de resposta (ou RSM, de *Response Surface Methodology*) é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por G.E.P. Box na década de 50 e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais. A metodologia de superfície de resposta tem duas etapas distintas – modelagem e deslocamento, que são repetidas quantas vezes forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem normalmente é realizada ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) a respostas obtidas com planejamentos fatoriais ou com planejamentos fatoriais ampliados. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (BARROS *et al.*, 2001).

O método mais utilizado para avaliar a qualidade do ajuste de um modelo é a Análise da Variância (ANOVA) do planejamento experimental (Tabela 3.3). Esta tabela fornece os dados para calcular a falta de ajuste.

Baseando-se em resultados previamente obtidos, foi realizado um estudo do efeito das variáveis: razão molar de substratos, umidade inicial do sistema, com o objetivo de determinar a melhor combinação dessas variáveis para a conversão máxima de frutose e máxima produção de monoéster.

Tabela 3.3: Análise de Variância (ANOVA)

Fonte de Variação	Soma Quadrática SQ	Graus de liberdade GI	Média Quadrática MQ	F _{calculado}	F _{tabelado} *
Regressão (R)	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{ni} (y_i - \bar{y})^2$	p-1	$MQ_R = SQ_R/(p-1)$	$F = \frac{MQ_R}{MQ_r}$	$F_{p-1, n-p}$
Resíduos (r)	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{ni} (y_i - \hat{y}_i)^2$	n-p	$MQ_r = SQ_r/(n-p)$		
Falta de ajuste (FA)	$SQ_{FA} = \sum_i^m \sum_j^{ni} (y_i - \bar{y}_i)^2$	m-p	$MQ_{FA} = SQ_{FA}/(m-p)$	$F = \frac{MQ_{FA}}{MQ_{EP}}$	$F_{m-p, n-1}$
Erro puro (EP)	$SQ_{EP} = \sum_i^m \sum_j^{ni} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	n-m	$MQ_{EP} = SQ_{EP}/(n-m)$		
Total (T)	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{ni} (y_{ij} - \bar{y})^2$	n-1			

(*) F_{tabelado} com % de confiança escolhida (usualmente 95 %).

% de variação explicada = SQ_R/SQ_T

% máxima de variação explicável = $(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T$

onde:

$SQ_T = SQ_R + SQ_r$, $SQ_r = SQ_{FA} + SQ_{EP}$,

p é o número de parâmetros do modelo,

n é número total de observações,

m é o número de variáveis distintas,

$\bar{y}$ é a média global,

$\hat{y}_i$ é valor previsto do modelo,

y_i é o valor observado,

$\bar{y}_i$ é media das respostas observadas no nível i,

$(\hat{y}_i - \bar{y})$ representa o afastamento da previsão do modelo para o ponto questão, $\hat{y}_i$, em relação a média,

$(y_i - \hat{y}_i)$ é a diferença entre o valor observado e o valor previsto,

$(\hat{y}_i - \bar{y})$ depende do modelo e será tanto maior quanto mais estimativas para um dado nível, $\hat{y}_i$, se afastarem do valor médio das respostas determinadas nesse nível, $\bar{y}$. Este termo fornece uma medida da falta de ajuste do modelo às respostas observadas.

Para analisar se os modelos empíricos obtidos através da regressão multilinear ou não linear apresentam um grau de ajuste adequado aos dados experimentais, pode-se usar um teste F da razão MQ_{FA}/MQ_{EP} . Valores altos de MQ_{FA}/MQ_{EP} significam falta de ajuste do modelo, o valor desta razão deve ser menor do que o valor do ponto da distribuição F tabelado, com seus respectivos graus de liberdade e nível de significância desejado.

Através da realização do teste F, ou seja, comparando o valor estimado para F a partir dos dados experimentais com o valor tabelado para uma distribuição de referência, é possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas. O fundamento do teste F consiste em verificar se existe ou não relação entre as variáveis e a resposta. Segundo Barros Neto *et al.* (2001), quando não há relação entre a resposta e a variável, pode-se demonstrar que a razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos (falta de ajuste mais erro puro) MQ_R/MQ_r segue uma distribuição F (hipótese nula). Neste caso, a variação nos valores dos resultados foi exclusivamente devido a fatores aleatórios. A hipótese nula pode ser testada comparando o valor efetivamente calculado para MQ_R/MQ_r com o valor de F tabelado. Se as variações nas respostas observadas experimentais apresentarem alta probabilidade de pertencerem a esta distribuição, não há razão para duvidar da hipótese nula.

Por outro lado, se a razão MQ_R/MQ_r for maior que F tabelado, pode-se afirmar que a equação é estatisticamente significativa e os dados experimentais são representados pelo modelo proposto. Deste modo BARROS NETO *et al.* (1995), sugerem que, para que a regressão seja estatisticamente significativa e preditiva, o valor da razão MQ_R/MQ_r deve ser no mínimo 3 a 5 vezes superior ao valor de F tabelado.

Um planejamento fatorial completo com 2 níveis e com repetição foi utilizado para avaliar a relação entre a conversão de frutose, conversão de ácido acrílico e produção de mono, di e triéster (variáveis dependentes) com os fatores experimentais. Os níveis das variáveis experimentais utilizadas são expressos na Tabela 3.4:

Tabela 3.4: Níveis das variáveis utilizados nos ensaios de esterificação da frutose com o ácido acrílico

Variável Independente	Símbolo	Nível	
		-1	+1
Razão Molar F : AA	x_1	1:5	1:20
Umidade Inicial do Sistema (%)	x_2	0,16	0,40

Para um sistema de dois fatores, o modelo estatístico é definido pela equação 3.1:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (3.1)$$

onde: Y representa a variável de resposta; β_0 , β_1 , β_2 , β_{12} representam os coeficientes da regressão e x_1 , x_2 representam as variáveis estudadas.

Os valores das variáveis foram codificados no planejamento fatorial de acordo com a equação 3.2:

$$Z = \frac{N - \mu}{\frac{(\Delta N)}{2}} \quad (3.2)$$

onde: Z é o valor codificado da variável; N é valor real da variável; μ é a média dos valores reais das variáveis e ΔN é o valor real máximo da variável.

O planejamento experimental e a análise estatística dos resultados foram realizados utilizando o software STATISTICA 7.0, considerando como variáveis de resposta a conversão de frutose, conversão de ácido acrílico e a produção de monoéster.

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para a quantificação dos acrilatos de frutose, da frutose e do ácido acrílico, utilizou-se um sistema de cromatografia líquida consistindo de bomba WATERS 514, injetor automático WATERS 717 e um detector índice de refração WATERS 410. O tipo de coluna utilizada foi uma SHODEX SH 1011 (8x300mm) conectada a uma pré-coluna SHODEX SH-G (6x50 mm, 10 μ m o tamanho da partícula).

As condições de análise foram as seguintes:

- Temperatura isocrática de 50°C;
- Fase móvel H₂SO₄ na concentração de 0,001N;
- Fluxo laminar de 1mL/min.

As análises foram realizadas em duplicata e a quantidade de amostras analisadas foi de 20 µL.

Os dados foram processados pelo software EMPOWER versão 2.0.

A conversão dos substratos foi expressa em termos de conversão molar empregando a equação 3.3:

$$\% \text{ Molar} = \left[\frac{(C_0 - C)}{C_0} \right] \times 100 \quad (3.3)$$

onde: C_0 é a concentração inicial do substrato e C é a concentração do substrato num dado tempo.

Não havendo a existência de padrões para a quantificação dos acrilatos de frutose, foi calculada a produção relativa para cada éster, baseando-se em suas respectivas áreas obtidas nos cromatogramas (Equação 3.4):

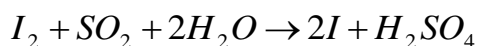
$$\text{produção (\%)} = \left[\frac{A_E}{(A_M + A_D + A_T)} \right] \times 100 \quad (3.4)$$

onde: A_E é a área para o éster em questão, A_M é a área do monoéster, A_D é a área do diéster e A_T é a área do triéster.

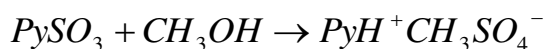
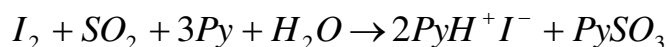
3.4.2 Karl Fischer

Os teores de água do sistema reacional foram medidos em um titulador coulométrico (METROHM 831).

A determinação da quantidade de água é baseada na reação,

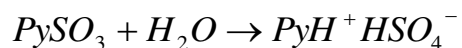
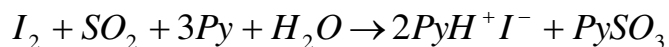


Karl Fischer descobriu que esta reação poderia ser utilizada para a determinação da quantidade de água presente em sistemas não-aquosos contendo um excesso de dióxido de enxofre. O metanol se mostrou um solvente satisfatório. Para alcançar o equilíbrio em direção à direita, é necessário neutralizar os ácidos formados durante a reação. Então, Karl Fischer utilizou piridina para este propósito. Smith e seus colaboradores formularam uma reação em duas etapas:



De acordo com essas equações, o metanol não age somente como um solvente, mas também participa diretamente da reação. Em uma solução alcoólica, a reação entre o iodo e a água se dá na estequiometria de 1:1.

Em uma solução livre de álcool, a reação entre o iodo e a água se dá na estequiometria de 1:2:



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Influência do catalisador utilizado na reação de síntese da frutose

O objetivo dessa série de ensaios foi o de verificar a influência do catalisador utilizado na reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico, ou seja, verificar qual desses catalisadores possibilitariam a maior conversão de frutose e a maior produção de seus ésteres.

As condições reacionais e os catalisadores utilizados nas reações de esterificação estão demonstrados nas Tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente:

Tabela 4.1: Condições reacionais aplicadas à síntese de acrilatos de frutose

Condição	Valor
Concentração de frutose em terc-butanol	18,32 g/L
Razão molar entre a frutose e o ácido acrílico	1:5
Temperatura	55°C
Tempo total de reação	24 h
Massa de catalisador	1,4 g

Em todos os ensaios, a única condição a ser variada foi o tipo de catalisador.

Tabela 4.2: Lipases utilizadas nos experimentos de esterificação

Lipases	Novozym 435
	Lipozyme RM IM
	Lipozyme TL IM
Proteases	Esperase HP F
	Novozym 539 HPF

A lipase Novozym 435 forneceu uma conversão molar de 50,39 % em 8 horas de reação. A continuidade da reação até o período de 24 horas de reação, não foi um fator decisivo para aumentar a conversão da frutose, sendo a conversão molar final (após 24 h de reação) de 52,22 %.

As lipases Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM bem como as proteases Esperase HP F e Novozym 539 HPF não catalisaram a reação de esterificação da frutose com ácido acrílico em terc-butanol.

Os resultados obtidos nesta etapa são mostrados na Figura 4.1, onde os dados detalhados estão no Apêndice 8.1.

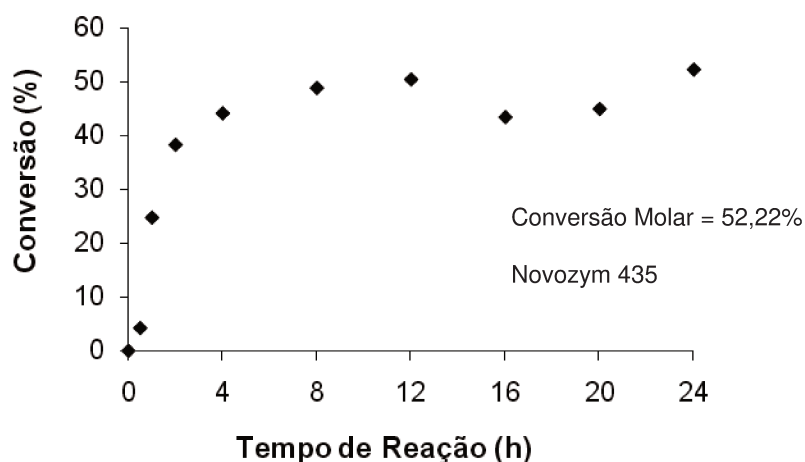


Figura 4.1: Perfil de conversão molar da frutose na reação de esterificação com o ácido acrílico catalisada pela Novozym 435

4.2 Efeito da razão molar dos substratos na esterificação da frutose com o ácido acrílico utilizando Novozym 435

Foi verificada a influência da razão molar entre a frutose (F) e o ácido acrílico (AA) na síntese de acrilatos de frutose catalisada pela Novozym 435, em termos da conversão de frutose.

As condições reacionais utilizadas nas reações de esterificação estão demonstradas na Tabela 4.3:

Tabela 4.3: Condições reacionais aplicadas à síntese de acrilatos de frutose

Condição	Valor
Concentração de frutose em terc-butanol	18,32 g/L
Temperatura	55°C
Tempo total de reação	24 h
Massa de catalisador	1,4 g

Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 4.2 e 4.3 estando estes dados detalhados no Apêndice 8.2.

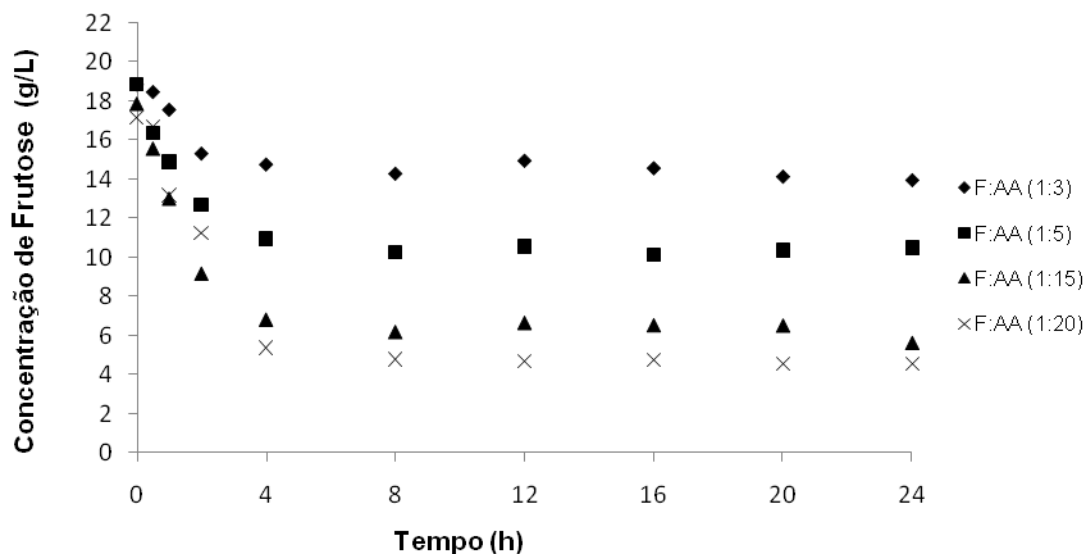


Figura 4.2: Perfil de consumo da frutose na síntese de acrilatos de frutose para meios reacionais contendo frutose e ácido acrílico em diferentes razões molares

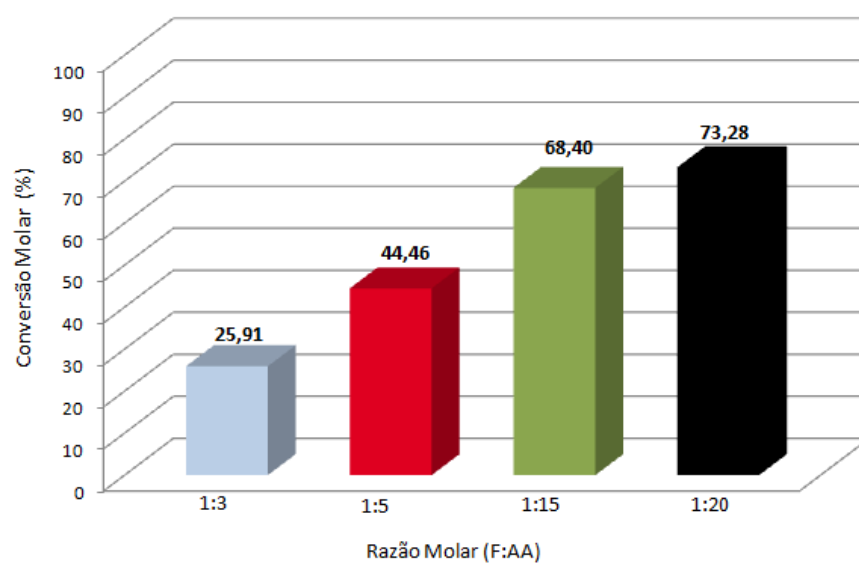


Figura 4.3: Conversão molar máxima alcançada nas reações de síntese de acrilatos de frutose para meios reacionais contendo frutose e ácido acrílico em diferentes razões molares

Verifica-se que o perfil de consumo da frutose na formação de acrilatos de frutose foi dependente da razão molar dos materiais de partida. Quando a razão molar dos substratos era de 1:3 (F:AA), o consumo de frutose foi de 4,56 g/L em 8 horas de reação. Esse consumo elevou-se para 11,56 g/L quando a razão molar dos substratos aumentou para 1:15. Este fato pode ser melhor observado na Figura 4.3, onde a conversão máxima de frutose em 24 horas de reação foi de 26% na razão molar de substratos em 1:3, 44% na razão molar de substratos em 1:5, 68% na razão molar de substratos em 1:15 e 73% na razão molar de substratos em 1:20. Os resultados acima comprovaram o comportamento altamente satisfatório quando a razão molar dos substratos é aumentada.

Sendo assim, a razão molar de substratos é um fator de extrema importância no estudo da reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico

4.3 Reutilização Enzimática

Com o propósito de verificar a possibilidade de reciclo da Novozym 435, foram realizadas cinco reações de esterificação da frutose com o ácido acrílico em terc-butanol catalisadas pela Novozym 435 na temperatura de 55°C durante 120 horas. A cada 24 horas de reação, a enzima foi filtrada do meio e sem nenhum tipo de tratamento suplementar foi adicionada a um novo sistema reacional nas mesmas condições indicadas na Tabela 4.4.

O experimento consistiu em verificar se o catalisador ao ser reutilizado, atingiria níveis de conversão semelhantes aos do primeiro dia de reação (reação de referência) (Figuras 4.4 e 4.5).

A atividade da Novozym 435 foi avaliada em termos de conversão de frutose.

Tabela 4.4: Condições reacionais aplicadas

Condição	Valor
Concentração de frutose em terc-butanol	18,32 g/L
Razão Molar F : AA	1:5
Temperatura	55°C
Tempo total de reação	24 h
Massa de catalisador	1,4 g

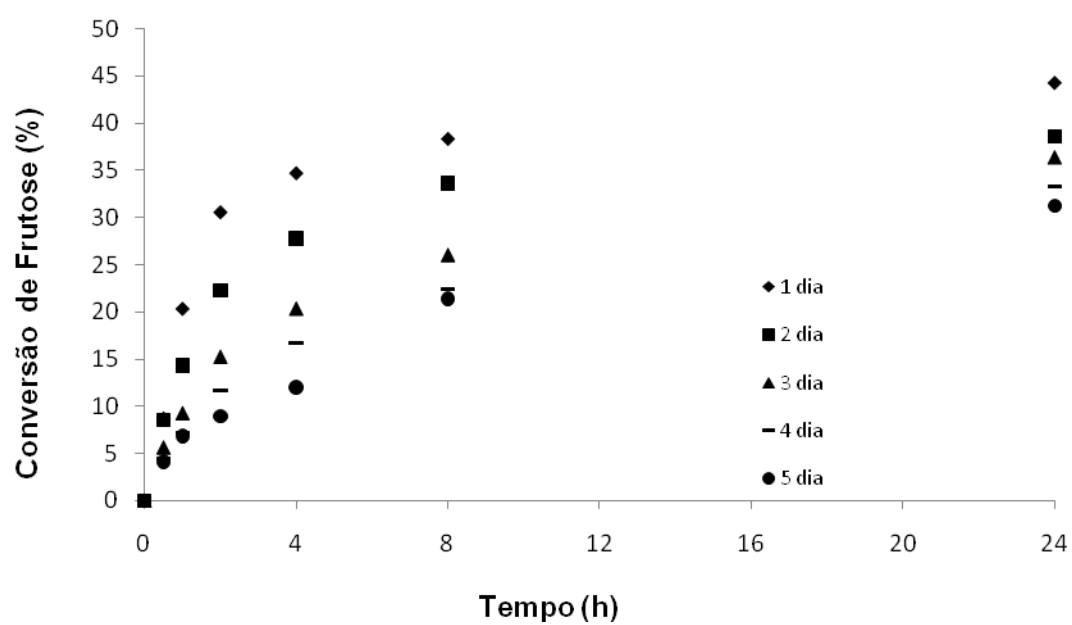


Figura 4.4: Perfil de conversão molar da frutose na esterificação

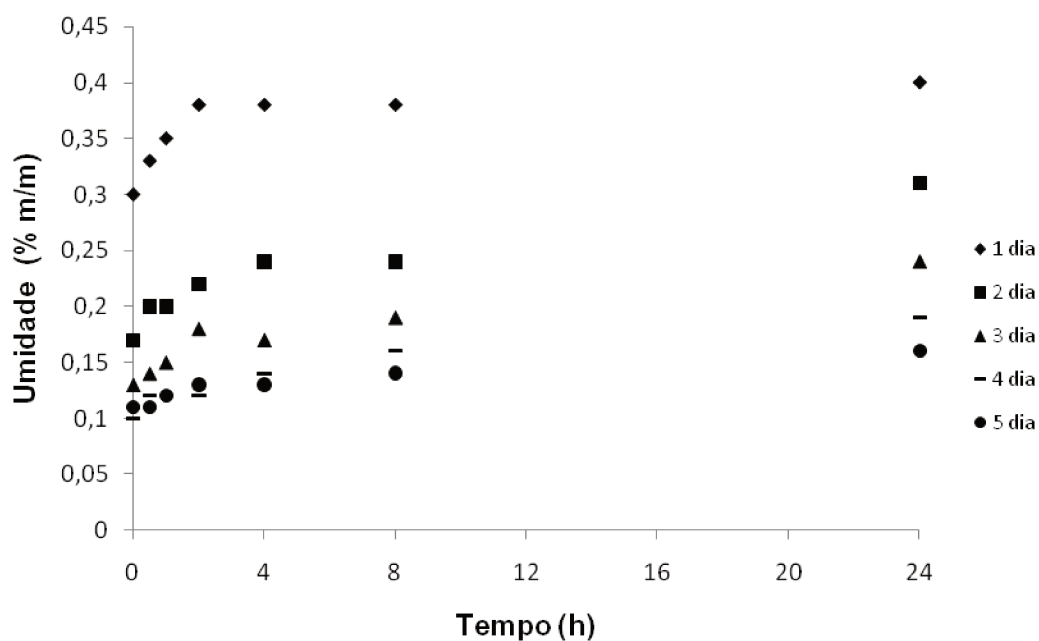


Figura 4.5: Umidade no sistema reacional no período de 5 dias

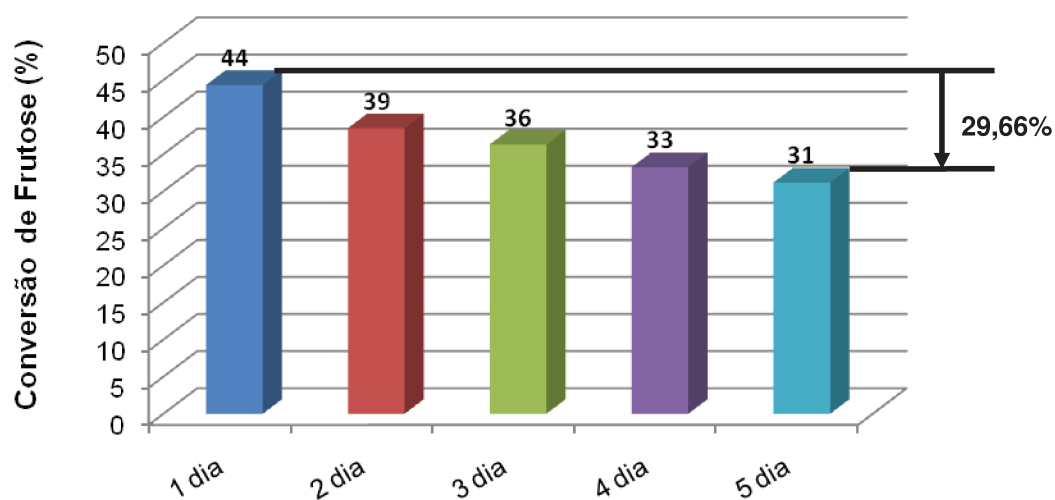


Figura 4.6: Conversão molar da frutose na esterificação no período de 5 dias

Pode-se verificar através das Figuras 4.4, 4.5 e 4.6, que do primeiro dia de reação até o quinto dia de reação houve uma diminuição na conversão de frutose

de 44% para 31%. Ou seja, nas condições utilizadas, o biocatalisador perde cerca de 30% de sua atividade inicial.

Esta desativação pode ser devido à perda de água no catalisador durante as reações, uma vez que alguns biocatalisadores perdem sua atividade durante processos de desidratação. Isso acontece devido à quantidade mínima de água requerida para hidratação da enzima. O nível de hidratação da enzima apresenta grande influência na flexibilidade da proteína e sendo assim, influencia também sua atividade catalítica.

Esses resultados permitiram confirmar que a água é um fator importante nos processos de esterificação e que é possível reutilizar o catalisador, sendo esta uma das vantagens dos processos biocatalíticos.

4.4 Planejamento de Experimentos

Através da ferramenta do planejamento de experimentos, procurou-se determinar os efeitos das variáveis: razão molar entre a frutose e o ácido acrílico (x_1) e a umidade inicial do sistema (x_2) na conversão de frutose, na conversão de ácido acrílico e na produção de mono, di e triéster. Para isso, um planejamento fatorial completo 2^2 com repetição foi utilizado para melhor compreensão da influência dessas variáveis e de suas interações na conversão de frutose, na conversão de ácido acrílico, na produção de mono, di e triésteres. Todos os experimentos foram efetuados com 1,4 g da lipase Novozym 435 e os níveis selecionados foram baseados na metodologia de Tsukamoto (2006) e em resultados prévios.

O progresso dessas reações em função do tempo está ilustrado desde a Figura 4.9 até a 4.16. A distribuição dos ésteres formados nos ensaios experimentais (após 24 horas de reação) é mostrada na Figura 4.17. A matriz de planejamento proposta, juntamente com os resultados obtidos para a conversão

de frutose, conversão de ácido acrílico e para a produção de seus ésteres, é mostrada na Tabela 4.5, cujo detalhamento encontra-se no Apêndice 8.4.

Tabela 4.5: Matriz de planejamento com o efeito da razão molar e da umidade inicial do sistema na conversão de frutose e produtividade de monoéster

Ensaio	Efeitos		Variáveis de Resposta				
	Razão Molar (F:AA)	Umidade Inicial do Sistema (%)	Conversão de Frutose (%)	Conversão de Ácido Acrílico (%)	Produção de Monoéster (%)	Produção de Diéster (%)	Produção de Triéster (%)
1	1:5	0,16	52,22	5,62	79,69	7,21	13,10
2	1:20	0,16	73,28	4,80	67,39	7,00	25,61
3	1:5	0,40	41,76	8,22	81,13	11,73	7,14
4	1:20	0,40	65,75	8,31	69,17	12,98	17,85
5	1:5	0,16	43,64	10,45	81,90	7,13	10,97
6	1:20	0,16	78,02	12,32	68,87	8,10	23,03
7	1:5	0,40	43,37	7,43	82,95	9,78	7,28
8	1:20	0,40	62,73	7,53	71,19	10,53	18,18

As Figuras 4.7 e 4.8 mostram cromatogramas de HPLC da reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico para o ensaio de número 1 no início da reação (tempo = 0h) e após de 24 horas de reação, respectivamente.

Não existindo padrões para os ésteres produzidos na reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico, para fazer a associação dos mesmos com os picos mostrados nos cromatogramas, considera-se que a reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico ocorre de forma seriada, ou seja, havendo primeiro a formação do monoéster, seguida da formação do diéster e finalmente a formação do triéster.

A Figura 4.8 mostra que a frutose foi eluída em 7.729 minutos, seguida do monoéster, diéster e triéster em, respectivamente, 8.292, 9.793 e 10.5654 minutos. O último a ser eluído foi o ácido acrílico em 13.346 minutos.

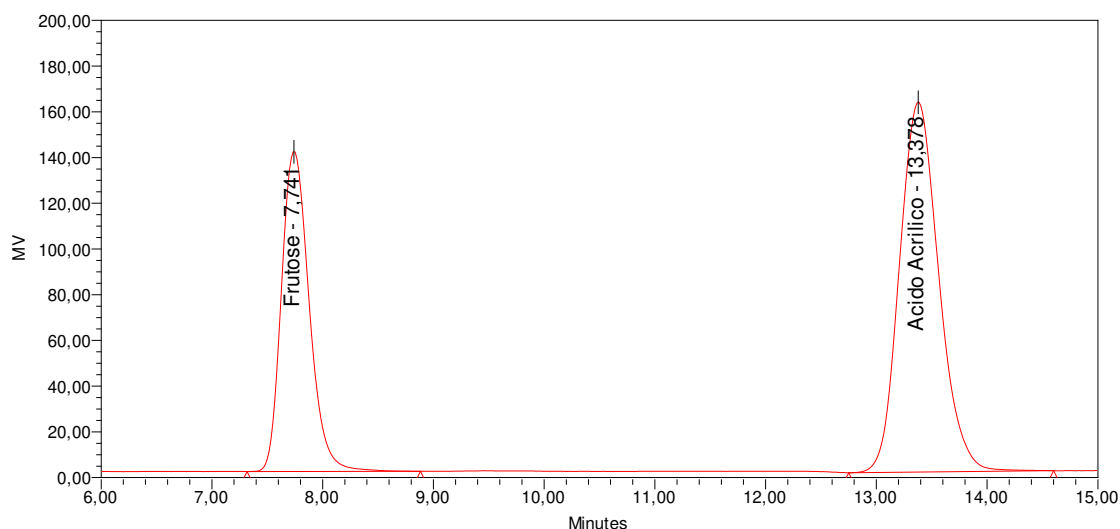


Figura 4.7: Cromatograma da reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico para o ensaio 1 no início da reação

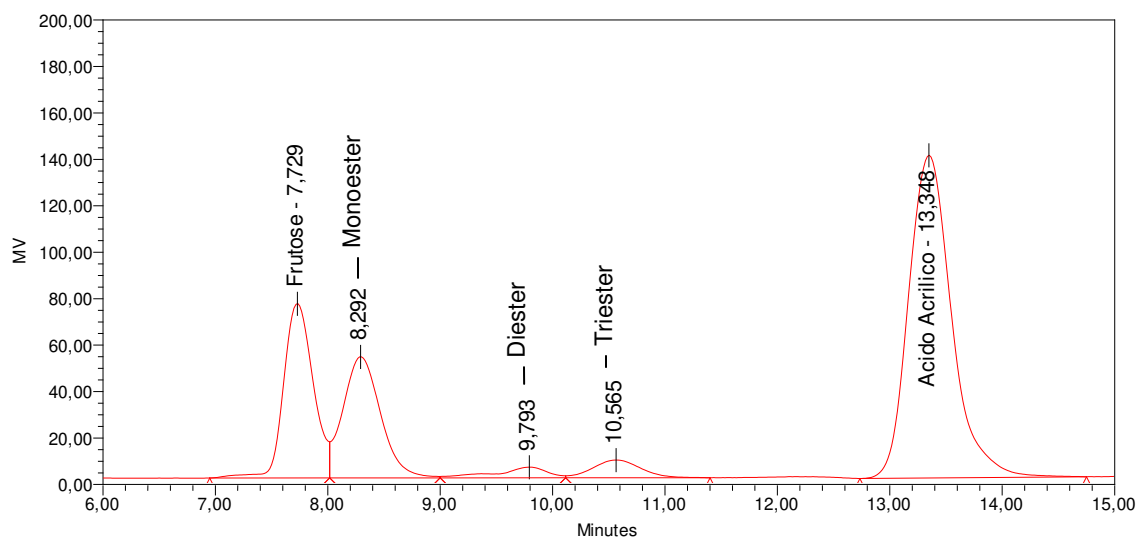


Figura 4.8: Cromatograma da reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico para o ensaio 1 após 24 horas de reação

As conversões de frutose variaram entre 40 a 80 %, a conversão de ácido acrílico entre 4 e 12%, a produção do monoéster entre 67 e 83 % a produção de diéster entre 7 e 13% e a produção de triéster variou entre 7 e 26%.

A Tabela 4.5 mostra que o melhor resultado na resposta conversão de frutose foi obtido na maior razão molar de substratos (1:20) e na menor umidade inicial (0,16%). Nestas condições, obteve-se cerca de 78% de conversão de frutose contra 66% de conversão de frutose quando usada a mesma razão molar de substratos (1:20) e uma umidade inicial diferente (0,40%). Essa menor conversão de frutose pode ser explicada pelo aumento de água no sistema reacional. Na verdade, a curva de adsorção de água da Novozym 435 (Figura 4.9) mostra que um pequeno aumento na quantidade de água pode, drasticamente, aumentar a atividade de água da enzima. Sendo assim, o equilíbrio termodinâmico favorece a reação de hidrólise ao invés da reação de esterificação.

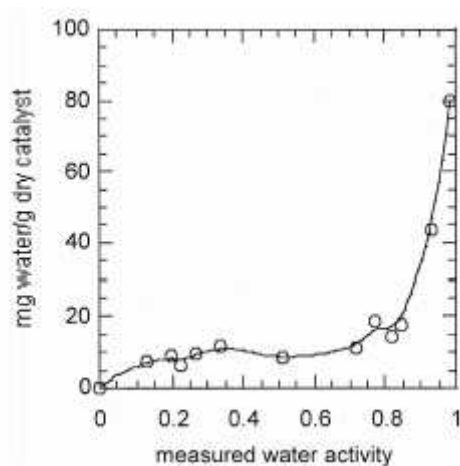


Figura 4.9: Curva de adsorção da Novozym 435 a 20°C (Chamouleau et al., 2001)

A produção de monoéster foi afetada somente pela razão molar de substratos. O menor nível de razão molar de substratos (1:5) resultou na maior produção de monoéster (83%), este comportamento poderia ser explicado pelo fato de que um excesso de substrato desloca o equilíbrio em favor da síntese dos ésteres ao invés da hidrólise.

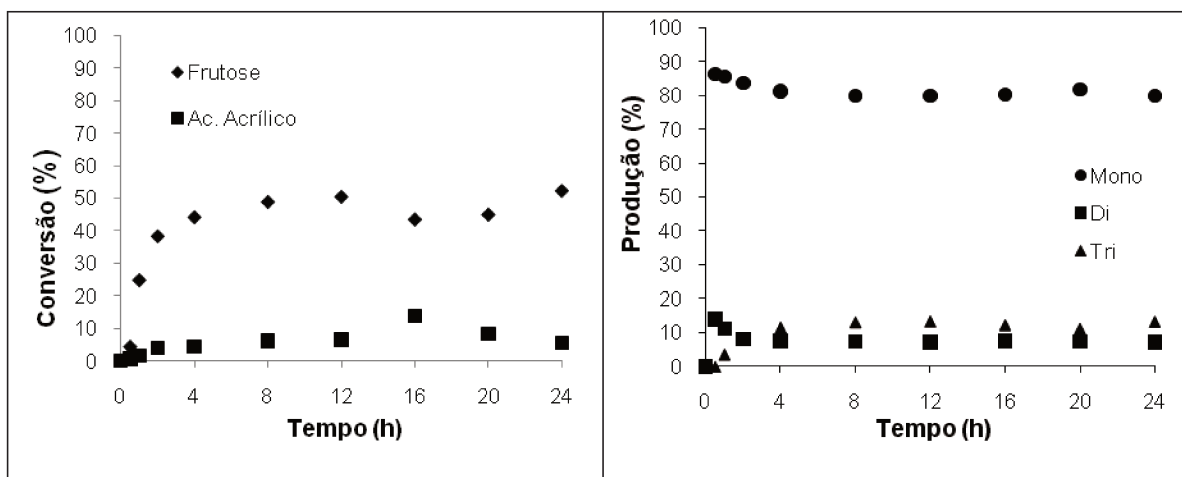


Figura 4.10: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 1

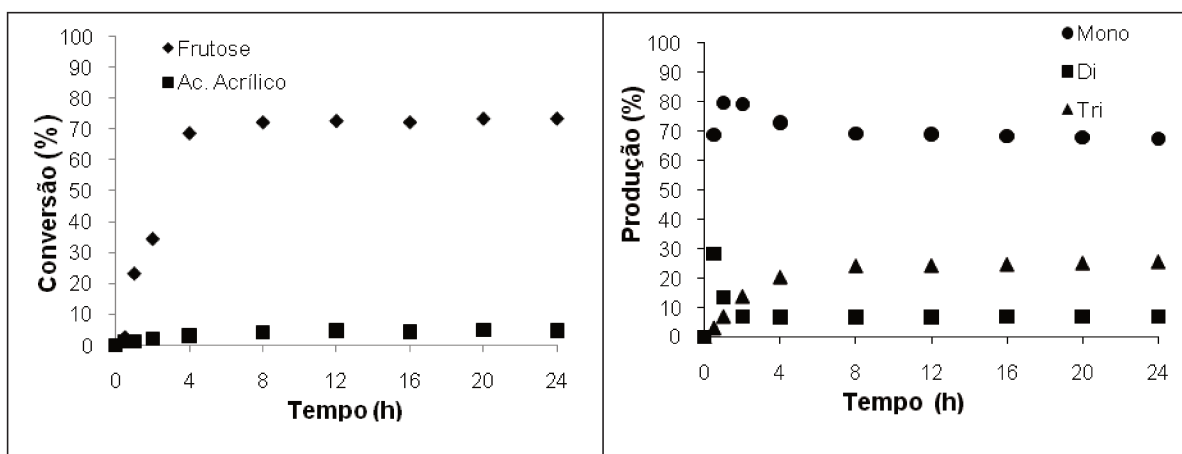


Figura 4.11: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 2

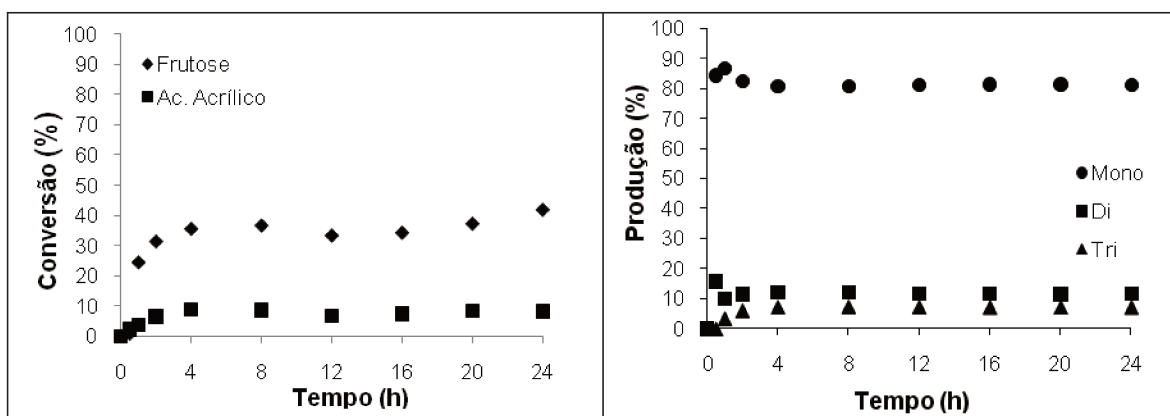


Figura 4.12: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 3

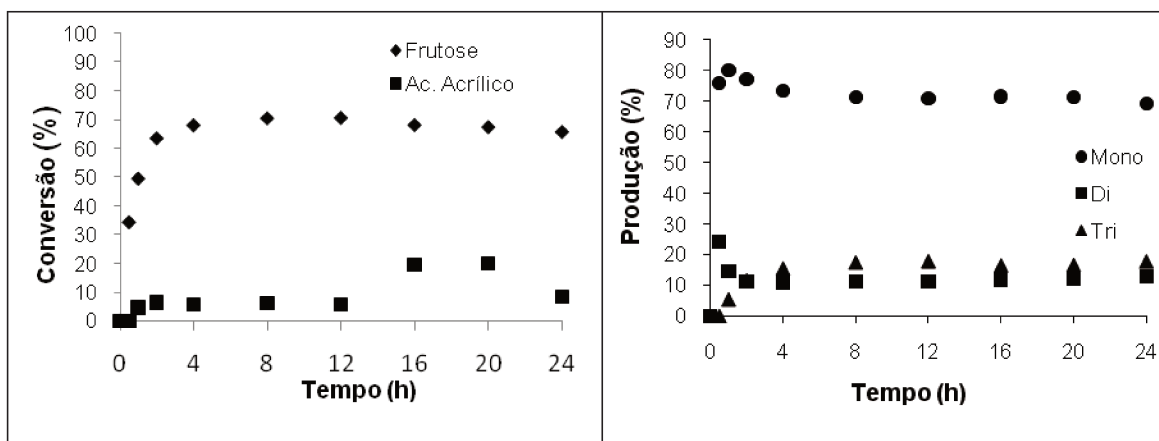


Figura 4.13: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 4

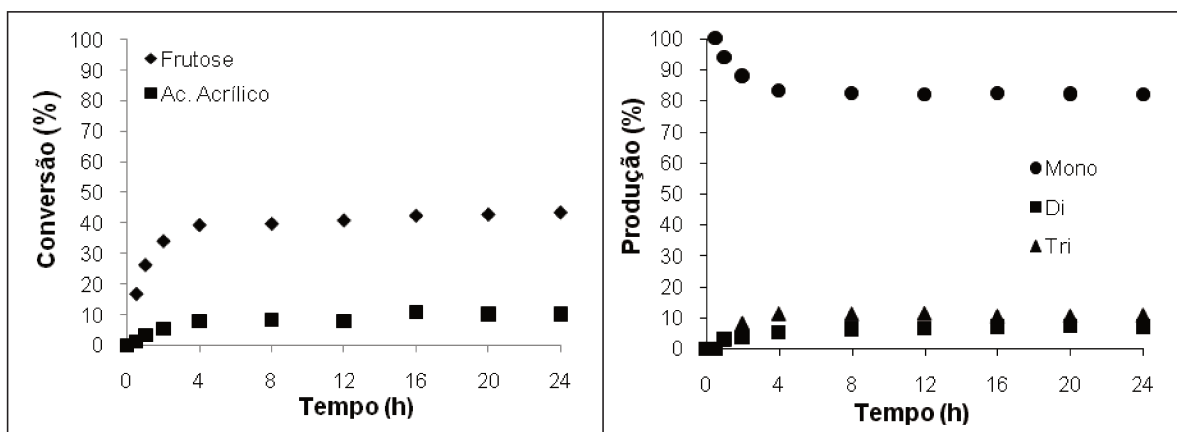


Figura 4.14: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 5

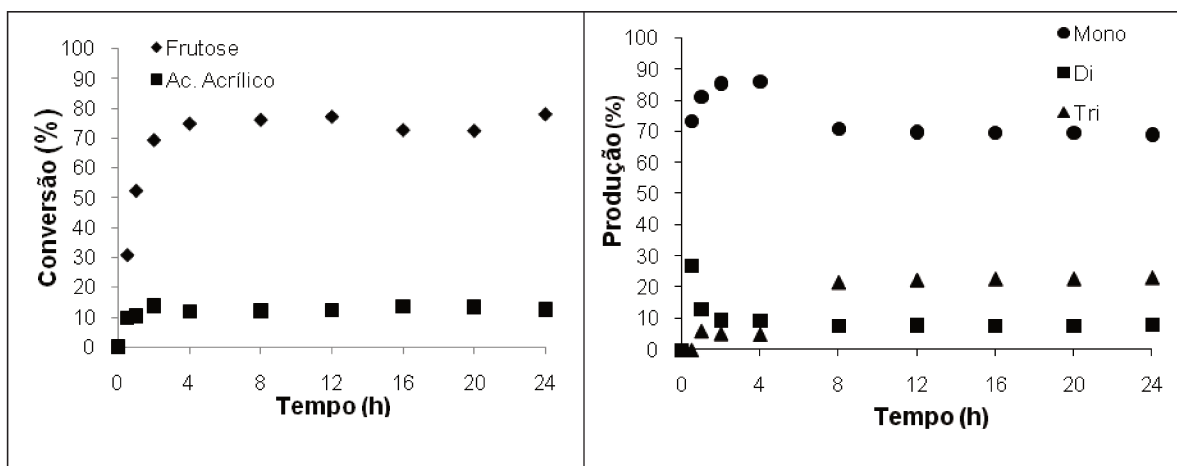


Figura 4.15: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 6

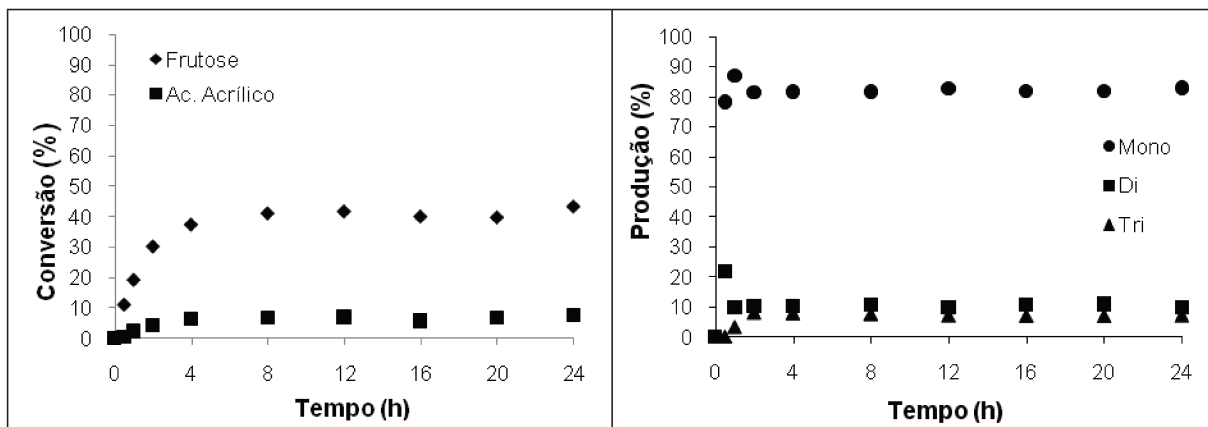


Figura 4.16: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 7

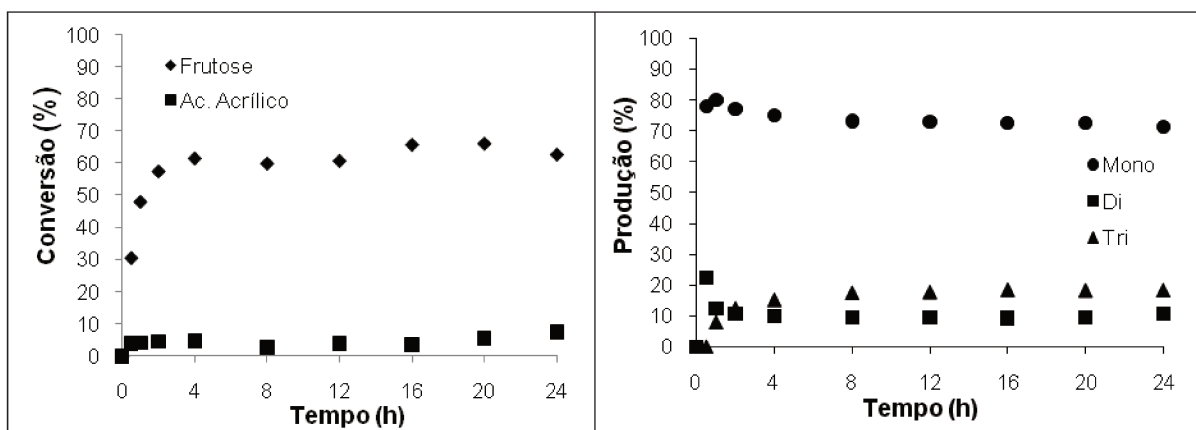


Figura 4.17: Perfil de conversão da frutose e de produção de seus ésteres na reação de esterificação do ensaio 8

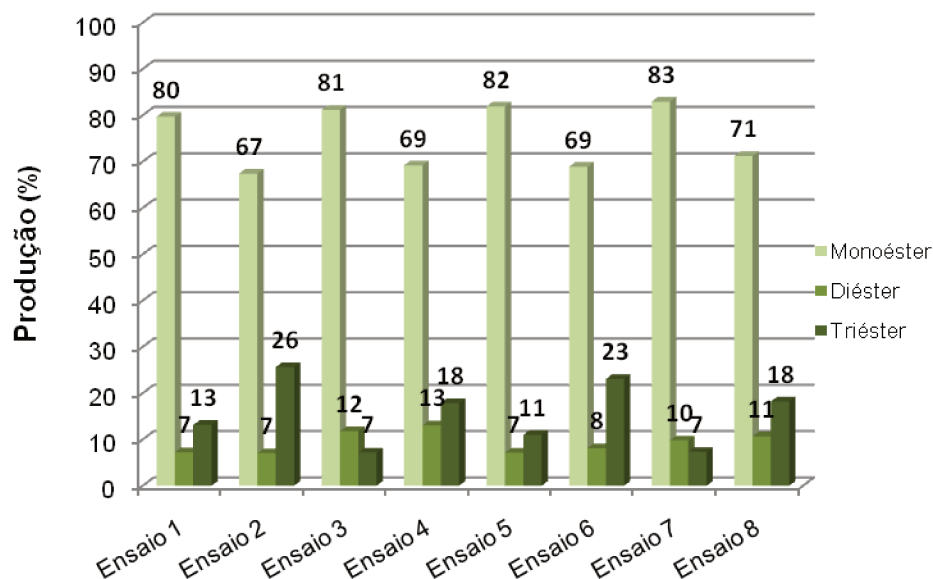


Figura 4.18: Distribuição dos produtos formados nas reações de esterificação da frutose com o ácido acrílico catalisada pela Novozym 435

Os resultados dos efeitos bem como de suas possíveis interações nas respostas estudadas estão expressos nas Tabelas 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10.

Tabela 4.6: Coeficientes do Modelo Estimados por Regressão Linear na resposta Conversão de Frutose

<i>Fator</i>	<i>Efeitos</i>	<i>Erro Padrão</i>	<i>Valores de t</i>	<i>p</i>	<i>Coeficientes</i>
Média	57,60	±1,30	44,38	0,000*	57,60
x₁	24,70	±2,60	9,52	0,001*	12,35
x₂	-8,39	±2,60	-3,23	0,032*	-4,19
x₁. x₂	-3,02	±2,60	-1,16	0,309	-1,51

*p<0,10; R² = 0,962

Tabela 4.7: Coeficientes do Modelo Estimados por Regressão Linear na resposta Conversão de Ácido Acrílico

Fator	Efeitos	Erro	Valores	p	Coeficientes
		Padrão	de t		
Média	57,60	±1,13	7,18	0,001*	8,09
x₁	24,70	±2,25	0,14	0,898	0,16
x₂	-8,39	±2,25	-0,19	0,859	-0,21
x₁· x₂	-3,02	±2,25	-0,10	0,929	-0,11

*p<0,10; R² = 0,016

Tabela 4.8: Coeficientes do Modelo Estimados por Regressão Linear na resposta Produção de Monoéster

Fator	Efeitos	Erro	Valores	p	Coeficientes
		Padrão	de t		
Média	75,29	±0,48	158,35	0,000*	75,29
x₁	-12,26	±0,95	-12,90	0,000*	-6,13
x₂	1,65	±0,95	1,73	0,158	0,82
x₁· x₂	0,40	±0,95	0,42	0,694	0,20

*p<0,10; R² = 0,977

Tabela 4.9: Coeficientes do Modelo Estimados por Regressão Linear na resposta Produção de Diéster

Fator	Efeitos	Erro	Valores	p	Coeficientes
		Padrão	de t		
Média	9,32	±0,41	22,97	0,000*	9,32
x₁	0,72	±0,81	0,88	0,428	0,37
x₂	3,92	±0,81	4,83	0,009*	1,96
x₁· x₂	0,34	±0,81	0,41	0,701	0,17

*p<0,10; R² = 0,859

Tabela 4.10: Coeficientes do Modelo Estimados por Regressão Linear na resposta Produção de Triéster

Fator	Efeitos	Erro	Valores	p	Coeficientes
		Padrão	de t		
Média	15,40	±0,42	36,60	0,000*	15,40
x₁	11,55	±0,84	13,72	0,000*	5,77
x₂	-5,57	±0,84	-6,62	0,003*	-2,78
x₁· x₂	-0,74	±0,84	-0,88	0,429	-0,37

*p<0,10; R² = 0,983

Os resultados mostram claramente que a conversão de frutose é influenciada pela razão molar dos reagentes e pela umidade inicial do sistema na faixa de estudo. A conversão de ácido acrílico independe dos efeitos estudados ma vez que o ácido acrílico foi usado em excesso. A produção de monoéster é influenciada apenas pela razão molar dos reagentes. A produção de diéster é influenciada pela umidade inicial do sistema e por fim a produção de triéster é influenciada tanto pela razão molar dos reagentes como pela umidade inicial do sistema.

Observa-se que, na faixa avaliada, a conversão de frutose é controlada pelos efeitos razão molar e umidade inicial do sistema, enquanto que a produção de monoéster é controlada somente pelo efeito razão molar F:AA ambos ao nível de 95% de confiança.

Da Tabela 4.7 concluir-se que a conversão do ácido acrílico independe da razão molar dos substratos e da umidade inicial do sistema na faixa de estudo, uma vez que este é utilizado em excesso no meio reacional.

Dessa forma, os modelos estatísticos para as variáveis de resposta conversão de frutose, produção de monoéster, produção de diéster e produção de triéster são apresentados pelas equações 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4, respectivamente:

$$\text{Convers\~ao de Frutose (\%)} = 57,60 + 12,35.x_1 - 4,19.x_2 \quad (4.1)$$

$$\text{Produ\~ao de Mono\~ester (\%)} = 75,29 - 6,13.x_1 \quad (4.2)$$

$$\text{Produ\~ao de Di\~ester (\%)} = 9,32 - 1,92.x_2 \quad (4.3)$$

$$\text{Produ\~ao de Tri\~ester (\%)} = 15,40 - 5,77.x_1 - 2,78.x_2 \quad (4.4)$$

onde: x_1 é a raz\~ao molar de substratos e x_2 é umidade inicial do sistema.

Para verificar se os fatores estudados produzem mudan\~cas sistemáticas nas respostas de interesse estudadas, foi realizada a análise de variância dos dados conforme Tabela 4.11.

Tabela 4.11: Análise da Variância para as respostas Conversão de Frutose, Produção de Mono, Di e Triésteres

Fonte de varia\~ao	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	F _{3,4(tabelado)}
Conversão de Frutose					
Regressão	1378,91	3	459,64	34,10 ^a	
Resíduo	53,90	4	13,48		9,12
Total	1432,81	7		R ² =0,962	
Produção de Monoéster					
Regressão	306,49	3	102,16	56,44 ^a	
Resíduo	7,23	4	1,81		9,12
Total	313,72	7		R ² =0,977	
Produção de Diéster					
Regressão	31,98	3	10,66	8,08 ^a	
Resíduo	5,27	4	1,32		9,12
Total	37,25	7		R ² =0,86	
Produção de Triéster					
Regressão	329,61	3	109,87	77,37 ^a	
Resíduo	5,66	4	1,42		9,12
Total	335,27	7		R ² =0,98	

^aSignificância estatística (α = 0,05)

A partir da distribuição F e dos coeficientes de correlação (R^2) que sugerem a existência de uma relação linear entre as variáveis (dependentes e independentes), pode-se verificar que para as respostas conversão de frutose, produção de mono e triéster o valor de F calculado foi superior ao valor de F tabelado, confirmando a validade do modelo proposto. Já para a produção de diéster, o valor de F calculado é menor que o valor de F tabelado, indicando que o modelo não é significativo e apresenta falta de ajuste.

4.5 Avaliação Cinética

O estudo da cinética de uma reação química sempre se volta para a obtenção da expressão / expressões de taxa de reação.

Como a taxa de reação é função da concentração de reagentes e produtos, então se fez necessário a determinação desses fatores para melhor compreensão da reação de síntese dos ésteres de frutose.

Para a reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico, a determinação da concentração dos substratos (concentração de frutose e concentração de ácido acrílico) foi obtida de maneira direta através dos fatores de resposta obtidos pelas curvas de calibração, ou seja, foi realizada a comparação direta das respostas obtidas com os picos das soluções padrão e das amostras (Equação 4.5).

$$C = F_r \times A \quad (4.5)$$

onde: F_r é o fator de resposta, C é a concentração e A é a área.

A determinação das concentrações dos produtos de reação (mono, di e triésteres) não pode ser diretamente avaliada uma vez que não existem padrões para estes ésteres, isto é, os fatores de resposta dos produtos não puderam ser determinados de maneira direta. Sendo assim, os fatores de resposta dos ésteres em questão foram calculados através do balanço de massa das reações seguintes:



onde: S é a frutose, A é o ácido acrílico, M é o monoéster, D o diéster, T o triéster, W a água, N_S o número de mols da frutose, N_A o número de mols do ácido acrílico, N_M o número de mols do monoéster, N_D o número de mols do diéster, N_T o número de mols do triéster e N_W o número de mols da água.

Considerando o sistema como sendo fechado e homogêneo, tem-se:

$$N_S = N_{S_0} - X_1 \quad (4.9)$$

$$N_A = N_{A_0} - X_1 - X_2 - X_3 \quad (4.10)$$

$$N_M = X_1 - X_2 \quad (4.11)$$

$$N_D = X_2 - X_3 \quad (4.12)$$

$$N_T = X_3 \quad (4.13)$$

$$N_W = N_{W_0} + X_1 + X_2 + X_3 \quad (4.14)$$

onde: X_1 é a conversão para a reação 4.6, X_2 é a conversão para a reação 4.7, X_3 é conversão para a equação 4.8 e N_{i0} é o número de moles inicial do componente i.

Como as reações foram realizadas a volume constante, as equações 4.9 a 4.14 podem ser escritas em termos de concentrações:

$$C_S = C_{S_0} - X_1 \quad (4.15)$$

$$C_A = C_{A_0} - X_1 - X_2 - X_3 \quad (4.16)$$

$$C_M = X_1 - X_2 \quad (4.17)$$

$$C_D = X_2 - X_3 \quad (4.18)$$

$$C_T = X_3 \quad (4.19)$$

$$C_W = C_{W_0} + X_1 + X_2 + X_3 \quad (4.20)$$

Somando-se 4.15, 4.17, 4.18 e 4.19:

$$C_S + C_M + C_D + C_T = C_{S_0} \quad (4.21)$$

$$C_M + C_D + C_T = C_{S_0} - C_S \quad (4.22)$$

Sabe-se que:

$$C_{S_0} - C_S = C_{S_0} \times X \quad (4.23)$$

onde: X é a conversão da frutose

Como:

$$C_M = F_{r_M} \times A_M \quad (4.24)$$

$$C_D = F_{r_D} \times A_D \quad (4.25)$$

$$C_T = F_{r_T} \times A_T \quad (4.26)$$

$$C_{S_0} = F_{r_S} \times A_{S_0} \quad (4.27)$$

Substituindo 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 e 4.27 em 4.22, obtém-se:

$$F_{r_M} \times A_M + F_{r_D} \times A_D + F_{r_T} \times A_T = F_{r_S} \times A_{S_0} \times X \quad (4.28)$$

Ou,

$$\left[\left(\frac{F_{r_M}}{F_{r_S}} \right) \times \left(\frac{A_M}{A_{S_0}} \right) \right] + \left[\left(\frac{F_{r_D}}{F_{r_S}} \right) \times \left(\frac{A_D}{A_{S_0}} \right) \right] + \left[\left(\frac{F_{r_T}}{F_{r_S}} \right) \times \left(\frac{A_T}{A_{S_0}} \right) \right] = X \quad (4.29)$$

Através da curva de calibração da frutose foi encontrado o valor do fator de resposta da frutose. Fazendo um ajuste linear múltiplo dos resultados do planejamento experimental obteve-se a seguinte equação com coeficiente de correlação de 87% ao nível de confiança de 95%:

$$\left[0,5137 \times \left(\frac{A_M}{A_{S_0}} \right) \right] + \left[5,4536 \times \left(\frac{A_D}{A_{S_0}} \right) \right] + \left[1,5911 \times \left(\frac{A_T}{A_{S_0}} \right) \right] = X \quad (4.30)$$

Logo,

$$\frac{F_{r_M}}{F_{r_S}} = 0,5137 \quad (4.31)$$

$$\frac{F_{r_D}}{F_{r_S}} = 5,4536 \quad (4.32)$$

$$\frac{F_{r_T}}{F_{r_S}} = 1,5911 \quad (4.33)$$

Ineditamente, foram obtidos os fatores de resposta desses ésteres através de resultados experimentais. Com isso, posteriormente, poderá ser realizada a modelagem cinética da reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico. Além do mais, futuramente, caso haja a existência desses ésteres puros, poder-se-á fazer a comparação dos valores dos fatores de resposta calculados experimentalmente com os valores dos fatores de resposta obtidos das curvas de calibração dos mesmos.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo estudar a reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico em meio orgânico para a produção de acrilatos de frutose (compostos biodegradáveis), empregando lipases e proteases como catalisadores. No conjunto dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Dentre os catalisadores empregados na reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico em terc-butanol, o único a catalisar esta reação foi a lipase Novozym 435.
2. Foi verificada a influência da razão molar entre a frutose (F) e o ácido acrílico (AA) na síntese de acrilatos de frutose catalisada pela Novozym 435, em termos da conversão de frutose. Quando se empregou a razão molar dos substratos em 1:3 (F:AA), a conversão final de frutose atingiu o valor de 26%, enquanto que na razão molar de 1:5, 1:15 e 1:20 a conversão molar de frutose atingiu valores de 44%, 68% e 73%, respectivamente. Sendo assim, conclui-se que a razão molar dos substratos é um parâmetro de grande importância no estudo das reações de síntese de acrilatos de frutose.
3. Com o propósito de verificar a possibilidade de reciclo da Novozym 435, foram realizadas cinco reações de esterificação da frutose com o ácido acrílico, onde a atividade do catalisador foi avaliada em termos de conversão de frutose. Pode-se verificar que do primeiro ao quinto dia de reação houve uma diminuição na conversão de frutose de 44 para 31%. Ou seja, nas condições utilizadas, a Novozym 435 perdeu cerca de 30% de sua atividade inicial indicando a viabilidade de reutilização desse catalisador.
4. Um planejamento fatorial completo 2^2 com repetição foi utilizado para melhor compreensão da influência dos parâmetros razão molar de substratos e umidade inicial do sistema bem como suas interações nas respostas conversão de frutose, conversão de ácido acrílico e produção de acrilatos de frutose. De acordo com análise estatística, ambos parâmetros

ou um único parâmetro estudados influenciaram a conversão de frutose, a produção de monoéster, a produção de diéster e a produção de triéster. Das cinco respostas avaliadas, foram obtidos modelos estatisticamente significativos para quatro dessas respostas.

5. Através do balanço de massa da reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico, foram obtidos os fatores de resposta do mono, di e triésteres. Com esses dados, posteriormente, poderá ser realizada a modelagem cinética da reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico. Além do mais, futuramente, caso haja a existência desses ésteres puros, poder-se-á fazer a comparação dos valores dos fatores de resposta calculados experimentalmente com os valores dos fatores de resposta obtidos das curvas de calibração dos mesmos.

A esterificação direta do ácido acrílico com a frutose em meio orgânico por meio da biocatálise não é descrita pela literatura até o presente momento. Por essa razão não foi possível a comparação dos dados obtidos nesse trabalho com a literatura.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES

- Otimizar a reação de esterificação da frutose com o ácido acrílico em terc-butanol catalisada pela Novozym 435.
- Desenvolver metodologia para a purificação da Novozym 435.
- Desenvolver metodologia de purificação dos acrilatos de frutose.
- Desenvolver metodologia de polimerização dos acrilatos de frutose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES-BARROS, M.R. Biocatálise em solventes orgânicos. *Boletim de Biotecnologia*, n.72, 2002.

ALBAR, Introducción a la Química Orgánica, 1999.
www.telecable.es/personales/albatros1/quimic/industrial/acroleina.htm.

ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; GUZZO, J.; BARATTI, J. *Biotechnology Letters*, v. 21, p. 313, 1999.

AKOH, C.C. Critical Review in Food Science Nutrition, v. 35, p. 405, 1995.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford Science Publications, 1998.

ARCOS, J. A.; BARNABE, M.; OTERO, C. Quantitative enzymatic production of 6-O-acylglucose esters. *Biotechnology Bioengineering*, v. 57, p. 505-509, 1998.

ARCOS, J. A.; HILL, G. C.; OTERO, C. Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 73, p. 104-110, 2001.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw Hill Co. Singapore, 1986.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001. 401 p.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. *Biochemical Engineering*. New York : M. Dekker, 702 p, 1997.

BORDUSA, F. Proteases in organic synthesis. *Chemical Reviews*, v. 102, p. 4817-4868, 2002.

BROCKINGTON, N. R.; DE ASSIS, A. G; MARTÍNEZ, M. L.; VEIL, J. M. A bioeconomic modeling project for small-scale milk production systems in South-East Brazil. 2. Refinement and use of the model to analyze some short and long term management strategies. *Agricultural Systems*, v. 20, p. 53-81, 1986.

CAO, L.; BORNSCHEUER, U.T.; SCHMID, R. D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 06, p. 279-285, 1999.

CARREA, G.; RIVA, S. Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angewandte Chemie-International Edition*, v.39, p. 2226-2254, 2000.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases, *Quimica Nova*, v. 18, p. 544-554, 1995.

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.

CHAN, A. W.Y.; GANEM, B. A regioselective, chemoenzymatic synthesis of sucrose-1'-methacrylate. *Biocatalysis*, v.8, p.163-169, 1993.

CHEN, X; JOHNSON, A; DORDICK, J. S; RETHWISCH, D. G. Chemoenzymatic synthesis of linear poly(sucrose acrylate); optimization of enzyme activity and polymerization conditions. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 195, p. 3567-3578, 1994.

CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; COMBS, D. Geranyl acetate synthesis by lipase catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. *Enzyme Microbial Technology*, v. 15, p. 691-698, 1993.

CLELAND, W. W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II. Inhibition – nomenclature and theory, *Biochim. Biophys. Acta*, v.67, p. 173-187, 1963.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v.27, p. 623-630, 2004.

DANNER H.; URMÖS M.; GARTNER M.; BRAUN R. Biotechnological Production of Acrylic Acid from Biomass, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70-72, 1998.

DEGN, P.; PEDERSEN, L.; 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. Enzymatic and chemoenzymatic approaches to polymer synthesis. *Trends in Biotechnology*, v. 10, p. 287-293, 1992

FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer-Verlag: Berlin, 453 p, 2000.

FERRER, M.; ANGELES CRUCES, M.; BARNABE, M.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F.J. Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two organic solvent mixtures. *Biotechnology Bioengineering*, v. 65, p. 10-16, 1999.

FEUGE, R.O.; ZERINGUE, J.; WEISS, T.J.; BROWN, M. *Journal of American Chemical Society*, v. 47, p. 56, 1970.

FLORES, M. V.; NARAGHI, K.; ENGASSER, J. M.; HALLING, P. J. Influence of glucose solubility and dissolution rate on the kinetics of lipase catalyzed synthesis of glucose laurate in 2-methyl-2-butanol. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 78, p. 815-821, 2002.

GANDHI, N. N. Application of lipases. *Journal of American Chemists Society*, v. 74, p. 621, 1997.

GBEKELOLUWA, B.O.; ERDAMANN, H.; SCHMID, R.D. Lipase catalyzed synthesis of sugar ester in organic solvents. *Biotechnology Letters*, v. 15, n. 2, p. 175-180, 1993.

GRAY, C. J. *Enzyme catalyzed reactions*, 1971.

HODGE, P. Syntheses and separation using functional polymers. *Chich-ester*, p. 43-122, 1998.

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.

- JANSSEN, A. E. M.; KLABBERS, C.; FRANSSEN, M. C. R.; VAN'T RIET, K. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters in 2-pyrrolidone. *Enzyme Microbial Technology*, v. 13, p. 565-571, 1991.
- KIRAN, K. R.; DIVAKAR, S. Lipase catalyzed synthesis of organic acid esters of lactic acid in non-aqueous media. *Journal of Biotechnology*, v. 87, p. 109-121, 2001.
- KITAGAWA, M.; RAKU, T.; SHIMAKAWA, H.; FAN, H.; TOKIWA, Y. Effect of water on the enzymatic synthesis of vinyl sugar ester in hydrophilic organic solvent. *Macromolecular Bioscience*, v. 2, p. 233-237, 2002.
- KLIBANOV, A. M. Enzymes that work in organic solvents. *Chemtechnology*, v. 16, p.354-589, 1986.
- KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature Insight*, v. 409, p. 241-246, 2001.
- KODELIA, G.; KOLISIS F. N. Studies on the reaction catalyzed by protease for the acylation of flavonoids in organic solvents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 672, p. 451–457, 1992.
- 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 surfatantes 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 hydrogels. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v. 37, p. 1665-1671, 1999.
- LOMBARDO, D.; GUY, O. Effect of alcohol on the hydrolysis catalyzed by human pancreatic carboxylic-ester hydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 657, p. 425-437, 1981.

LORTIE, R. Enzyme catalyzed esterification. *Biotechnology Advances*, v. 15, p. 1-15, 1997.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G.; AMUNDSON, C. H. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipase. *Enzyme Microbial Technology*, v. 14, p. 426-446, 1992.

MARGOLIN, A. L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme Microbial Technology*, v. 15, p. 266-280, 1993.

MARGOLIN, A. L.; CRENNÉ, J. Y.; KLIBANOV, A. M. Stereoselective oligomerizations catalyzed by lipases in organic solvents. *Tetrahedron Letters*, v. 28, p. 1607-1610, 1987.

MARTIN, B. D.; AMPOFO, S. A.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S. Biocatalytic synthesis of sugar-containing poly(acrylate)-based hydrogels. *Macromolecules*, v. 25, p. 7081-7085, 1992.

MARTIN, B. D.; S. A.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S. Highly swelling hydrogels from ordered galactose-based polyacrylates. *Biomaterials*, v. 19, p. 69-76, 1998.

MENSINK, R. P.; KATAN, M. B. Effect of dietary trans fatty acids on the high-density and low density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N. Eng. Journal of Medicine*, v. 323, p. 439-445, 1990.

MORRISON, R.; BOYD, R. *Química Orgânica*. Trad. de M. Alves da Silva. 7.ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian., 1981.

MUKHERJEE, K. D. Lipase catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. *Biocatalysis*, v. 3, p. 277-293, 1990.

NAOE, K.; OHSA, T.; KAWAGOE, M.; IMAI, M. Esterification by *Rhizopus delmar* lipase in organic solvent using sugar ester reverse micelles. *Biochemical England Journal*, v. 9, p. 67-72, 2001.

NORITOME, H.; NISHIDA, S.; KATO, S. Protease-catalyzed esterification of amino acid in water-miscible ionic liquid. *Biotechnology Letters*, v. 29, p. 1509-1512, 2007.

OOSTEROM, M. W.; RANDTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 328-333, 1996.

OTERO, C. P.; FERNANDEZ, V. M.; BALLESTEROS A. Influence of the support on the reaction course of tributyrin hydrolysis catalyzed by soluble and immobilized lipases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 23, p. 237-247, 1990.

PAIVA, A. L.; BALCAO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 187-204, 2000.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; THOMAZ-SOCCOL, V. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 29, p. 116, 1999.

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.

PARK, H.; CHANG, H.N. Enzymatic regioselective synthesis of sucrose acrylate esters. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 39-42, 2000.

PARK, O. J.; JEON, G. J.; YANG, J. W. Protease-catalyzed synthesis of disaccharide amino acid esters in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, p. 455-462, 1999.

PATIL, N.S.; DORDICK, J.S.; RETHWISCH, D.G. Macroporous poly(sucrose acrylate) hydrogel for controlled release of macromolecules. *Biomaterials*, v. 17, p. 2343-2350, 1996.

PEDERSEN, N. R. Enzyme catalyzed synthesis of carbohydrate esters in organic media. DenMark: Department of Life Sciences, Aalborg University, PhD. Thesis, 2002.

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-catalyzed esterification of disaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 337, p. 1179-1184, 2002.

RAMOS R. F; FRATTA R. A.; GRETTERS J. M. E.; PEREIRA W .E. Estudos para a implantação de uma fábrica de ácido acrílico e acrilatos: Avaliação técnica e Econômica, www.maua.br/imt/publicações/8.TG-Qu%Edmica.pdf. 2000.

RIVA, S.; SECUNDO, F. Selective enzymatic acylations and deacylations of carbohydrates and related compounds. *Chimicaoggi*, v. 8, p. 9-16, 1990.

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.

SCHLOTTERBECK, A.; LANG. S., WRAY, V.; WAGNER, F. Lipase-catalyzed monacylation of fructose. *Biotechnology Letters*,v. 15, n. 1, p. 61-64, 1993.

SEGEL, I. H. Enzyme Kinetics. New York: John Wiley & Sons, 1975.

SEGEL, I. H. Enzyme Kinetics – Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems, 2nd Edition, Wiley, New York, 1993.

SEMERIVA, M.; CHAPUS, C.; BOVIER-LAPIERRE, C.; DESNUELLE, P. On the transient formation of an acetyl enzyme intermediate during the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate by pancreatic lipase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 24, p. 808-813, 1974.

SILVERMAN, R. B. *Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*. San Diego : Academic, 717 p, 2000.

SOULTANI, S.; ENGASSER, JEAN-MARC; GHOU, M. Effect of acyl chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esteres. *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. Reaction engineering: optimizing the medium for enzymatic conversion. 2001.

SUGIURA, M.; ISOBE, M. Studies of the mechanism of lipase reaction. III Adsorption of *Chromobacterium* lipase on hydrophobic glass beads. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 24, p. 72-88, 1976.

TORRES, C.; OTERO, C. Part III, Direct enzymatic esterification of latic acid with fatty acids. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 29, p. 3-12, 2001.

TSAVAS, P.; POLYDOROU, S.; FAFLIA, I.; VOUTSAS, E. C.; TASSIOS, D. Solubility of glucose in mixtures containing 2-metyl-2-butanol, dimethyl sulfoxide, acids, esters, and water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 47, p.807-810, 2002.

TSUKAMOTO, JUNKO. Esterificação enzimática direta de carboidratos com ácido acrílico em meio orgânico. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, [s.n.], Tese (Doutorado), 2006.

UPPENBERG, J.; PATKAR, S.; BERGFORS, T. Crystallization and preliminary x-ray studies of lipase B from *Candida Antarctica*. *Journal Molecular Biology*, v. 235, p. 790, 1994.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J., HOSS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*, v. 9, p. 113, 2000.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, cap. 4., 2000.

WANG, C. S. Human milk bile salt-activated lipase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 256, p. 10198-10202, 1981.

WANG, Q.; DORDICK, J. S.; LINHARDT R. Synthesis and application of carbohydrate-containing polymers. *Chemistry of Materials*, v. 14, p. 3232-3244, 2002.

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.

YAMANE, T.; HOQ, M. M.; ITOH, S.; SHIMIZU, S. Glycerolysis of fats by lipase. *Journal of Japan Chemistry Society*, v. 35, p. 625-631, 1986.

YANG, Z.; RUSSEL, A. J. Fundamentals of non-aqueous enzymology. Koskinen, A. M. D. e Klivanov, A. M. (eds). *Enzymatic reactions in organic media*, 1^a ed., London, Blackie Academic & Professional, 1996.

ZACKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees. *Science*, v. 224, p. 1249-1251, 1984.

ZACKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 8017-8021, 1988.

8. APÊNDICE

8.1 Dados referentes ao estudo da influência do tipo de catalisador na reação de esterificação da frutose

a) Esterificação da frutose com ácido acrílico utilizando a lipase imobilizada Novozym 435

Tempo de Reação (h)	Frutose (g/L)	Frutose (M)	Conversão Molar (%)
0	16,91	0,0928	0,00
0,5	16,19	0,0889	4,24
1	12,72	0,0699	24,74
2	10,44	0,0573	38,25
4	9,45	0,0519	44,10
8	8,66	0,0475	48,81
12	8,39	0,0460	50,39
16	9,57	0,0525	43,40
20	9,31	0,0511	44,91
24	8,08	0,0443	52,22

b) Esterificação da frutose com ácido acrílico utilizando a lipase imobilizada Lipozyme RM IM

Tempo de Reação (h)	Frutose (g/L)	Frutose (M)	Conversão Molar (%)
0	16,70	0,092	0,00
0,5	16,68	0,092	0,12
1	16,65	0,091	0,30
2	16,67	0,092	0,18
4	16,64	0,091	0,36
8	16,58	0,091	0,72
12	16,67	0,092	0,18
16	16,61	0,091	0,54
20	16,59	0,091	0,66
24	16,67	0,092	0,18

- c) Esterificação da frutose com ácido acrílico utilizando a lipase imobilizada Lipozyme TL IM

Tempo de Reação (h)	Frutose (g/L)	Frutose (M)	Conversão Molar (%)
0	16,89	0,0927	0,00
0,5	16,81	0,0923	0,47
1	16,78	0,0921	0,65
2	16,87	0,0926	0,12
4	16,88	0,0927	0,06
8	16,80	0,0922	0,53
12	16,83	0,0924	0,36
16	16,77	0,0921	0,71
20	16,84	0,0924	0,30
24	16,80	0,0922	0,53

- d) Esterificação da frutose com ácido acrílico utilizando a protease Novozym 539 HPF

Tempo de Reação (h)	Frutose (g/L)	Frutose (M)	Conversão Molar (%)
0	17,52	0,0962	0,00
0,5	17,49	0,0960	0,17
1	17,46	0,0958	0,34
2	17,51	0,0961	0,06
4	17,48	0,0960	0,23
8	17,43	0,0957	0,51
12	17,50	0,0961	0,11
16	17,47	0,0959	0,29
20	17,51	0,0961	0,06
24	17,43	0,0957	0,51

e) Esterificação da frutose com ácido acrílico utilizando a protease Novozym 539 HPF

Tempo de Reação (h)	Frutose (g/L)	Frutose (M)	Conversão Molar (%)
0	17,52	0,0962	0,00
0,5	17,49	0,0960	0,17
1	17,46	0,0958	0,34
2	17,51	0,0961	0,06
4	17,48	0,0960	0,23
8	17,43	0,0957	0,51
12	17,50	0,0961	0,11
16	17,47	0,0959	0,29
20	17,51	0,0961	0,06
24	17,43	0,0957	0,51

f) Esterificação da frutose com ácido acrílico utilizando a protease Esperase HP F

Tempo de Reação (h)	Frutose (g/L)	Frutose (M)	Conversão Molar (%)
0	17,34	0,0952	0,00
0,5	17,29	0,0949	0,29
1	17,30	0,0950	0,23
2	17,25	0,0947	0,52
4	17,33	0,0951	0,06
8	17,22	0,0945	0,69
12	17,29	0,0949	0,29
16	17,31	0,0950	0,17
20	17,26	0,0948	0,46
24	17,33	0,0951	0,06

8.2 Dados referentes ao estudo da influência da razão molar dos substratos na reação de esterificação da frutose

Tempo de Reação (h)	1:3 (F:AA)	1:5 (F:AA)	1:15 (F:AA)	1:20 (F:AA)
	Conversão Molar (%)			
0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	2,00	13,14	12,80	2,52
1	6,80	21,09	27,13	23,12
2	18,71	32,80	48,59	34,36
4	21,66	41,92	61,76	68,56
8	24,17	45,73	65,24	72,09
12	22,66	44,09	62,65	72,52
16	22,67	46,26	63,31	72,12
20	24,95	45,05	63,44	73,25
24	25,90	44,46	68,42	73,28

8.3 Dados referentes ao estudo de reutilização enzimática

Tempo de Reação (h)	Conversão de Frutose (% m/m)				
	1 dia	2 dia	3 dia	4 dia	5 dia
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	8,72	8,50	5,63	4,51	4,10
1	20,35	14,32	9,26	7,24	6,83
2	30,60	22,20	15,24	11,70	8,91
4	34,74	27,73	20,32	16,64	11,99
8	38,38	33,56	25,99	22,45	21,34
24	44,33	38,51	36,32	33,24	31,18

Tempo de Reação (h)	Quantidade de Água (% m/m)				
	1 dia	2 dia	3 dia	4 dia	5 dia
0	0,30	0,17	0,13	0,10	0,11
0,5	0,33	0,20	0,14	0,12	0,11
1	0,35	0,20	0,15	0,12	0,12
2	0,38	0,22	0,18	0,12	0,13
4	0,38	0,24	0,17	0,14	0,13
8	0,38	0,24	0,19	0,16	0,14
24	0,40	0,31	0,24	0,19	0,16

8.4 Dados referentes ao planejamento experimental

a) Ensaio 1

Tempo de Reação (h)	Conversão de Frutose (% m/m)	Produção de Monoéster (% m/m)	Produção de Diéster (% m/m)	Produção de Triéster (%m/m)	Umidade no Sistema (% m/m)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16
0,5	4,24	86,11	13,89	0,00	0,38
1	24,74	85,41	11,01	3,58	0,32
2	38,25	83,57	8,10	8,33	0,39
4	44,10	81,10	7,49	11,41	0,49
8	48,81	79,79	7,25	12,96	0,40
12	50,39	79,69	7,11	13,20	0,45
16	43,40	80,24	7,61	12,15	0,62
20	44,91	81,65	7,27	11,08	0,44
24	52,22	79,69	7,21	13,10	0,53

b) Ensaio 2

Tempo de Reação (h)	Conversão de Frutose (% m/m)	Produção de Monoéster (% m/m)	Produção de Diéster (% m/m)	Produção de Triéster (% m/m)	Umidade no Sistema (% m/m)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18
0,5	2,52	68,72	28,22	3,06	0,36
1	23,12	79,55	13,47	6,98	0,42
2	34,36	79,26	6,94	13,80	0,35
4	68,56	72,83	6,77	20,40	0,48
8	72,09	69,06	6,69	24,25	0,54
12	72,52	68,98	6,71	24,31	0,65
16	72,12	68,43	6,83	24,74	0,45
20	73,25	67,84	6,96	25,20	0,41
24	73,28	67,39	7,00	25,61	0,49

c) Ensaio 3

Tempo de Reação (h)	Conversão de Frutose (% m/m)	Produção de Monoéster (% m/m)	Produção de Diéster (% m/m)	Produção de Triéster (% m/m)	Umidade no Sistema (% m/m)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,42
0,5	0,80	84,16	15,84	0,00	0,62
1	24,41	86,48	10,08	3,44	0,58
2	31,31	82,44	11,53	6,04	0,52
4	35,47	80,58	12,23	7,20	0,64
8	36,58	80,53	12,14	7,33	0,69
12	33,25	81,13	11,62	7,25	0,59
16	34,19	81,26	11,62	7,12	0,71
20	37,18	81,33	11,47	7,20	0,68
24	41,76	81,13	11,73	7,14	0,70

d) Ensaio 4

Tempo de Reação (h)	Conversão de Frutose (% m/m)	Produção de Monoéster (% m/m)	Produção de Diéster (% m/m)	Produção de Triéster (% m/m)	Umidade no Sistema (% m/m)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39
0,5	34,34	75,72	24,28	0,00	0,54
1	49,52	79,85	14,73	5,42	0,49
2	63,54	77,00	11,37	11,62	0,61
4	68,07	73,31	11,16	15,54	0,68
8	70,50	71,19	11,29	17,51	0,71
12	70,65	70,71	11,41	17,89	0,69
16	68,16	71,47	11,97	16,56	0,73
20	67,45	71,29	12,02	16,69	0,70
24	65,75	69,17	12,98	17,85	0,74

e) Ensaio 5

Tempo de Reação (h)	Conversão de Frutose (% m/m)	Produção de Monoéster (% m/m)	Produção de Diéster (% m/m)	Produção de Triéster (% m/m)	Umidade no Sistema (% m/m)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17
0,5	16,87	100,00	0,00	0,00	0,34
1	26,37	93,80	3,16	3,04	0,29
2	34,24	88,01	3,62	8,37	0,42
4	39,52	83,25	5,32	11,43	0,39
8	39,94	82,46	6,16	11,38	0,45
12	41,06	82,06	6,43	11,51	0,59
16	42,59	82,25	7,12	10,63	0,43
20	43,00	82,09	7,17	10,75	0,50
24	43,64	81,90	7,13	10,97	0,49

f) Ensaio 6

Tempo de Reação (h)	Conversão de Frutose (% m/m)	Produção de Monoéster (% m/m)	Produção de Diéster (% m/m)	Produção de Triéster (% m/m)	Umidade no Sistema (% m/m)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16
0,5	30,84	73,17	26,83	0,00	0,32
1	52,38	81,00	12,93	6,08	0,41
2	69,37	85,35	9,48	5,17	0,47
4	74,91	85,82	9,24	4,94	0,53
8	76,16	70,73	7,73	21,54	0,42
12	77,23	69,81	7,89	22,30	0,60
16	72,75	69,59	7,73	22,67	0,48
20	72,50	69,49	7,79	22,72	0,57
24	78,02	68,87	8,10	23,03	0,62

g) Ensaio 7

Tempo de Reação (h)	Conversão de Frutose (% m/m)	Produção de Monoéster (% m/m)	Produção de Diéster (% m/m)	Produção de Triéster (% m/m)	Umidade no Sistema (% m/m)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,41
0,5	10,97	78,19	21,81	0,00	0,68
1	19,17	86,89	9,79	3,33	0,63
2	30,19	81,38	10,31	8,31	0,71
4	37,40	81,69	10,22	8,09	0,59
8	41,12	81,61	10,59	7,80	0,67
12	41,75	82,73	9,97	7,29	0,73
16	40,07	81,98	10,83	7,20	0,75
20	39,78	81,91	10,93	7,16	0,68
24	43,37	82,95	9,78	7,28	0,71

h) Ensaio 8

Tempo de Reação (h)	Conversão de Frutose (% m/m)	Produção de Monoéster (% m/m)	Produção de Diéster (% m/m)	Produção de Triéster (% m/m)	Umidade no Sistema (% m/m)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39
0,5	30,62	77,76	22,24	0,00	0,57
1	48,05	79,81	12,32	7,87	0,50
2	57,49	77,03	10,59	12,37	0,61
4	61,54	75,01	9,90	15,08	0,66
8	59,94	73,12	9,52	17,35	0,72
12	60,75	72,90	9,52	17,58	0,69
16	65,77	72,48	9,19	18,33	0,76
20	66,12	72,36	9,52	18,12	0,73
24	62,73	71,19	10,63	18,18	0,74