UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

PRODUÇÃO DE PALMITATO DE FRUTOSE CATALISADA POR LIPASES IMOBILIZADAS

FELIPE KORBUS SUTILI

RIO DE JANEIRO
Outubro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Produção de Palmitato de Frutose Catalisada por Lipases Imobilizadas

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (DSc.).

Felipe Korbus Sutili

Orientador (es): Selma Gomes Ferreira Leite
Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza
Leandro Soter de Mariz e Miranda

RIO DE JANEIRO – RJ – BRASIL
Outubro de 2013

Sutili, Felipe Korbus

Produção de Palmitato de Frutose Catalisada por Lipases Imobilizadas/ Felipe Korbus Sutili. – 2013
XXI, 174 f.: il.

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2013.

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite, Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza e Leandro Soter de Mariz e Miranda

1.Síntese enzimática de éster de frutose protegido. 2. Reações em sistema em batelada e em fluxo contínuo. 3. Reações em meio microemulsionado. – Teses. I. Leite, Selma Gomes Ferreira. (Orient.). II. Souza, Rodrigo Octavio Mendonça Alves de. (Orient.). III. Miranda, Leandro Soter de Mariz e. (Orient.). IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos, Escola de Química. V. Título.

PRODUÇÃO DE PALMITATO DE FRUTOSE CATALISADA POR LIPASES IMOBILIZADAS

Felipe Korbus Sutili

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS.

Examinada por:

Prof. Selma Gomes Ferreira Leite, D. Sc.

Prof. Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza, D. Sc.

Prof. Leandro Soter de Mariz e Miranda, D. Sc.

Prof. Débora de Oliveira, D. Sc.

Prof. Sorele Batista Fiaux, D. Sc.

Prof. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D. Sc.

Prof. Maria Helena Miguez Rocha Leão, D. Sc.

Prof. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D. Sc.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais (*in memoriam*), Cleusa e Darci, e a minha noiva Bruna que cada um em seu momento me deu força para seguir adiante. A vocês meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças para superar os obstáculos impostos pela vida.

Ao meu pai e minha mãe (*in memorian*) por serem os meus exemplos de inteligência, integridade e que mesmo não estando mais presentes sei que torceram muito por mim.

Aos meus tios José, Odete, Claudir, Ari e Salete que me auxiliaram nos momentos difíceis cada um do seu jeito, seja pelo auxílio em questões práticas ou através de palavras confortadoras e de incentivo.

Ao Octavio A. C. Antunes (*in memorian*) por apostar em mim me trazendo do sul sem nem mesmo me conhecer e me incentivar a trabalhar com planejamento de experimentos.

Aos meus orientadores Selma Leite, Rodrigo Souza e Leandro Soter agradeço a orientação, a compreensão e o apoio nos momentos difíceis. Em especial ao Rodrigo por me orientar não só no desenvolvimento dos trabalhos, mas também por me dar conselhos de vida.

A família, BOSS GROUP por ouvir as minhas piadas, histórias e anedotas que por muitas vezes não eram tão engraçadas, mas que apesar disso me acolheram de coração e fizeram não me sentir tão sozinho. Karenzita (tchêê), Indigri (Alemão!? Sei sei..rs..), Flávitia (guria de ou do Duque rs...), Luciana (gaúcha que faz chimarrão que é uma beleza rs...), Raquelzinha (sou ingênuo), Raquel (pós-doc, já virou pronome de tratamento, obrigado pelos RMNs), Maicon (mesmo estando na família a pouco tempo já é parceiro tricolor, de outras cores também vale rs...), Jack Daniel (valeu pelo apoio na labuta), Amanda (uma das representantes de Minas), Alexandra (nunca vi essa guria desanimada), todos vocês têm vaga cativa no meu coração, aos ICs (Yasmin, João 01, João 02, Felipe 02, Ana Clara, Marcela, Mariana, Guilherme, Silésia, Ana), valeu galerinha. Ao Ivaldo (o verdadeiro chefe de algumas faxineiras rs...), "bródi" valeu mesmo tanto pela parceria científica quanto pela amizade e conselhos. Ahh e também não poderia deixar de agradecer ao pessoal que já passou pela família, mas que de qualquer maneira deixou sua marca (Halliny, Zé, Gizelda, Paulo e Jonathan).

A Andrea Zanetti, da UEM, pela ajuda nos MEVs das amostras de enzimas e ao Marcos pelas análises de eletroforese. Também a Leonice, do Lab 628 do IQ/UFRJ, pelos espectros de IV e ao Ricardo do lab 622 pelos ensinamentos no CG-EM.

A banca examinadora por aceitar avaliar este trabalho.

A Capes pelo apoio financeiro.

E por fim, e não menos importante, é claro, a minha namorada, agora com o título de noiva, Bruna Scariot, que encarou o desafio comigo e mesmo distante foi presença constante desde o início da caminhada até aqui me incentivando e me confortando nos momentos difíceis. Sem o teu apoio nada disso seria possível.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.” George Bernard Shaw

Resumo da tese apresentada à EQ/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

PRODUÇÃO DE PALMITATO DE FRUTOSE CATALISADA POR LIPASES IMOBILIZADAS

Felipe Korbus Sutili

Outubro/2013

Orientador: Selma Gomes Ferreira Leite
Co-Orientadores: Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza
Leandro Soter de Mariz e Miranda

Programa: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Neste trabalho foi investigada a produção do palmitato de frutose protegida catalisada por lipases, tendo-se como substratos o 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (DAF) e o ácido palmítico (AP). A síntese foi realizada em sistema em batelada e em fluxo contínuo catalisada por biocatalisadores imobilizados comerciais em suporte sólido e pela lipase Cal B estruturada em micela reversa imobilizada em organogel. As reações em sistema em batelada foram otimizadas através de planejamentos experimentais. Conversões de 90% de palmitato de DAF foram obtidos pela enzima Lipozyme RM IM a 60°C, razão molar 1:1 entre substratos, 250 mg de enzima, em 24h de reação em sistema em batelada. Em condições de fluxo contínuo, valores semelhantes foram encontrados em 48 min. Um resíduo de ácidos graxos oriundo da indústria de refino de óleo de palma foi utilizado como matéria-prima para a produção de palmitato de DAF em sistema de fluxo contínuo com a enzima RM IM, obtendo-se 90% de conversão em concentração de até 500 mM de substrato, agregando-se valor ao produto final. A síntese do palmitato de DAF catalisada pela enzima Cal B estruturada em micela reversa imobilizada em gel de HPMC gerou resultados de até 90% de conversão em concentrações de substrato de 5 mM com até 0,6 mg de lipase nos dois sistemas reacionais avaliados.

Palavras-chave: lipases, palmitato de frutose protegida, batelada, fluxo contínuo, micela reversa, organogel.

Abstract of thesis presented to EQ/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

PRODUCTION OF FRUCTOSE PALMITATE CATALYZED BY IMMOBILIZED LIPASES

Felipe Korbus Sutili

October/2013

Advisor: Selma Gomes Ferreira Leite
Co-advisors: Rodrigo Octavio Mendonça Alves de Souza
Leandro Soter de Mariz e Miranda

Department: Technology of Chemistry and Biochemistry Process

In this study, we investigated the production of protected palmitate fructose catalyzed by immobilized lipases having the substrate as 2,3:4,5 -O- diisopropileideno - β -D-fructopyranose (DAF) and palmitic acid (PA). The synthesis was performed in batch system and continuous flow catalyzed by commercial biocatalysts immobilized on solid support and the lipase B Cal structured in reverse micelle immobilized organogel. Batch reactions were optimized using experimental designs whereas 90% of DAF palmitate conversion was obtained by RM IM at 60°C, under molar ratio 1:1 of substrates, 250mg of biocatalyst and 24 hours of reaction time. Under continuous flow conditions , similar values were found in 48 min . A fatty acid residue from palm oil refining industry was applied as raw material for the production of DAF palmitate under continuous flow system with enzyme RM IM, where 90% of conversion was achieved at concentrations up to 500 mM substrate , adding value to the final product. The Synthesis of DAF palmitate catalyzed by cal B lipase in reverse micelles and nanostructured in organogels of HPMC were able to generate results in 90% conversion of substrate concentrations of 5 mM with 0.6 mg of lipase in the two reaction systems evaluated.

Keywords: lipases, palmitate protected fructose, batch, continuous flow, reverse micelle, organogel.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **XIV**

ÍNDICE DE TABELAS ..... **XVII**

LISTA de SIGLAS e ABREVIATURAS ..... **XX**

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO **22**

1.1. Introdução **22**
1.2. Objetivo geral **24**
1.3. Objetivos específicos **24**

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **26**

2.1. Química sustentável **26**
2.2. Lipases **28**
2.2.1. Características gerais 28
2.2.2. Estrutura e mudança conformacional 30
2.2.3. Mecanismo reacional 32
2.2.4. Biocatálise em meios orgânicos 35
2.2.5. Solubilidade da frutose em solventes orgânicos 36
2.2.6. Acetalização 39
2.3. Propriedade e aplicações éster de açúcar – Palmitato de frutose 40
2.4. Métodos de produção éster de açúcar – Palmitato de frutose 43
2.4.1. Via química 43
2.4.2. Via enzimática 45
2.5. Sistemas Microemulsionados 48
2.5.1. Lipases em Micelas Reversas 49
2.5.1.1. Aspectos gerais *49*
2.5.1.2. Solubilização de proteínas em micelas reversas *55*
2.5.1.3. Encapsulamento da enzima *56*
2.5.2. Imobilização da micela em organogel 57
2.6. Reatores enzimáticos **58**
2.6.1. Reatores descontínuos 59
2.6.2. Reatores contínuos 60

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS **63**

3.1. Materiais **63**
3.1.1. Enzimas 63
3.2. Métodos **64**
3.2.1. Síntese de 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (diacetonídeo da frutose - DAF) 64
3.2.2. Teste de solubilidade do DAF e da frutose em solventes orgânicos 64
3.2.3. Reutilização da enzima 65
3.2.4. Aumento de Escala e Estudo da Influência de um Reator de Tanque agitado na esterificação do DAF 65
3.2.5. Dessorção da enzima Rhizomucor miehei de seu suporte 65
3.3. Métodos analíticos **66**

3.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD) 66
3.3.2. Lowry–Tinsley 66
3.3.3. Análise de Infravermelho de Transmissão 67
3.3.4. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear 68
3.3.5. Cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) 68
3.3.6. Análise do Suporte da Enzima por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 69
3.3.7. Medidas dos tamanhos de partícula das micelas reversas 69
3.3.8. Análise estatística dos dados 69
3.4. Reação em batelada 69
3.4.1. Enzima comercial imobilizada 69
3.4.1.1. Seleção de lipases comerciais – esterificação do DAF e AP 69
3.4.1.2. Determinação do tempo reacional 70
3.4.1.3. Planejamento fatorial para otimização das variáveis independentes da reação catalisada pelas enzimas imobilizadas em suporte sólido 71
3.4.2. Enzima em micela reversa imobilizada em organogel 72
3.4.2.1. Preparação das micelas reversas 72
3.4.2.2. Imobilização das micelas reversas em organogel 72
3.4.2.3. Procedimento de reação em batelada da enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel 73
3.4.2.4. Planejamento fatorial para otimização das variáveis independentes da reação catalisada pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel 73
3.5. Reação em reator de fluxo contínuo 75
3.5.1. Catalisada por enzima imobilizada em suporte sólido 76
3.5.2. Catalisada pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel 76
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 77
4.1. Síntese de 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (diacetonídeo da frutose - DAF) 77
4.1.1. Teste de solubilidade do DAF e da frutose em diversos solventes 78
4.2. Reação em batelada 80
4.2.1. Enzimas imobilizadas comerciais 80
4.2.1.1. Seleção de lipases comerciais 80
4.2.1.2. Confirmação do éster sintetizado 82
4.2.1.3. Determinação do tempo reacional 83
4.2.1.4. Delineamento fatorial fracionário (DFF) e delineamento composto central rotacional (DCCR) 85
4.2.1.5. Validação modelo matemático 92
4.2.1.6. Capacidade de reuso das enzimas avaliadas 97
4.2.1.7. Comparação das conversões obtidas pelo método Lowry-Tinsley e a massa de éster 100
4.2.1.8. Aumento de Escala e Estudo da Influência de um Reator de Tanque agitado 100
4.2.1.9. Dessorção da Lipase de Rizhomucor miehei de seu suporte 102
4.2.2. Reação catalisada pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel 105
4.2.2.1 Teste formação da micela reversa (microemulsão) 105
4.2.2.2. Imobilização da microemulsão da Cal B em organogel 107
4.2.2.3. Avaliação inicial dos parâmetros reacionais usando Delineamento Fatorial Fracionário (DFF) da esterificação catalisada pela enzima Cal B em MBGs 108
4.2.2.4. Delineamento composto central rotacional (DCCR) 112

4.2.2.5. Validação dos modelos matemáticos e condições ótimas de reação.....*116*
4.2.2.6. Capacidade de reuso da lipase Cal B em sistema microemulsionado imobilizado em organogel.....*120*
4.3. Reações em condição de fluxo contínuo.....**121**
4.3.1. Catalisada por enzimas imobilizadas em suporte sólido.....121
4.3.1.1. Esterificação com outros ácidos graxos.....*124*
4.3.1.1.1. Esterificação do DAF com resíduo de ácido graxo (RAG) em concentração superior de substrato.....*125*
4.3.2 Catalisada pela enzima Cal B imobilizada em organogel.....129
4.4. Eficiência dos sistemas estudados **130**
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES.....**133**
CAPÍTULO 6 - PERSPECTIVAS FUTURAS.....**134**
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....**135**
APÊNDICE A - Espectros de RMN **152**
APÊNDICE B - PUBLICAÇÕES **161**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1: Processo de refino do óleo de palma. 27

Figura 2. 2: Estrutura cristalina geral de lipase representada usando a Humicola lanuginosa. A folha-β está representada em azul, rodeada por algumas hélices em amarelo, o sitio ativo (residuo de serina) e a tampa em vermelho. (SVENDSEN, 2000).....32

Figura 2. 3: Mecanismo Ping-Pong Bi Bi de lipase catalisando reações envolvendo dois substratos e dois produtos. A e B: substratos; P e Q: produtos; E, F: enzima livre; FP, EQ: formas da enzima capazes de sofrerem reações unimoleculares com liberação de um produto (GAMA et al, 2003 citado por Aguieiras, 2011).....33

Figura 2. 4: Mecanismo catalítico da lipase de Candida antarctica (Cal B) baseado na tríade catalítica. A reação envolve dois estados de transição (TS1 e TS2) e um intermediário acil enzima (ROTTICCI, 2000).....34

Figura 2. 5: Fórmula estrutural α-D-frutopiranose (a) e α-D-frutofuranase (b).....36

Figura 2. 6: Diacetonídeos I e II derivados da frutose. 39

Figura 2. 7: Mono palmitato de Frutose.....41

Figura 2. 8: Valores de HBL de emulsificantes em aditivos alimentícios (YAN, 2001).....42

Figura 2. 9: Representação estrutural de uma microemulsão A/O (a), O/A (b) e bicamada (c). (OLIVEIRA et al, 2004).....49

Figura 2. 10: Micela reversa. Adaptado de Bhattacharyya, (2008).....50

Figura 2. 11: Tensoativo bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio (AOT). 53

Figura 2. 12: Representação esquemática diagrama de fases do sistema AOT/isooctano/água (adaptado de DE; MAITRA, 1995). 54

Figura 2. 13: Localização da enzima na micela reversa. (a) enzima hidrofílica, (b) enzima ativa na superfície, (c) enzima na membrana, (1) cabeça polar, (2) cauda do surfactante, (3) contra-íon ou molécula de água e (4) enzima (adaptado de CARLSON; NAGARAJAN, 1992).....55

Figura 2. 14: Tipos de reatores enzimáticos (RIBEIRO, 1989). 59

Figura 2. 15: Esquema operacional de reator enzimático de fluxo contínuo de leito fixo.....61

Figura 3. 1: Curvas padrão dos ácidos graxos utilizados como reagentes de partida. Curva padrão do AP (a); curva-padrão do RAG (b). 67

Figura 3. 2: Placa de carbeto de silício (a) e demonstração da homogeneização da temperatura.....70

Figura 3. 3: Equipamento Asia (SYRRIS) de fluxo contínuo.....75

Figura 4. 1: Espectro de infravermelho (KBr) do 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D frutopiranose (DAF). 77

Figura 4. 2: Espectro de Infravermelho (KBr) da frutose. 78

Figura 4. 3: Reação de esterificação entre o DAF e o AP, realizada a 60°C, razão molar 1:1, e volume reacional de 1 mL. 81

Figura 4. 4: Investigação inicial de lipases comericiais na reação de esterificação do DAF com AP. Condições reacionais: temperatura 60^0C, razão molar 1:1 (20mM e 20mM) de DAF e AP em 1mL de n-heptano, 15% p/p ou p/v, tempo reacional de 24 horas. 81

Figura 4. 5: Espectro infravermelho (KBr) do éster (palmitato do diacetonídeo da frutose) obtido. 83

Figura 4. 6: Conversão nos diferentes tempos testados para a esterificação entre o DAF e o AP catalisada pela enzima RM IM (a) e TL IM (b). Temperatura reacional 60^0C, razão molar ácido e álcool (1:1), 15 % (p/p) de enzima. 84

Figura 4. 7: Gráfico de Pareto para o DCCR da enzima RM IM mostrando a significância das variáveis avaliadas: E, quantidade de enzima; S, concentração de substrato. 88

Figura 4. 8: Gráfico de Pareto para o DCCR da enzima TL IM mostrando a significância dos respectivos efeitos lineares e quadráticos das variáveis avaliadas: E, quantidade de enzima; S, concentração de substrato; T, temperatura. 90

Figura 4. 9: Superfície de resposta (a) para a reação de esterificação da enzima RM IM e curva de contorno (b) em função da quantidade de enzima e da concentração de substrato. Em cada figura as variáveis não apresentadas foram fixadas no ponto central. 94

Figura 4. 10: Superfície de resposta (a) para a reação de esterificação da enzima TLIM e curva de contorno (b) em função da temperatura e da concentração de substrato. Em cada figura as variáveis não apresentadas foram fixadas no ponto central. 95

Figura 4. 11: Superfície de resposta (a) para a reação de esterificação da enzima TL IM e curva de contorno (b) em função da quantidade de enzima e da temperatura. Em cada figura as variáveis não apresentadas foram fixadas no ponto central. 96

Figura 4. 12: Conversão em função do número de reciclos da enzima RM IM e TL IM para a esterificação do DAF com AP. Condições reacionais: 10 mM de substrato razão molar 1:1, temperatura de 60^0C, 250 mg de enzima. 97

Figura 4. 13: Fotomicrografia do suporte da enzima RM IM (a e b) e TL IM (c e d) antes (1) e após (2) as seis bateladas. Aumento de 100x e 200x (a) e (c), respectivamente e aumento de 1000x (c e d). Condições reacionais: 10 mM de substrato razão molar 1:1, temperatura de 60^0C, 250 mg de enzima. 99

Figura 4. 14: Reator Easy Max, Metter Toledo. 1) reator jaquetado; 2- agitador mecânico. 101

Figura 4. 15: Conversão em diferentes tempos da esterificação do DAF com AP em reator do tipo CSTR. Volume reacional de 100 mL, solvente n-heptano, 150 mg de enzima TL IM, 55^0C, 32,5 mM de substrato (1:1) e agitação de 300 rpm. 102

Figura 4. 16: Atividade Residual do sobrenadante de acordo com a concentração de Triton X-100 utilizada na dessorção da lipase RM IM de seu suporte, segundo a metodologia descrita por Cabrera et al, 2009. 104

Figura 4. 17: Distribuição do tamanho das partículas da solução 0,1 M AOT/isooctano (a), CAL B na sua solução tampão (b) e micela reversa da enzima CAL B (c). 106

Figura 4. 18: Matriz de organogel de HPMC contendo a microemulsão AOT/CaL B (a) e microscopia eletrônica de varredura, aumento de 100x do grumo do gel. 107

Figura 4. 19: Conversão da esterificação (%) do DAF com AP catalisada pela enzima Cal B em MBG em diferentes tempos reacionais. Condição reacional: 40 mM de ácido palmítico e DAF (1:1), temperatura de 40 ^{0}C, 10% (p/v) de peneira molecular e 150 rpm de agitação... 109

Figura 4. 20: Gráfico de Pareto do delineamento composto central rotacional (DCCR) das reações em MBG realizadas em n-heptano mostrando a significância da variável temperatura, T; concentração de substrato, S; quantidade de enzima, E e agitação, Ag dos efeitos lineares, L e quadráticos, Q. 114

Figura 4. 21: Gráfico de Pareto do delineamento composto central rotacional (DCCR) das reações realizadas em tolueno mostrando a significância da variável temperatura, T; concentração de substrato, S e quantidade de peneira molecular PM; dos efeitos lineares, L e quadráticos, Q. 116

Figura 4. 22: Superfície de resposta para as reações de esterificação catalisadas pela enzima Cal B realizadas em n-heptano (a, b) e tolueno (c, d). Em cada figura as variáveis não apresentadas foram fixadas no ponto central. 120

Figura 4. 23: Conversão em função do número de reciclos da enzima Cal B em MBG. Condições reacionais: 5 mM de substrato razão molar. 1:1, temperatura de 50^{0}C, 15% de peneira molecular, 105 µg de enzima e agitação de150 rpm para as esterificação realizadas em tolueno e para as reações realizadas em heptano foram usados 90 µg de lipase, 5 mM de substrato (1:1), agitação de 225 rpm, temperatura de 50^{0}C e 15% de peneira molecular. 121

Figura 4. 24: Reação de esterificação do DAF com ácido palmítico em fluxo contínuo..... 122

Figura 4. 25: Conversão em função do número de ciclos para as reações catalisadas pelas enzimas RM IM e TL IM em fluxo contínuo. Condições reacionais para a RM IM: fluxo de 0,7 mL/min, 10 mM de solução (1:1) de DAF e AP em n-heptano e temperatura de 60^{0}C. Condições reacionais para a TL IM: fluxo de 0,1 mL/min, 19.1 mM de solução (1:1) de DAF e AP em n-heptano e temperatura de 70.9^{0}C. 123

Figura 4. 26: Esterificação do DAF com um resíduo de ácidos graxos oriundo da indústria de refino de óleo de palma em condições de fluxo contínuo. 125

Figura 4. 27: Espectro obtido da análise por CG-EM do resíduo de ácidos graxos oriundo do refino de óleo de palma (RAG). 126

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2. 1: Algumas áreas e aplicação de lipases (WAKABAYASHI, 2004; BARON, 2003). 29

Tabela 2. 2: Valores de solubilidade de frutose em solventes orgânicos descritos pela literatura. 37

Tabela 2. 3: Reação enzimática de acetais de diversos carboidratos com ácidos graxos. 40

Tabela 2. 4: Vantagens da utilização de micelas reversas em biocatálise. (CARVALHO; CABRAL, 2000). 51

Tabela 2. 5: Surfactantes e seus respectivos solventes utilizados normalmente na formação de microemulsões óleo/água (STAMATIS et al, 1999). 52

Tabela 3. 1: Rampa de aquecimento utilizada para a análise de RAG em CG-EM. 68

Tabela 3. 2: Lipases comerciais utilizadas na reação de esterificação (DAF e AP). 70

Tabela 3. 3: Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) das variáveis independentes (2^{3-1}) para as lipases avaliadas, RM IM e TL IM. 71

Tabela 3. 4: Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) das variáveis independentes (2^{2}) para as reações catalisadas pela enzima RMIM. 72

Tabela 3. 5: Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) das variáveis independentes (2^{3}) para as reações catalisadas pela enzima TLIM. 72

Tabela 3. 6: Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) das variáveis independentes avaliadas no delineamento fatorial fracionário (DFF) 2^{5-1} para a reação catalisada em diferentes solventes pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel. 74

Tabela 3. 7: Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) para as variáveis independentes avaliadas no DCCR (2^{3}) para as reações realizadas em heptano. 74

Tabela 3. 8: Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) para as variáveis independentes avaliadas no DCCR (2^{3}) para as reações realizadas em tolueno. 75

Tabela 4. 1: Teste de solubilidade da frutose e do DAF em concentrações de 100 e 200 mM em diferentes solventes a temperatura ambiente. 79

Tabela 4.2: Matriz delineamento experimental fatorial fracionário 2^{3-1} com valores codificados e conversão para as enzimas avaliadas. 85

Tabela 4. 3: Estimativa dos efeitos do planejamento fatorial fracionário (DFF) 2^{3-1} para as enzimas avaliadas. 86

Tabela 4. 4: Delineamento composto central (DCC) 2^2 com valores codificados e resultados de conversão da reação de esterificação catalisados pela enzima RM IM. 87

Tabela 4. 5: Estimativa dos efeitos dos parâmetros avaliados no DCCR 2^2 para a enzima RM IM. 87

Tabela 4. 6: Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com valores codificados e os resultados de conversão da reação de esterificação catalisados pela enzima TLIM.....89

Tabela 4. 7: Efeitos estimados das variáveis avaliadas no DCCR 2^3 para a enzima TLIM....90

Tabela 4. 8: Análise de Variância (ANOVA) para a validação dos modelos das enzimas estudadas.....92

Tabela 4. 9: Comparação das conversões obtidas pelo método Lowry-Tinsley e massa de éster.....100

Tabela 4. 10: Quantidade de proteína imobilizada de acordo com o suporte imobilizado. Adaptado de Cabrera et al, 2008. 104

Tabela 4. 11: Matriz do delineamento fatorial fracionário (DFF) 2^{5-1} com valores codificados e resultados de conversão para cada experimento realizado em heptano e tolueno. 110

Tabela 4. 12: Efeito estimado dos parâmetros do delineamento fatorial fracionário (DFF) 2^{5-1} das reações de esterificação em MBG para ambos os solventes avaliados. 111

Tabela 4. 13: Matriz de experimentos do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com valores codificados e os respectivos resultados de conversão para as reações em MBG realizadas em n-heptano. 112

Tabela 4. 14: Matriz de experimentos do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com valores codificados e os respectivos resultados de conversão para as reações catalisadas pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em MBG realizadas em tolueno. 115

Tabela 4. 15: Análise de Variância (ANOVA) para a validação dos modelos das reações catalisadas pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em MBG nos solventes estudados. 117

Tabela 4. 16: Conversão de esterificação entre o DAF e AP catalisada pelas lipases estudas em condição de fluxo contínuo.....122

Tabela 4. 17: Esterificação com diferentes tipos de ácidos graxos em fluxo contínuo.....124

Tabela 4. 18: Conversão da esterificação entre 100 mM de DAF e RAG (1:1) catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* IM em condição de fluxo contínuo.....127

Tabela 4. 19: Conversão da esterificação entre 300 mM de DAF e RAG (1:1) catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* IM em condição de fluxo contínuo.....127

Tabela 4. 20: Conversão da esterificação entre 500 mM de DAF e RAG (1:1) catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* IM em condição de fluxo contínuo.....128

Tabela 4. 21: Conversão para as reações realizadas em n-heptano e em fluxo contínuo catalisada pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel. 130

Tabela 4. 22: Comparação dos resultados obtidos em cada sistema estudado. 131

LISTA de SIGLAS e ABREVIATURAS

Å – angströn

A.G. – ácido graxo

Ag – agitação

ANOVA - análise de variância

AOT - bis-(2-etilexil)-sulfoccinato de sódio

AP - Ácido palmítico

BSA – albumina de soro bovino

CaL B – lipase B de *Candida antarctica*

CCD - cromatografia em camada delgada

CG – Cromatografia Gasosa

CG-EM – Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

^{13}C-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

COSY - *Correlation Spectroscopy*

CSTR - Continuous Stirred-Tank Reactor

DCCR – delineamento do composto central rotacional

DFF – delineamento fatorial fracionário

DMF- dimetilformamida

DLS - *Dynamic Light Scattering*

DMSO – dimetilsulfóxido

g – grama

Glu – Ácido glutâmico

h – hora

^{1}H-RMN – Ressonância Magnética de Hidrogênio xv

HLB - *Hydrophilic-Lipophilic Balance*

His – Histidina

HPMC – hidroxipropilmetil celulose

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

IV – infravermelho

Log P – Coeficiente de partição (1-octanol/água)

MBG - *microemulsion-based organogels*

MEV – microscopia eletrônica de varredura

min – minuto

mM – mili molar

MSTFA - N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida

N435 - Novozym® 435 – lipase B de *Candida antarctica*

P – Produtividade (g de produto . h-1 . g de enzima-1)

P. M. - peneira molecular

ppm – partes por milhão

RAG – resíduo de ácidos graxos proveniente da indústria de refino do óleo de palma

RM IM – lipase de *Rizhomucor miehei* imobilizada em resina de troca iônica fenólica;

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

rpm – rotações por minuto

Ser – Serina

TBME- *terc*-butilmetil éter

TL IM – Lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em cerâmica

UV – ultravioleta

V – Volume

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1.1. Introdução

A indústria química mundial tem contribuído imensamente para a melhoria da qualidade de vida da humanidade, mas está sob crescente pressão para alterar as atuais práticas de trabalho em favor de alternativas mais ecológicas. A biotecnologia é uma dessas promissoras alternativas à indústria química tradicional, que atende aos apelos ambientais (GAVRILESCU; CHISTI, 2005).

Recentemente um grande interesse tem-se voltado aos ésteres de ácidos graxos provenientes de açúcares, usualmente chamados de ésteres de açúcar. Estas moléculas despertam interesse, por serem tensoativos não-iônicos, biodegradáveis e que possuem boa propriedade emulsificante, estabilizante e quando aplicados em alimentos aumentam a sua vida de prateleira. Estes compostos, quando produzidos por via enzimática e de fontes renováveis são inodoros, não possuem gosto, são atóxicos e não são irritantes à pele e aos olhos, por isso têm aplicação em inúmeras áreas, incluindo farmacêutica, cosmetológica e indústria alimentícia (CSÓKA et al, 2005).

Os ésteres de ácido graxo derivados da frutose apresentam algumas vantagens em comparação aos ésteres comerciais de sacarose como boas propriedades de superfície e valores de tensão interfacial (SOULTANI et al., 2003). Monoésteres de frutose também têm ação bacteriostática podendo ser utilizados na inibição da proliferação de bactérias causadoras de cárie, portanto com aplicabilidade em creme dental (WATANABE et al, 2000).

O interesse na produção de ésteres contendo moléculas de açúcar e ácido graxo intensifica-se devido à necessidade da utilização de fontes renováveis em prol da química sustentável. Óleos e gorduras, por exemplo, são ricos em ácidos graxos que em muitas indústrias são rejeitos de processo (RAHMAN et al, 1997). Uma alternativa viável é utilizar esses materiais que são obtidos de fontes naturais como matérias-primas nas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias agregando dessa maneira, valor a esses resíduos.

Os métodos químicos para a síntese de ésteres de açúcar exigem a utilização de altas temperaturas na presença de catalisadores alcalinos, resultando em um alto consumo energético e na formação de subprodutos indesejáveis devido à baixa seletividade e utilização de solventes tóxicos (YAN et al, 2001). Consequentemente, nem todos os ésteres

quimicamente produzidos são permitidos para aplicação em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (HILL; RHODE, 1999).

Os ésteres de carboidratos e ácidos graxos podem ser sintetizados enzimaticamente evitando os problemas gerados na síntese química (SARNEY; VULFSON, 1995). O emprego de enzimas como biocatalisadores é uma alternativa promissora para a química sintética tradicional (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Para estabelecer um processo de biotransformação eficaz, faz-se necessário o estudo detalhado dos fatores que influenciam o desenvolvimento e a otimização do mesmo (AIRES-BARROS, 2002).

Os solventes mais comumente utilizados com o intuito de evitar reações paralelas de hidrólise na esterificação enzimática de açúcares são dimetilformamida e piridina (FERRER et al., 1999). Estes solventes possuem alta toxicidade (TAI; BRUNNER, 2009) e geram um aumento da hidrofobicidade no sistema reacional, minimizando a solubilidade dos açúcares e a atividade enzimática (HUMEAU et al, 1998; DEGN; ZIMMERMANN, 2001). Dessa maneira, a maioria das esterificações enzimáticas necessita de um longo tempo de incubação. Uma alternativa para solucionar esse problema é a redução da polaridade dos carboidratos através de acetais que aumentam a solubilidade da molécula no meio melhorando as taxas reacionais, muitas vezes com a necessidade de menores tempos de contato (ADELHORST et al, 1990; DE GOEDE et al, 1994).

A escolha de um solvente orgânico apropriado que maximize a atividade enzimática gerando uma boa solubilização de ambos os substratos também é um fator importante a ser considerado na esterificação enzimática (CASTILLO et al, 2003). Porém, a característica principal das lipases reside no fato delas não atuarem no interior da fase orgânica e sim na interface óleo/água ou na interface solvente apolar, como isooctano/água (ZOUMPANIOTI et al, 2006). Como alternativa, sistemas micro heterogêneos tais como microemulsões água em óleo (A/O), conhecidos como micelas reversas, têm sido propostos (XENAKIS et al, 2009). Micelas reversas possuem grande área interfacial que fornece um domínio aquoso onde as enzimas podem ser acomodadas, uma interface onde o sítio ativo das enzimas pode ser ancorado, e de uma fase orgânica não-polar, onde substratos e/ou produtos hidrofóbicos podem ser dissolvidos (XENAKIS et al, 2009; STAMATIS et al, 1999). Além disso, são termodinamicamente estáveis e opticamente transparentes. Assim, as micelas reversas tornam-se microreatores versáteis onde as lipases podem ser incorporadas tornando-as solúvel em meio orgânico sem a redução da sua atividade catalítica (LUISI; LAANE, 1986).

Os processos enzimáticos podem ocorrer em diferentes tipos de biorreatores, sejam eles em condições de batelada ou em fluxo contínuo. A utilização de lipases em reator em batelada, pode em alguns casos trazer prejuízos reacionais devido às perdas de proteína geradas por cisalhamento do suporte da enzima, devido ao sistema de agitação utilizado nesse tipo de reator, o que implica no aumento do custo do processo (WANDREY et al, 2000; CHARTRAIN et al, 2001). Para fins industriais, o sistema de fluxo contínuo apresenta vantagens sobre os reatores em batelada, como o maior controle de processo, alta produtividade e melhoria da qualidade, pureza e rendimento reacional. Dentre os diversos tipos de reatores que podem ser utilizados em sistemas contínuos, destacam-se os reatores de leito fixo que apresentam baixo custo, facilidade de construção, operação e manutenção.

Dentro deste contexto, foi estudada a esterificação enzimática do derivado da frutose, o 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose com o ácido palmítico em meio orgânico catalisada por lipases imobilizadas comerciais e em micelas reversas imobilizadas em organogel em sistema batelada e em fluxo contínuo objetivando a produção de palmitato de frutose protegido. A utilização da frutose protegida como substrato na síntese de éster da frutose por via enzimática é inédito, contemplando assim essa lacuna na literatura.

1.2. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é estudar a produção de palmitato de frutose protegido catalisada por lipases imobilizadas comerciais e lipases imobilizadas em micelas reversas.

1.3. Objetivos específicos

- Avaliar a solubilidade dos carboidratos utilizados como substrato em meio orgânico;
- Avaliar as lipases comerciais livres e imobilizadas para a esterificação do ácido palmítico e 2,3:4,5-*O*-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (DAF);
- Maximizar as condições em sistema batelada (temperatura, massa de enzima e concentração de substrato) para a reação de esterificação em heptano entre o DAF e o ácido palmítico catalisada por lipases imobilizadas comerciais;

- Avaliar a lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei*, em solventes que maximizassem a concentração de substrato utilizando resíduo industrial como substrato em sistema de fluxo contínuo;
- Utilizar um resíduo de ácidos graxos (RAG) oriundo de uma indústria de refino de óleo de palma como fonte de ácido graxo na esterificação com DAF;
- Utilizar a lipase de *Candida antarctica* (Cal B) em micela reversa imobilizada em organogel como catalisador na esterificação entre ácido palmítico e DAF;
- Maximizar as condições reacionais em sistema batelada (temperatura, agitação, quantidade de peneira molecular, concentração de substrato e quantidade de enzima) para aumento da conversão enzimática, utilizando a enzima em micela reversa imobilizada em organogel;
- Investigar a utilização das lipases imobilizadas comerciais de *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* e da lipase Cal B em micela reversa imobilizada em organogel na reação de esterificação de ácido palmítico e DAF realizada em sistema de fluxo contínuo.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Química sustentável

A preocupação crescente com o meio ambiente tem gerado uma mobilização das indústrias e de órgãos ambientais na busca de processos e produtos ambientalmente seguros em prol da sustentabilidade. A utilização de uma matéria-prima renovável contribui significativamente para o desenvolvimento sustentável, uma vez que estamos vivendo uma era de esgotamento das reservas fósseis e de problemas ambientais com resíduos industriais (MEIER et al, 2007).

Os princípios da química verde estão relacionados diretamente a sustentabilidade da indústria química. Eles refletem a necessidade de medidas eficientes para a implantação de processos que gerem menos prejuízos ambientais tanto nas universidades quanto nas indústrias (TANG et al, 2005). As estratégias para o desenvolvimento de tecnologias limpas para os processos químicos têm como objetivo equilibrar os aspectos econômicos e ambientais (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

Diante do crescimento das exigências ambientais as indústrias se vêem forçadas a se adaptarem para atendê-las e conseguirem manter a sua competitividade no mercado. Com isso, as aplicações da química verde ganham notoriedade dentro do conceito de sustentabilidade à medida que agrega valor aos produtos químicos e estes adquirem a preferência de mercado por satisfazerem às exigências de normas ambientais, de segurança e qualidade (SOUSA, 2006)

Para atender os requisitos de uma economia sustentável é de suma importância o monitoramento de toda cadeia de produção da indústria, desde o cultivo e processamento da matéria-prima, até a destinação dos resíduos gerados. Assim, o beneficiamento dos resíduos, bem como a utilização em indústrias químicas e/ou farmacêuticas de uma matéria prima renovável tem sido mencionado como componente vital da sustentabilidade.

Em 2011, a produção mundial de óleo de palma foi estimada em mais de 47 milhões de toneladas, em torno de 32% da produção mundial de óleos vegetais (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE USDA, 2013). O processo de refinamento do óleo tem

por objetivo reduzir as impurezas para adequá-lo aos níveis comestíveis. Isto significa que, sempre que possível as perdas nos componentes desejáveis são mantidas mínimas para a produção de óleo comestível de alta qualidade que atende aos padrões da indústria. Para atingir este objetivo são gerados ácidos graxos livres como um subproduto dos processos de refinamento físico ou químico como pode ser visualizado no esquema da Figura 2.1. Esse resíduo de ácidos graxos pode ser utilizado em sua forma bruta ou purificado pela indústria química agregando valor ao mesmo (ITABAIANA et al., 2013a).

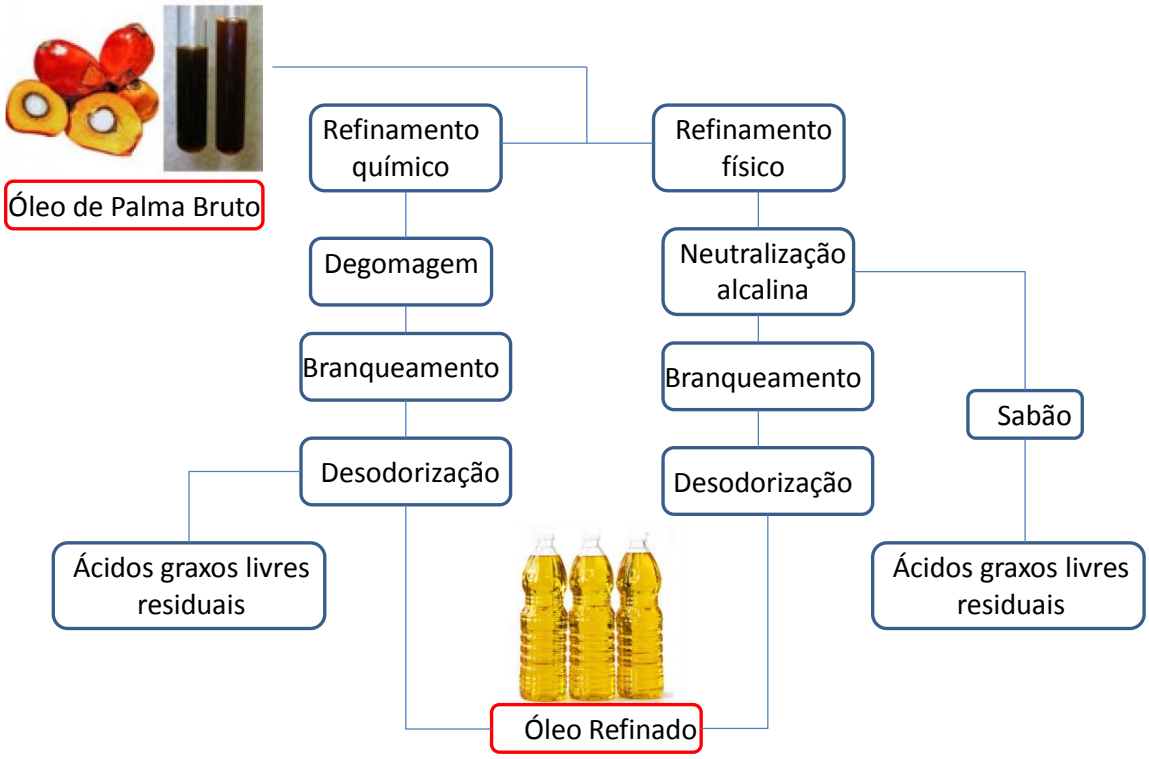


Figura 2. 1: Processo de refino do óleo de palma.

Nesse contexto os carboidratos bem como os derivados de óleos vegetais são os compostos que reúnem condições ideais para viabilizar o desenvolvimento industrial e econômico de produtos orgânicos.

2.2. Lipases

2.2.1. Características gerais

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3), capazes de catalisar reações de hidrólise e síntese em grupamentos ésteres de diversos compostos. Lipases são encontradas na natureza, produzidas por plantas, animais e microrganismos. Elas possuem um papel fundamental nas relações biológicas de lipídeos em microrganismos. São requeridas como enzimas digestivas necessárias para mobilização de gordura usada como reservatório de fonte de energia. Elas também são envolvidas no metabolismo intracelular de lipídeos no funcionamento biológico de membranas. As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação a suas propriedades bioquímicas e fisiológicas (VILLENEUVE et al., 2000).

A maioria das lipases pode ser ativada pelo fenômeno de ativação interfacial que se caracteriza pelo aumento da atividade lipolítica quando a solubilidade do substrato é excedida formando uma fase independente. Este fenômeno ocorre na interface água/lipídio e tanto a qualidade quanto a quantidade da interface têm papel importante na atividade catalítica dessas enzimas (SARDA; DESNUELE, 1958 citado por Paiva et al, 2000).

Lipases de origem microbiana são amplamente utilizadas em aplicações biotecnológicas e em química orgânica (HASAN et al., 2006). A principal forma de produção de lipases tem sido através de processos fermentativos apresentando maior capacidade produtiva e custo de obtenção reduzido. Alguns microorganismos utilizados para a produção dessas enzimas são fungos do gênero *Rhizopus, Aspergillus, Penicillium, Geotrichum* e *Colletotrichum*, leveduras do gênero *Rhodotorula, Yarrowia, Cândida, Trichosporon, Aureobasidium, Saccharomyces* e *Williopsis* e bactérias do gênero *Acinetobacter, Pseudômonas, Staphylococcus, Bacillus* e *Serratia* (SAXENA et al, 2003; TREICHEL et al, 2009).

O termo estabilidade das lipases já conhecidas depende de sua origem, sendo que as de procedência microbiana possuem maior estabilidade térmica (VULFSON, 1994; KAZLAUSKAS, BORNSCHEUER, 1998). A temperatura de operação dessas enzimas pode variar desde a ambiente até 70°C, mas em sua maioria, possuem uma atividade de ótimo entre 30 e 40°C. A estabilidade térmica das lipases também dependente da sua massa molecular que varia entre 20 a 75 kDa e da faixa de pH relacionada a atividade, variando entre 4 a 9.

O uso de lipases nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos eficientes processos executados pela natureza. As lipases constituem o mais importante grupo de enzimas com valor biotecnológico, devido à versatilidade de aplicações possíveis e facilidade de produção em larga escala (HASAN et al., 2006). Assim o interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente. As áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, são as principais responsáveis por esse avanço as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação de enzimas como catalisadores em processos industriais.

As reações de hidrólise, realizadas pelas lipases atualmente abrangem a maior parte das aplicações industriais (indústrias de detergentes e de alimentos), porém a transesterificação juntamente com as características enântio e régio seletivas das lipases vêm ganhando espaço nos mais diversos campos (indústria farmacêutica, de química fina, de cosméticos, oleoquímica, de couros, de polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais) (CASTILHO et al., 2000). As áreas nas quais a aplicação das lipases vem tendo maiores destaques podem ser visualizadas na tabela 2.1 (WAKABAYASHI, 2004; BARON, 2003).

Tabela 2. 1: Algumas áreas e aplicação de lipases (WAKABAYASHI, 2004; BARON, 2003).

ÁREA	APLICAÇÃO
Farmacêutica	síntese de intermediários de fármacos (ex. ibuprofeno e naproxeno, fármacos com atividade antiinflamatória); resolução de misturas racêmicas (ex. síntese de atenolol, fármaco anti-hipertensivo)
Alimentos	síntese de aromas (ex. maturação de queijos); síntese de edulcorantes (ex. aspartame)
Detergentes	remoção de manchas de gorduras dos tecidos;
Agroquímica	síntese de inseticidas e pesticidas

Tratamento de efluentes	redução do teor de gorduras em efluentes da indústria de laticínios
Oleoquímica	hidrólise e interesterificação de óleos e gorduras

As lipases são ferramentas potentes na catálise de diversas reações por serem estáveis e eficientes com diferentes substratos (JAEGER, DIJKSTRA, REETZ, 1999; BORNSCHEUER, KAZLAUSKAS, 1998; VILLENEUVE et al, 2000, FREIRE, CASTILHO, 2008). Além da hidrólise, as reações ditas "reversas" como esterificação (GONÇALVES et al, 2013), interesterificação (LI et al, 2010) alcóolise (NEANG et al, 2013) acidólise (BEBARTA et al, 2013), aminólise (STAVILA, LOOS, 2013) lactonização (ZHENG et al, 2009) e epoxidação (CORRÊA et al, 2012) têm enorme importância, pois se mantém ativas em meios contendo solventes orgânicos (FORESTI, FERREIRA 2007).

Apesar de triglicerídeos de cadeia longa (com mais de 10 átomos de carbono) serem os seus principais substratos, as lipases atuam sobre uma gama de substratos não-naturais (ésteres não-lipídicos) e de diversos tamanhos. Essa versatilidade das lipases pelos mais diversos substratos sugere que sua estrutura polipeptídica seja flexível e possa adotar diferentes conformações dependendo das características físico-químicas do meio, o que dificulta a modelagem e previsão de interações estereoquímicas enzima-substrato (COSTA, AMORIM, 1999).

2.2.2. Estrutura e mudança conformacional

Diversas lipases já foram elucidadas estruturalmente e nos fornecem importantes informações com relação ao seu mecanismo de catálise *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa* (hoje conhecida como *C. cylindraceae*), *Pseudomonas glumae*, *Candida antarctica*, *Chromobacterium viscosum*, pancreas de cavalo, pancreas humano e bovino (YAHYA et al, 1998). As lipases pertencem a família das α/β-hidrolases cujas atividades dependem principalmente de uma tríade catalítica usualmente formada por resíduos de Ser, His e Asp ou Glu. A serina como nucleofilo e resíduos ácidos de histidina e aspartato ou glutamato. O resíduo de serina usualmente aparece num penta-peptídeo conservado Gly-X1-Ser-X2-Gly, onde X1 é uma Try ou His. As α/β-

hidrolases também incluem enzimas lipolíticas (JAEGER et al, 1999; BORNSCHEUER et al, 2002).

Embora as lipases diferenciem-se na sequência de aminoácidos (estrutura primária), estas enzimas apresentam uma alta similaridade em sua arquitetura tridimensional (estruturas secundária e terciária). No geral as lipases apresentam em sua estrutura, uma folha-β central com o residuo de serina ativo em "loop" denominado cotovelo catalítico (Figura 2.2). Acima da serina há ou é formada após a ativaçao da enzima uma fissura hidrofóbica. A ativação, muitas vezes é um movimento de uma estrutura polipeptídica helicoidal (α-helice) que age como uma ou várias tampas (conhecida como "*lid*"). Este mecanismo é uma parte da ativação interfacial que ocorre acima da concentração micelar critica do substrato e confere a atividade catalítica à lipase (SVENDSEN, 2000). O lado da tampa voltado ao sitio catalitico é composta por parte hidrofobica, enquanto que o lado oposto é hidrofílico estabilizado pelas interações das protreínas da superficie. A reorientação da estrutura da tampa ocorre devido ao aumento da hidrofobicidade da superfície na vizinhança do sitio ativo expondo-o. Essa abertura pode ser iniciada após a interação com uma interface apolar/polar. Essa interface pode tanto gerar inibição à lipase quanto aumentar sua tolerância a inibidores quando presentes em uma interface (YAHYA et al, 1998).

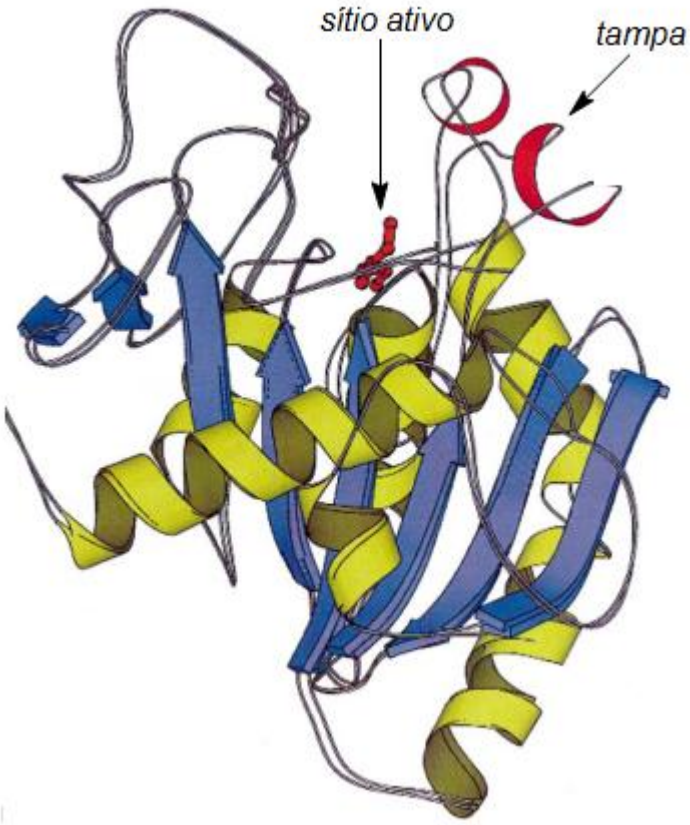


Figura 2. 2: Estrutura cristalina geral de lipase representada usando a *Humicola lanuginosa*. A folha-β está representada em azul, rodeada por algumas hélices em amarelo, o sítio ativo (resíduo de serina) e a tampa em vermelho. (SVENDSEN, 2000).

2.2.3. Mecanismo reacional

O mecanismo das reações catalisadas pelas lipases em reações de hidrólise, esterificação ou interesterificação que envolve a participação de dois substratos e dois produtos é normalmente descrito pelo modelo Ping-pong Bi-Bi conforme pode ser visualizado na Figura 2.3 (GAMA et al, 2003). O modelo Ping-pong Bi-Bi proposto acontece em dois estágios: primeiro, um grupo funcional do primeiro substrato A é removido do substrato pela enzima E para produzir uma forma estável da enzima F (E - grupo funcional) e o primeiro produto P. No segundo estágio da reação, o grupo funcional é removido da enzima por um segundo substrato B para produzir o segundo produto Q (B - grupo funcional), regenerando a forma original da enzima, E.

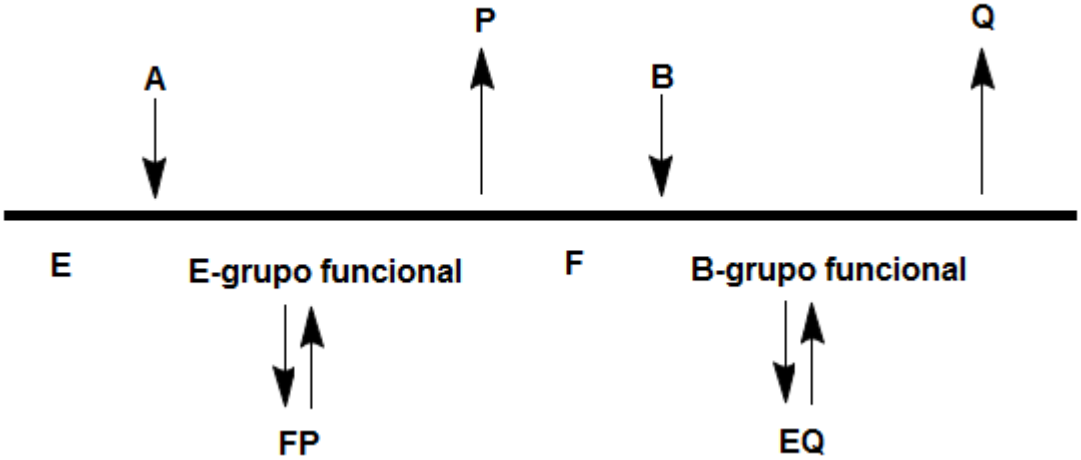


Figura 2. 3: Mecanismo Ping-Pong Bi Bi de lipase catalisando reações envolvendo dois substratos e dois produtos. A e B: substratos; P e Q: produtos; E, F: enzima livre; FP, EQ: formas da enzima capazes de sofrerem reações unimoleculares com liberação de um produto (GAMA et al, 2003 citado por Aguieiras, 2011).

A figura a seguir (Figura 2.4), proposta por Rotticci, (2000) descreve o mecanismo de catálise da enzima Cal B para uma reação de esterificação.

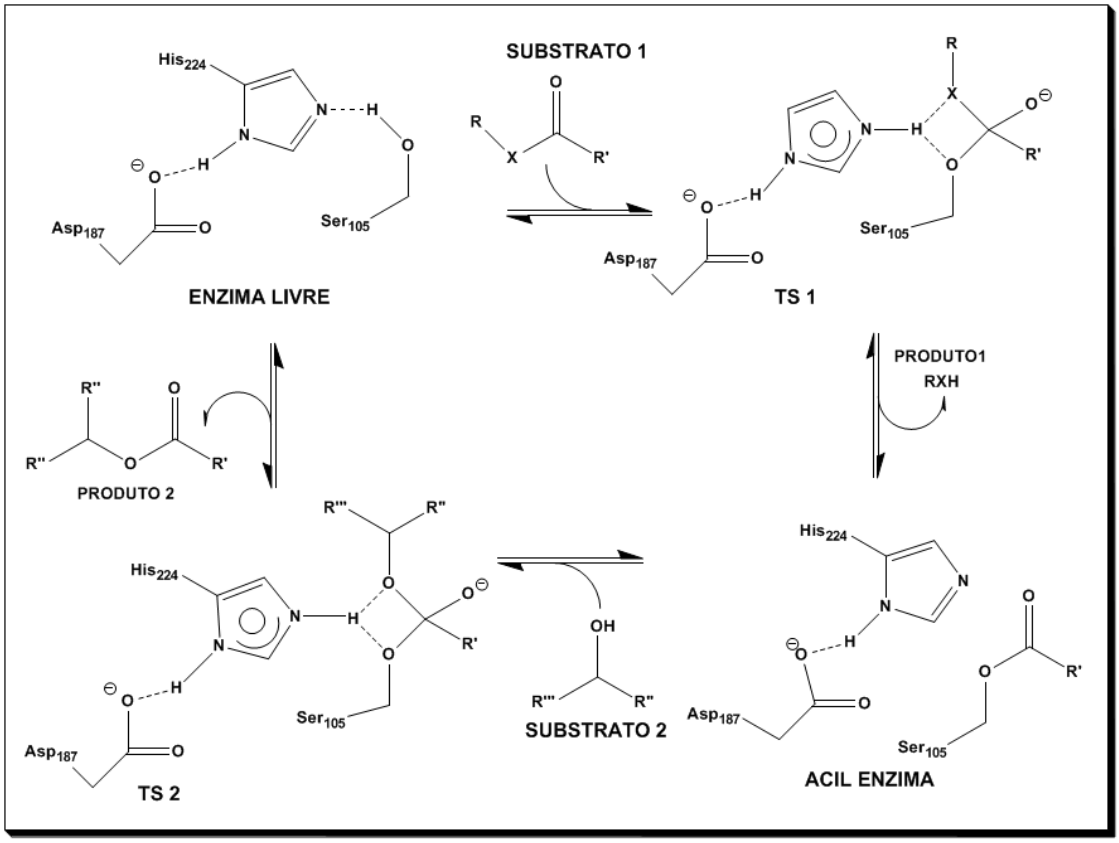


Figura 2. 4: Mecanismo catalítico da lipase de Candida antarctica (Cal B) baseado na tríade catalítica. A reação envolve dois estados de transição (TS1 e TS2) e um intermediário acil enzima (ROTTICCI, 2000).

A reação ocorre em duas etapas: na primeira etapa, a enzima é acilada pelo substato 1 para formar um intermediário acil-enzima e o produto 1 é liberado; na segunda etapa, a enzima acetilada é então desacilada pelo substrato 2, formando o segundo produto (Figura 2.4).

Na tríade catalítica Serina 105 – Histidina 224 – Aspartato 187, inicialmente, o oxigênio do grupo hidroxila da Serina ataca o átomo de carbono do grupo carbonila do substrato transformando numa ligação simples deixando o átomo de oxigénio com uma carga negativa formando dessa maneira um estado de transição de geometria tetraédrica em torno daquele carbono, através de pontes de hidrogénio entre o oxiânion e dois grupos NH de cadeias principais da Histidina. Com a formação deste estado de transição, ocorre a transferência de um próton da Serina para a Histidina. Em parte a carga que se desenvolve no estado de transição é neutralizada pelo aspartato. A ligação carbonila é então refeita, com o auxílio da forma protonada da Histidina que perde o próton, e dá-se o colapso do intermediário tetraédrico com expulsão do produto 1. A formação do intermediário acil

enzima se dá pela ligação covalente do primeiro substrato à Serina. Completa-se assim a etapa de acilação. A etapa seguinte, de desacilação, acontece de forma semelhante, mas por ordem inversa. Ocorre o ataque nucleofílico à acil-enzima, por parte do reagente álcool (na reação de transesterificação) ou da água (na reação de hidrólise) iniciando o processo. Como resultado, forma-se mais uma vez com o auxílio da Histidina, de um novo intermediário tetraédrico que colapsa com libertação de um segundo produto (éster, na reação de transesterificação, e ácido, na reação de hidrólise). Assim a enzima regressa ao seu estado inicial (REBOCHO, 2008).

2.2.4. Biocatálise em meios orgânicos

Antigamente a catálise enzimática se restringia ao emprego de reações em meio aquoso. Dessa forma o potencial de utilização das enzimas em síntese orgânica era minimizado devido a baixa solubilidade de alguns substratos em água (GARCÍA-JUNCEDA et al, 2004). Com o intuito de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos iniciou-se a utilização de solventes orgânicos em reações enzimáticas (MAY et al, 2002).

O uso de solventes orgânicos ao invés da água gera uma série de vantagens como a mudança do equilíbrio reacional favorecendo a esterificação ao invés da hidrolise, as reações competitivas são desfavorecidas prevenindo a decomposição de compostos sensiveis a água, as enzimas podem ser recuperadas por operações simples (centrifugação e filtração), as enzimas podem exibir maior estabilidade e a especificidade do substrato pode ser alterada (PEDERSEN et al., 2002).

As reações enzimáticas realizadas em solventes são fortemente afetadas pela polaridade do meio orgânico. A alta atividade do biocatalisador é atingida em solventes relativamente hidrofóbicos, e nenhuma ou baixa atividade é observada em solventes relativamente hidrofílicos devido aos efeitos de desnaturação (CASTRO; ANDERSON, 1995).

No entanto a solubilidade de substratos em um meio orgânico pode ser um fator limitante a algumas reações. Isso porque moléculas polares, como os carboidratos possuem uma baixa solubilidade nesses solventes (ARCOS et al, 1998). Assim, tanto a taxa quanto a velocidade reacional na esterificão de carboidratos é diretamente proporcional a solubilidade dos mesmos (OOSTEROM et al., 1996).

2.2.5. Solubilidade da frutose em solventes orgânicos

A Frutose é um monossacarídeo ($C_6H_{12}O_6$), com os carbonos dispostos em anel, encontrada em frutas. A (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,5-Bis(hidroximetil)oxolane-2,3,4-triol, nome IUPAC é também conhecida como levulose, pois uma solução saturada é capaz de transformar luz linearmente polarizada em luz circularmente polarizada, com giro vetorial para esquerda. Possui massa molar de 180,16 g/mol, é um sólido cristalino branco, densidade de 1,59 g/cm³ a 20^0C e ponto de fusão entre 100 e 104^0C (VETEC QUÍMICA FINA, 2012). É altamente solúvel em água, solúvel em acetona, pouco solúvel em álcool e praticamente insolúvel em benzeno, clorofórmio e éter dietílico.

Como possui um grupo cetona, a frutose é considerada uma cetose, e também hexose por possuir seis átomos de carbono, portanto é uma cetohexose. Tem uma estrutura em anel que pode se apresentar em duas formas, como pode ser observado na Figura 2.5.

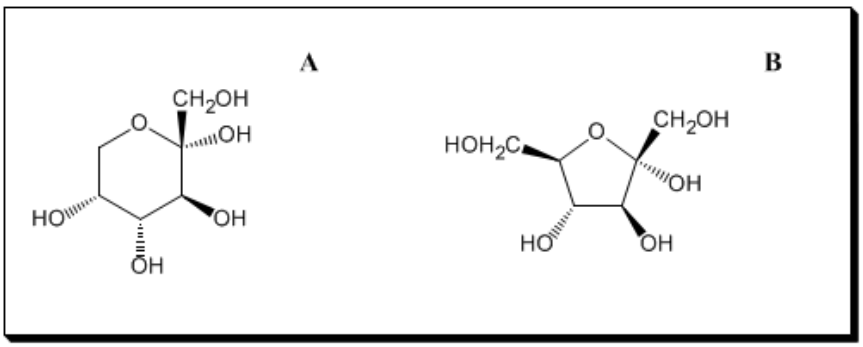


Figura 2. 5: Fórmula estrutural α-D-frutopiranose (a) e α-D-frutofuranase (b).

A Frutose é também popularmente conhecida como ¨açúcar de dieta¨ por ser mais doce que a sacarose (FERREIRA, 1995). A frutose está fortemente presente nas uvas e também é encontrada em cereais, vegetais e no mel.

Para que ocorram boas taxas de conversão reacional é necessária uma satisfatória solubilização dos substratos. Entretanto, a frutose apresenta baixa solubilidade em solventes orgânicos, ex. 10 $g.L^{-1}$ em 2-metil-2-butanol (SCHECKERMANN et al., 1995). Nem todos os solventes polares são ideais para as reações de esterificação, aqueles que contêm grupos hidroxilas acessíveis podem competir com o substrato. Outros solventes para solubilizar a frutose, necessitam de um elevado tempo de contato com o substrato, ex. *t*-butanol, 24 horas em shaker, 55 ^{0}C, 200 rpm, 100 mM de frutose (FONSECA, 2008).

Oosterom e colaboradores (1996) afirmaram que a velocidade tanto da esterificação quanto da transesterificação enzimática entre açúcares e compostos orgânicos é diretamente proporcional à solubilidade dos substratos, ou seja, quanto mais solúvel o carboidrato mais rápida é a reação.

Com o intuito de atingir uma satisfatória solubilização da frutose, diferentes solventes orgânicos já foram testados por diversos autores (tabela 2.2).

Tabela 2. 2: Valores de solubilidade de frutose em solventes orgânicos descritos pela literatura.

Solvente	Tempo (h)	Temperatura (^{0}C)	Concentração (g.L^{-1})	Autor
acetona	12	40	0,8	Arcos et al (1998)
terc-butanol	24	55	18,3	Tsukamoto et al (2008)
2-metil 2-butanol	n. d.	60	25	Soultani et al (2001)
terc-butanol	200	65	18	Dang et al (2005)
terc-butanol	2	60	15,9	Olive et al (2012)
2-metil-2-butanol	n. d.	60	11	Chamoleau et al (2001)
terc-butanol	n. d.	60	15,6	Yoo; Park;Yoon (2007)
2-metil-2-butanol	n. d.	90	25,5	Coulon et al (1997)

n. d. – não descrito

Alguns autores afirmam que a presença do produto tanto de mono quanto de diéster, aumenta a solubilidade da frutose devido a mudança de polaridade do meio reacional (ZHANG; HAYES, 1999). Segundo Zhang e Hayes (1999), uma mistura de 40% (mono e diéster) e 60% (ácido oleico) pode gerar uma solubilidade de até 66,8 g.L^{-1} a 60^{0}C, porém não foi relatado o tempo necessário para obter tal solubilidade

Com o intuito de aumentar a taxa de esterificação outros sistemas de solubilização da frutose são propostos. Pyo e Hayes (2008), por exemplo, estudaram através de isotermas de adsorção a solubilização da frutose em uma coluna empacotada com uma mistura do referido carboidrato e silica gel submetido a um fluxo de uma fase líquida composta de ácido oleico e mono/dioleato de frutose. Segundo os autores o conteúdo de frutose na fase líquida foi baixo, em torno de 0,1% (p/p), obtido quando se trabalhou com uma alta concentração de frutose na coluna e altas concentrações de éster na fase líquida.

Uma alternativa para aumentar a solubilização da frutose é a utilização de líquidos iônicos como meio reacional. Entretanto, o custo elevado de tal solvente ainda é um entrave que acaba por inviabilizar a sua utilização em larga escala. Ha e colaboradores (2010) dissolveram a frutose em água e adicionaram líquido iônico sozinho ou uma mistura de líquidos ([Bmim][TfO] e/ou [Omim][Tf_2N]) em temperatura ambiente. Após agitação, a mistura foi submetida a 12 horas de vácuo a 60^0C para a retirada da água. Os autores obtiveram uma solubilidade de 39.9 $g.L^{-1}$ com tal metodologia. Lee e colaboradores (2007) também realizaram a solubilização da frutose em líquidos iônicos ([Emim][TfO], [Bmim][TfO], [Emim][BF4] e [Bmim][BF4]) utilizando dois métodos de solubilização, mediado ou não por água e obtiveram uma alta solubilidade de 98 $g.L^{-1}$ e 233 $g.L^{-1}$ de frutose, respectivamente.

O dióxido de carbono acima de sua temperatura e pressão críticas também é utilizado como meio reacional. Porém, o sistema com CO_2 supercrítico possui a limitação de somente solubilizar compostos apolares em níveis consideráveis. Quando se trabalha com moléculas polares há a necessidade da adição de um cosolvente para maximizar a solvatação do substrato. Šabeder et al (2005) utilizaram 2-metil 2-butanol como cosolvente em um sistema com CO_2 supercrítico para dissolver a frutose e obtiveram uma solubilidade de 23 $g.L^{-1}$. Entretanto, Habulin e colaboradores (2008) trabalharam com um sistema de dióxido de carbono supercrítico sem a adição de um cosolvente. Os autores realizaram as reações com 20 mmol de frutose. Dessa maneira, se a solubilidade total do carboidrato fosse atingida, uma solubilidade em torno de 36 $g.L^{-1}$ seria gerada, porém essas informações não foram descritas pelos autores. Segundo Habulin et al (2008), depois de decorrido o tempo reacional, o carboidrato não reagido era separado do meio reacional através de centrifugação.

2.2.6. Acetalização

A dificuldade de solubilização da frutose leva em muitos casos a uma baixa conversão e a necessidade de longos tempos reacionais (NETA et al, 2012). Uma tentativa para solucionar esse problema é a utilização de boronatos de açúcar como substrato. Esta abordagem foi utilizada com sucesso na acilação enzimática da frutose com ácido palmítico e esteárico (SCHECKERMANN et al, 1995; SCHLOTTERBECK et al, 1993). Os autores utilizaram ácido fenilborônico na formação dos boronatos de frutose para auxiliar na solubilização do carboidrato em hexano. No entanto, a síntese dos boronatos de açúcar é minuciosa, uma vez que diversos boronatos são possíveis como uma função de pH, concentração e temperatura reacional.

Outra abordagem para aumentar a solubilidade da frutose em solvente orgânico é o uso de grupos protetores nas hidroxilas do carboidrato. A síntese dos cetais é robusta e leva a um produto estável e solúvel em meio orgânico e vários métodos já foram descritos na literatura (BRADY, 1971; BELDER, 1965; CHITTENDEN et al, 1992; ASAKURA, MATSUBARA, YOSHIHARA, 1996; RAUTER, 1995). A reação consiste na formação de cetais, utilizando-se acetona e um catalisador ácido, que leva a um derivado di-O-isopropilideno. O diacetonídeo da frutose é uma cetohexose apresentado em duas formas piranosídicas como pode ser visualizado na Figura 2.6. As duas estruturas apresentadas na Figura 2.6 diferem apenas pela posição de esterificação que está diretamente relacionada a hidroxila livre.

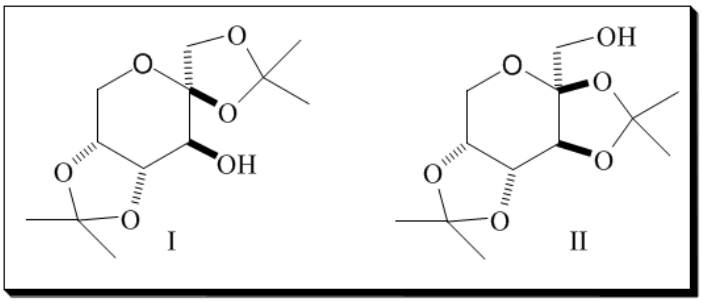


Figura 2. 6: Diacetonídeos I e II derivados da frutose.

Além de melhorar a solubilidade do carboidrato em meio orgânico a acetalização da frutose pode contribuir para a diminuição do tempo reacional necessário à enzima. Esta abordagem foi usada com sucesso na síntese de ésteres de glicose, galactose, lactose e xilose por diversos autores como pode ser visualizado na tabela 2.3.

A catálise enzimática é regiosseletiva, uma vantagem quando comparada aos métodos químicos. As lipases normalmente possuem a seletividade as hidroxilas 1 e 6 da frutose quando a esterificação direta é realizada, gerando produtos de mono e diacilação. Porém autores alegam que quanto maior a relaçao mono/diéster do produto formado, melhores são as propriedades do surfactante (SOULTANI et al, 2003). Assim a acetalização de algumas hidroxilas apresenta mais uma vantagem ao garantir a total seletividade na esterificação e consequentemente a melhoria das propriedades do tensoativo.

Tabela 2. 3: Reação enzimática de acetais de diversos carboidratos com ácidos graxos.

Substratos	Solvente	Taxa e tempo reacional	Referência
acetalização da xilose, glicose e galactose e acilação com ácidos graxos e seus respectivos metil ésteres	sistema livre de solvente	90% de rendimento em 24 horas	Fregape et al (1991)
acetalização da lactose e maltose e esterificação com ácidos graxos	tolueno ou *t*-butil acetato	77% de conversão em 30 horas	Sarney et al (1994)
acetalização da sacarose e esterificação enzimática com ácidos graxos	sistema livre de solvente e em diversos solventes	27% em 48 horas	Sarney et al (1996)
acetalização da xilose e esterificação enzimática com ácido araquidônio	sistema livre de solvente	85% de rendimento em 24 horas	Ward et al (1997)
acetalização da xilose e esterificação com diversos ácidos graxos	em *t*-butanol e em sistema livre de solvente	90% de conversão em 100 horas	Gao et al (1999)
acetalização da glicose e esterificação enzimática com ácido palmítico	mistura acetona e *t*-butanol	60% de rendimento em 80 horas	Kobayashi et al (2010)

2.3. Propriedade e aplicações éster de açúcar – Palmitato de frutose

O palmitato de frutose apresenta estrutura típica de um surfactante não iônico possuindo grupo apolar constituído de cadeia carbônica longa e um grupo não iônico em sua extremidade (Figura 2.7). É um tensoativo com alto poder emulsificante obtido através da

reação de esterificação (AKOH; SWANSON , 1994) do ácido hexadecanóico ($C_{16}H_{32}O_2$) com a frutose ($C_6H_{12}O_6$).

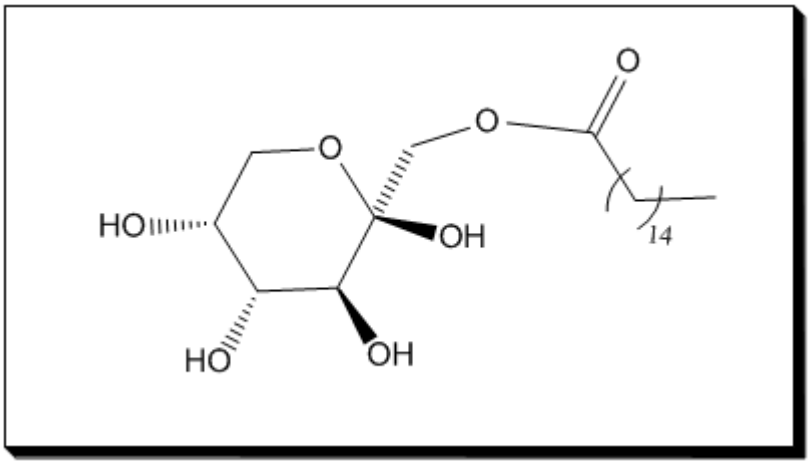


Figura 2. 7: Mono palmitato de Frutose.

Os ésteres de ácido graxos derivados de açúcares possuem uma ampla faixa de valores de balanço hidrofílico e lipofílico, HBL (Figura 2.8)**,** dependendo do tamanho da cadeia carbônica do ácido e da natureza do açúcar. Assim, alguns ésteres de frutose apresentam valores de propriedades de superfície maiores e ou iguais a alguns ésteres comerciais de sacarose. Ésteres de frutose formados por cadeias curtas, por exemplo, possuem altos valores de tensão superficial, enquanto que aqueles formados por ácidos com longas cadeias de carbono apresentam valores similares de tensão superficial aos ésteres comerciais de sacarose. Assim, dependendo do tamanho da cadeia de carbonos e da razão monoéster/diéster obtidos na síntese, a utilização de ésteres de frutose pode ser mais vantajosa do que os ésteres comerciais de açúcar (SOULTANI et al, 2003).

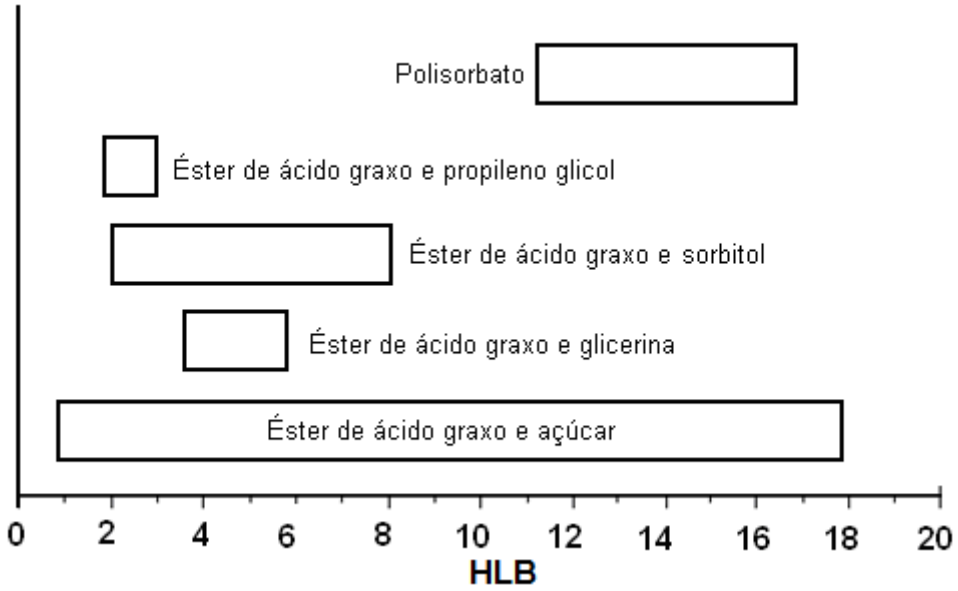


Figura 2. 8: Valores de balanço lipofílico-hidrofílico (HLB) de emulsificantes em aditivos alimentícios (YAN, 2001).

Palmitato de frutose é seguro ao consumo humano, não possui gosto, odor, toxicidade e não é irritante a pele e olhos, podendo dessa maneira, (CSÓKA, 2005 e O'BOYLE, 1986) ser utilizado em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (LORTIE, 1997; CHAMOULEAU et al, 2001). Em alimentos de maneira geral podem ser utilizados como aditivos emulsificantes em sorvetes, sopas e maioneses em substituição aos ésteres comerciais de sacarose e em cosméticos como pastas de dente, loções, shampoos e batons (ŠABEDER et al 2005).

Monoésteres de frutose também têm ação bacteriostática podendo ser utilizado na inibição da proliferação de bactérias, causadoras de cárie, possuindo grande potencialidade de aplicação em creme dental. Em um estudo realizado por Watanabe e colaboradores (2000) foi verificado que ésteres de frutose apresentam interessantes propriedades inibitórias de crescimento da bactéria *Streptococcus mutans,* causadora de cáries na presença de sacarose.

A biodegradabilidade desse surfactante é um fator preponderante a ser considerado, visto que hoje há um grande apelo pela busca de compostos ambientalmente seguros. Dessa maneira, a produção de palmitato de frutose por via enzimática possui grandes potencialidades devido a utilização de fontes renováveis, de reagentes menos nocivos ao meio ambiente e condições reacionais mais brandas quando comparada a síntese química de ésteres de ácido graxos derivados de açúcares (ŠABEDER et al, 2005).

2.4. Métodos de produção éster de açúcar – Palmitato de frutose

2.4.1. Via química

Em geral, os métodos químicos para a síntese de ésteres graxos derivados de açúcar, a maior parte deles patenteados, baseiam-se na utilização de solventes como, por exemplo, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) e piridina na presença de catalisadores alcalinos em altas temperaturas e objetivam uma eficiente esterificação ou transesterificação através de uma satisfatória solubilização dos açúcares (GLEN et al, 1955; FARONE, SERFASS, 1998; SEINO et al, 1986; CHORTYK, 2003; NOBILE, NOCE, 1966; GIBBONS, 1956; JAMES, 1977; WAGNER et al, 1991; LORAND, 1934; WAGNER, MOTTE, DEAN, 1990; MIZUTANI et al, 1973; NAKAMURA, NAKAHARA, 1990; YAMAMOTO, KINAMI, 1986; FARONE et al, 2002; PARKER, KHAN, MUFTI, 1976; MATSUMOTO, HATAKAWA, NAKAJIMA, 1991; FEUGE et al, 1973; D'AMATO, 1962; KEA, WALKER, 1987; BABAYAN et al 1960; ISABELLE, GINO, 1990; HOYDONCKX, et al, 2004; HILL, RHODE, 1999; POLAT, LINHARDT, 2001). Apesar de algumas metodologias não serem específicas à esterificação da frutose, podem ser adaptadas à reação de interesse (esterificação da frutose com o ácido palmítico) devido às semelhanças das propriedades dos substratos.

Hass e colaboradores (1959), por exemplo, desenvolveram a síntese química para obtenção de mono e di-ésteres por transesterificação que envolvia a utilização de solventes orgânicos como DMF, DMSO, ou dimetilpirrolidona (DMP) para solubilização dos substratos, sob catálise alcalina. Esse processo de síntese ficou conhecido como Hass-Snell e foi comercializado pela Day-Nippon Sugar Manufacturing Co. Ltd., no Japão em 1960 em alimentos industriais (HASS et al, 1959). Na época em alguns países como Alemanha e Estados Unidos os ésteres de ácidos graxos e açúcar eram proibidos de serem utilizados em alimentos devido a toxicidade das substâncias utilizadas em seu processo de síntese.

A reação de transesterificação realizada com esses solventes necessita da remoção de qualquer traço de água através de aquecimento do sistema sob pressão reduzida, bem como dos sub produtos de transesterificação como metanol para obtenção do deslocamento adequado do equilíbrio reacional (PARKER et al, 1976). Com esses solventes aumenta-se os custos e o tempo (FEUGE et al, 1973) operacional, pois são necessárias outras etapas de purificação do produto. A transesterificação com esse tipo de solvente necessita ainda, de um excesso de açúcar o que requer uma maior purificação do produto.

Osipow e Rosenblatt (1967) afirmam que a necessidade para a remoção de resíduos de solventes tóxicos provavelmente contribuiu para o lento progresso desta indústria e, portanto, uma micro emulsão poderia servir como uma opção viável para a solubilização dos substratos. Assim, desenvolveram um processo que envolve reação de uma micro emulsão transparente de sacarose com o éster metílico de ácido graxo na presença de propileno glicol como solvente (OSIPOW; ROSENBLAT, 1972) que ficou conhecido como processo Nebraska-Snell. Esse método baseia-se em uma micro emulsão de metil tolueno em solução aquosa de sacarose preparada com a inclusão de um adequado emulsificante na mistura reacional. Carbonato de potássio é utilizado como catalisador e a água é removida por destilação a vácuo. Uma mistura reacional marrom após o período de aquecimento na presença do catalisador é obtida como produto. Essa mistura contém de 10% a 80% de ésteres de sacarose, o emulsificante e os subprodutos da reação.

A remoção dos materiais contaminantes do produto não é difícil e a diferença de solubilidade entre eles facilita a purificação dos ésteres (Mizutani, 1973). Entretanto, os rendimentos são baixos e o grau de acilação dos ésteres obtidos não é normalmente homogêneo. Entre esses vários ésteres, os produtos mais valiosos são aqueles que apresentam um grau de substituição em uma ou duas hidroxilas, tendo um HBL equilibrado, podendo assim ser utilizados satisfatoriamente como emulsificantes. A separação desses ésteres de acordo com o seu grau de acilação é lenta e complexa (KEA; WALKER , 1987a). O custo associado da extração, também se torna um agravante, frente à baixa quantidade de mono e di-ésteres formados em algumas reações.

Kea e Walker (1987b) desenvolveram um método menos agressivo que utiliza cloretos de ácidos graxos como doadores acila em solvente anidro na presença de ácido clorídrico para produzir ésteres não tóxicos para utilização em alimentos. O procedimento reacional é iniciado com a adição lenta de ácido clorídrico a mistura de açúcar e solvente a uma temperatura entre 90 e 116 ^{0}C, após a temperatura reacional é elevada a 250 ^{0}C. A essa temperatura a reação é completa após 35 minutos. Em temperaturas inferiores (entre 30 e 55 ^{0}C) o tempo necessário é de 24 a 60 horas.

Outro método foi desenvolvido por Feuge et al. (1973) com o intuito de minimizar os problemas de purificação do produto. Feuge e colaboradores, (1973) em um processo de transesterificação em um sistema livre de solvente descreve o uso de sais de ácidos graxos de sódio, potássio ou lítio fundidos numa solução de açúcar. Esses sais são utilizados como solubilizantes e catalisadores a temperaturas entre 170 e 187 ^{0}C. Entretanto as taxas de

conversão de ésteres são baixas, o açúcar é destruído e os álcalis de metal são difíceis de serem removidos.

2.4.2. Via enzimática

O uso de lipases para produção de ésteres de açúcar e ácidos graxos, especialmente palmitato de frutose tem despertado grande interesse de pesquisadores no intuito de explorar as vantagens desta metodologia alternativa às reações químicas para síntese desses emulsificantes. Técnicas por via enzimática apresentam inúmeras vantagens, dentre elas destaca-se o aumento da seletividade, da pureza do produto, a utilização de temperaturas mais brandas e de reagentes menos nocivos e conseqüentemente a geração de efluentes mais facilmente tratáveis (THEIL; SCHICK, 1991; WONG; WHITESIDES, 1994). Várias enzimas hidrolíticas, tais como lipases e proteases em condições de baixa concentração de água, podem catalisar a reação inversa (síntese). Essas enzimas atuam na interface orgânico-aquosa, e não necessitam de co-fatores para sua atividade. Apresentam grande importância no cenário da biocatálise atual, devido a sua grande capacidade de catalisar diversas reações, além de serem estáveis tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico, com alta regio-, quimio- e enantioseletividade (CARVALHO et al, 2005).

Existem alguns fatores que influenciam a conversão em uma esterificação enzimática, tais como o doador acila utilizado como substrato, o teor de água no meio reacional, a utilização ou não de solventes, a temperatura, a concentração de lipase, entre outros. Apesar de muitos trabalhos na literatura descreverem a síntese de ésteres de frutose utilizando lipases, é difícil fazer qualquer generalização a respeito das condições ótimas de reação, uma vez que as lipases podem responder de forma distinta a mudanças no meio reacional (FREIRE et al, 2011).

Šabeder e colaboradores (2006), por exemplo, estudaram os diferentes tipos de concentrações de lipase e parâmetros como solventes orgânicos, concentração do biocatalisador e de peneira molecular, temperatura e taxa de agitação na síntese do palmitato de frutose em meio orgânico. As reações foram realizadas em reator operado em batelada sob pressão atmosférica. As melhores condições foram encontradas usando 10% (p/p de substratos) de lipase de *Candida antarctica* B (Novozym 435) e 12,1% (p/p) de peneiras moleculares a 60°C com taxa de agitação de 600 rpm. A mais alta conversão foi obtida na

presença de metil-etil-cetona (82%) seguida de 69% em acetona e 64% em *terc*-butanol em 72 horas de reação.

Nas reações de esterificação, a água é um subproduto de fundamental importância, pois o equilíbrio químico reacional em alguns casos afeta a atividade enzimática da lipase no meio. Embora a atividade de água em um sistema enzimático em meio orgânico seja baixa, pequenas variações no conteúdo de água podem provocar grandes modificações na atividade enzimática. Um nível ótimo de água no meio reacional é de fundamental importância para a atividade enzimática. Chamouleau e colaboradores (2001) estudaram o efeito da atividade de água através do uso de peneira molecular na síntese de palmitato de frutose catalisada por lipase de *Candida antarctica* em batelada. O uso de peneiras moleculares aumentou o nível de desempenho da reação devido a retirada de água do meio deslocando o equilíbrio reacional para os produtos. No entanto, a seletividade da enzima foi afetada. Segundo os autores isso se deve ao fato de que a peneira molecular retira a água do meio reacional aumentando a sua hidrofobicidade interferindo na seletividade da lipase. O melhor resultado obtido foi em um meio reacional contendo atividade de água inicial de 0,07 , com rendimento de 28,5% com um tempo reacional de 24 horas.

Já Sakaki e colaboradores (2006) realizaram a retirada da água do meio reacional através de uma coluna preenchida com zeólita NaA. Os autores submeteram o meio reacional (2-metil 2-butanol) à circulação na coluna e assim o conteúdo de água da mistura reacional diminuiu em 0,03% (p/p) melhorando a conversão de esterificação entre a frutose e o ácido palmítico. Um rendimento de 66% de mono e di-palmitato de frutose foram obtidos após 56 horas de reação catalisada pela lipase Novozym 435.

A razão molar inicial de ácido graxo e do carboidrato tem grande influência no rendimento da esterificação enzimática da frutose. Segundo Soultani, Engasser e Ghoul (2001) uma razão molar menor que 1:1 de frutose e ácido esteárico, provoca um decréscimo na conversão da esterificação. Quando a razão molar foi diminuída de 1:1 para 1:5 um decréscimo de 80 para 26% na conversão foi observado. Segundo os autores isso poderia ser atribuído a um efeito de inibição à lipase propiciado pelo doador acila ou devido a diminuição da concentração da frutose no meio. A inibição por esse substrato em baixas razões molares já foi relatada por outros autores (COULON et al, 1996; MUTUA, AKOH, 1993).

Com o intuito de minimizar os efeitos de inibição do substrato gerados à lipase, Pauly e colaboradores (2002) desenvolveram um método para síntese enzimática de oleato de frutose através de reação de transesterificação sob condição de batelada alimentada

(patenteado sob o n^0 US 6,355,455, United States Patent). Segundo os autores, para obter uma elevada concentração de produto, é preferível que não se coloque a quantidade total dos reagentes necessários no reator para iniciar a síntese e sim, introduzir de forma controlada ao longo da reação para que níveis de concentração que possam inibir a catálise da enzima não sejam atingidos.

Dang e colaboradores (2005) também estudaram em um sistema de batelada alimentada a esterificação da frutose com ácido oleico em *t*-butanol catalisada pela enzima imobilizada de *Rhizomucor miehei*. Uma mistura de mono e di-éster foram obtidas como produto com uma conversão em torno de 93% em 200 horas de reação.

Devido às diferenças entre as polaridades, os solventes diferem em seu coeficiente de partição (log de P), que é relação das concentrações do solvente em uma fase orgânica e uma fase aquosa. As diferenças do log de P dos solventes têm sido utilizadas para explicar o seu efeito sobre a atividade catalítica e especificidade de enzimas (LORTIE, 1997; LU et al, 2009). Porém, um solvente fortemente hidrofóbico nem sempre é a melhor opção para a esterificação enzimática de carboidratos porque esses substratos possuem caráter hidrofílico e consequentemente possuem uma baixa solubilidade nesses meios e isto pode afetar adversamente o rendimento reacional (CHANG; SHAW, 2009; DEGN et al, 2001).

Assim, Olive e colaboradores (2012) realizaram a catálise enzimática de laurato de frutose em solventes com diversos valores de log de P (log P = 3,5, 0,89, 0,71, 0,68, 0,35, -0,23 e -0,33). O melhor rendimento obtido foi em 2-metil 2-butanol (78% em 48 horas de reação) com um coeficiente de partição de 0.89 que segundo os autores ocorrera devido a boa solubilização obtida em tal solvente.

Um sistema livre de solvente é desejável para a síntese de ésteres de ácidos graxos derivados de açúcar devido a minimização do custo, melhoria da segurança operacional e biocompatibilidade com alimentos, cosméticos e aplicações farmacêuticas (FORESTI, et al, 2007). Entretanto, como anteriormente mencionado na seção 2.2.5, a baixa solubilidade da frutose no meio reacional é um obstáculo significativo para a esterificação em condição livre de solvente, necessitando de um longo tempo reacional para a obtenção de boas taxas de conversão. Pyo e Hayes (2009), por exemplo, em sistema livre de solvente precisaram de 13 dias de reação para obter uma conversão de 80% na esterificação da frutose com ácido oléico catalisada pela enzima imobilizada de *Rhizomucor miehei* em sistema de batelada.

Ye e Hayes (2012) também necessitaram de um longo tempo reacional para realizar a esterificação da frutose, sacarose, glicose ou xilose com ácido oleico, caprílico, láurico ou

mirístico catalisada por lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* em um sistema livre de solvente. Segundo os autores, as reações eram realizadas em uma suspensão de carboidrato em oleato de frutose, não sendo necessária a solubilização total dos substratos para se iniciar a reação. Dessa maneira, um tempo reacional de 132 horas foi necessário para obter um rendimento de 86,1% de oleato de frutose.

Neta e colaboradores (2011) utilizaram um planejamento fatorial associado a análise de superfície de resposta, para maximizar os resultados de conversão da esterificação enzimática da frutose com ácido oléico em batelada catalisada pela lipase de *Candida antarctica* B. Temperatura, agitação e tempo foram as variáveis avaliadas no planejamento. Planejamento de experimentos é uma ferramenta que tem por objetivo otimizar uma determinada resposta com a utilização do menor número de experimentos possível. É uma técnica usada para se planejar experimentos, ou seja, para definir quais dados, em que quantidade e em que condições devem ser coletados durante um determinado experimento. As condições de ensaio utilizadas pelos autores foram 0,5 mmol de ácido graxo, 0,6 mmol de frutose, 12,5 mg da lipase, 0,1 g de sulfato de sódio anidro e 0,6 mL de etanol e uma conversão de 88,4% foi obtida nas condições ótimas de reação (57,1 ^{0}C, 100 rpm e 37,8 horas).

2.5. Sistemas Microemulsionados

As microemulsões (MEs) são soluções líquidas formadas pelas fases aquosa e orgânica (também dita oleosa), termodinamicamente estabilizadas pela presença de tensoativos, e em alguns casos, co-tensoativos. Elas podem ser definidas como sistemas coloidais que ao contrário das emulsões, não necessitam de fornecimento de energia para sua formação (JOHNS; HOLLINGSWORTH, 2007). A fase dispersa consiste em pequenas gotas com diâmetro variado de 5 a 120 nm, constituindo um sistema opticamente transparentes (LAWRENCE; REES, 2000).

As MEs podem ser, O/A (fase aquosa em maior quantidade), A/O (fase orgânica ou oleosa em maior quantidade) e estruturas bicontínuas em que água e óleo estão separados por uma monocamada de tensoativo (CORREA et al, 2005). Uma representação esquemática dos tipos de microemulsão pode ser visualizada na Figura 2.9.

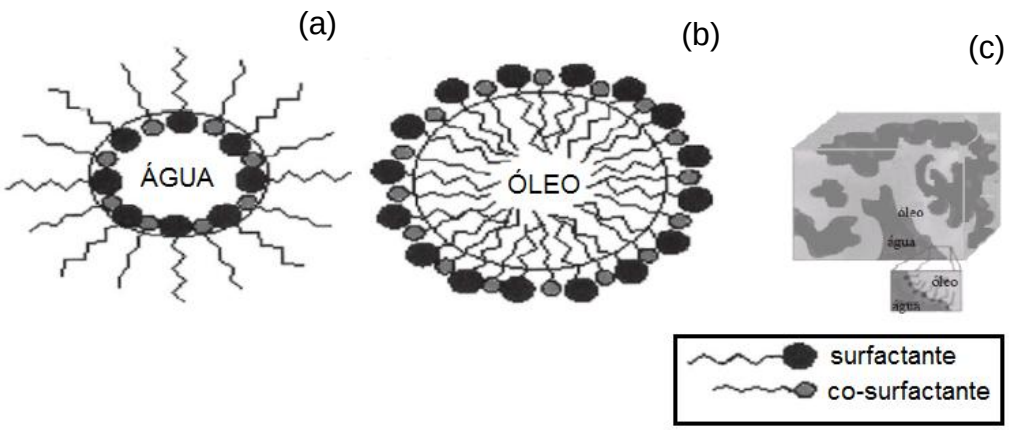


Figura 2. 9: Representação estrutural de uma microemulsão A/O (a), O/A (b) e bicamada (c). (OLIVEIRA et al, 2004).

A orientação para os sistemas A/O ou O/A é dependente do seu equilíbrio lipofílico/hidrofílico determinada não somente pela estrutura química do tensoativo e/ou co-tensoativo utilizado, mas também por outros fatores como temperatura e força iônica do sistema. A mistura de tensoativos com equilíbrio hidrófilo-lipófilo (HBL) adequado proporciona a condição máxima de solubilização das fases orgânica e aquosa. Dessa maneira, a formação de MEs é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo e do óleo, das proporções água/óleo e da relação entre as proporções tensoativo/co-tensoativo (FORMARIZ et al, 2005).

Dentre as microemulsões A/O, destacam-se as micelas reversas, as quais apresentam grande interesse biotecnológico devido a possibilidade de solubilizar ou dissolver biocatalisadores, proporcionando reações químicas com enzimas imobilizadas ou livres em ambientes aquo restritos (AIRES-BARROS, 2002).

2.5.1. Lipases em Micelas Reversas

2.5.1.1. Aspectos gerais

Micelas reversas (Figura 2.10) consistem em microemulsões onde moléculas de surfactantes se agregam e se organizam em solventes apolares de modo a incorporarem água em seus cernes. Estruturalmente elas consistem em um núcleo aquoso formado pela interação da cabeça polar do surfactante que o rodeia interagindo com o solvente orgânico (apolar), através de sua extremidade hidrofóbica (longa cadeia carbônica linear ou ramificada).

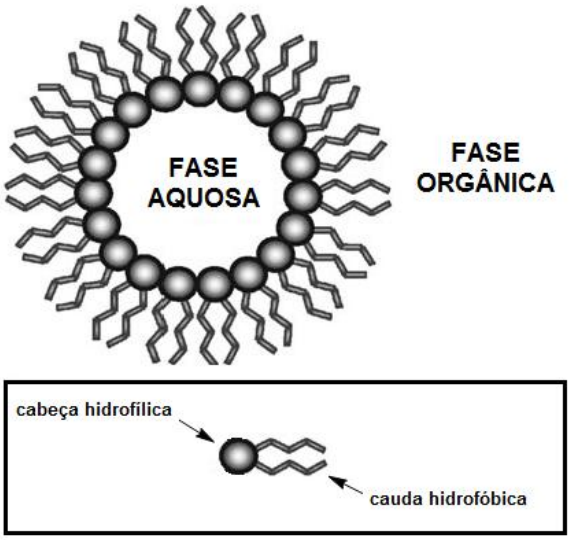


Figura 2. 10: Micela reversa. Adaptado de Bhattacharyya, (2008).

As enzimas têm sido tradicionalmente usadas em meio aquoso, mas as micelas reversas contendo enzima tornaram-se uma proposta atraente, por exemplo, em reações de esterificação onde um baixo teor de água é necessário (KLIBANOV, 2001). Em outras reações, quando substratos e/ou produtos são hidrofóbicos, a solubilidade do substrato, como triglicerídeo ou ácido graxo, pode ser notavelmente melhorada em um solvente orgânico (NAGAYAMA et al, 1996). Além disso, a característica principal das lipases reside no fato delas atuarem na interface lipídio/água (ou na interface solvente apolar, como isooctano/água) e de não atuar no interior da fase orgânica (ZOUMPANIOTI et al, 2006) tornando-se evidente que a atividade lipásica pode ser aumentada pela sua incorporação em micelas reversas. Existem inúmeras vantagens da utilização de micelas reversas em biocatálise (Tabela 2.4).

Tabela 2. 4: Vantagens da utilização de micelas reversas em biocatálise (CARVALHO; CABRAL, 2000).

- Reações colaterais como hidrólise, polimerização ou outras são minimizadas.
- Aumento da área interfacial de contato (10–100 $m^2.mL^{-1}$).
- Agregação de enzimas é evitada.
- Micelas são reconhecidas como modelo de estruturas biológicas.
- Solubilizam ambos substratos/produtos hidrofóbicos e hidrofílicos.
- Pequenos volumes reacionais são necessários.
- Micelas reversas possuem relativamente uma estrutura ordenada.
- Processos sintéticos são favorecidos devido à mudança de equilíbrio termodinâmico de troca intermicelar.
- Altas concentrações de substratos são possíveis.
- Atividade e/ou estabilidade podem ser aumentadas.
- Controle rigoroso da quantidade de água.
- Micelas reversas formam-se espontaneamente, atingindo um equilíbrio em um curto espaço de tempo.
- Estabilidade térmica é frequentemente reforçada em meios com pouca água.
- As dimensões da cavidade interna podem ser facilmente alteradas.
- As soluções são opticamente transparentes permitindo o uso de técnicas espectroscópicas.

Estas nanopartículas podem ser formadas pelo uso de surfactantes neutros (RUCKENSTEIN; KARPE, 1991) como Brijs e Tweens, por exemplo, catiônicos (sais de amônio quaternários de cadeias longas) ou aniônicos, como o bis(2- etilexil) succinato de sódio o Aerossol OT, AOT ou também conhecido como docusato de sódio (DE; MAITRA, 1995; SHIOMORI et al, 1996). Todos eles em solventes apolares contendo pequenas quantidades de água. Além deles têm sido usado o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB ou CTAC) catiônico, e a lecitina (neutro). Os principais surfactantes utilizados em micelas reversas são apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2. 5: Surfactantes e seus respectivos solventes utilizados normalmente na formação de microemulsões óleo/água (STAMATIS et al, 1999).

Surfactante	Sistema de solvente
Bis-(2-etilhexil) sulfoccionato de sódio AOT	n-hidrocarbonetos (C5-C16) Isooctano Cicloexano Benzeno
Brometo de cetiltrimetil amônio CTAB	Heptano: clorofórmio n-hidricarbonetos: alcoóis primários
Polietileno glicol monododecil éters $C_{12}E_n$(n=3-5; E=éter)	n-hidrocarbonetos (C6-C12)
Fosfatildicolina Fosfatidiletanolamina	n-hidrocarbonetos (C6-C12)

Embora vários surfactantes tenham sido utilizados na formação de micelas reversas na síntese enzimática de diferentes compostos, não há um consenso na literatura acerca da melhor classe a ser aplicada, visto que a formação e estabilidade deste sistema depende das características físicas e químicas de ambas as fases componentes, da concentração de surfactante, do pH do tampão utilizado entre outras (RUCKENSTEIN; KARPE, 1991).

No entanto, o AOT (Figura 2.11) é um dos surfactantes mais comumente utilizados em estudos enzimáticos em micelas. Este surfactante, solubiliza uma grande quantidade de água em uma ampla faixa de solventes que inclui alcoóis alifáticos como octanol, decanol, solventes aromáticos como benzeno e xileno, bem como alcanos como n-heptano, cicloexano, isooctano, sem a necessidade de co-solventes (OLDFIELD, 1994). Ele apresenta inúmeras vantagens na utilização em micelas reversas como agregação espontânea, estabilidade termodinâmica, a não necessidade de adição de co-surfactantes, além da ampla possibilidade de concentrações utilizadas.

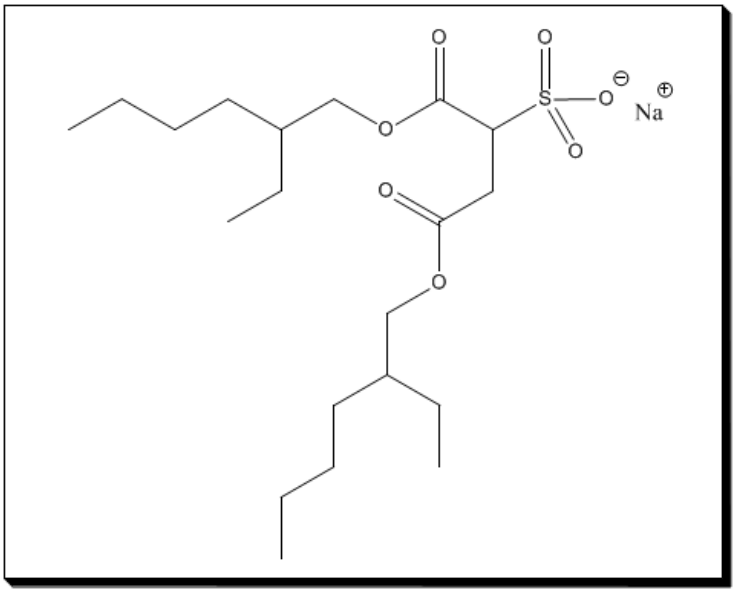


Figura 2. 11: Tensoativo bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio (AOT).

Levando em consideração que as microemulsões são sistemas formados por três componentes: fase aquosa, fase oleosa e um surfactante ou uma mistura de surfactante/co-surfactante o diagrama de fases permite definir a extensão das fases formadas. Um diagrama de fases típico formado por água, AOT e isooctano é mostrado na figura 2.12, para um sistema água/óleo. A existência de soluções transparentes isotrópicas (microemulsão) de AOT/água/óleo pode ser visualizada em uma grande região no lado rico em isooctano. Segundo De; Maitra (1995) a área da secção transversal do núcleo hidrófobico do AOT e o comprimento da cadeia hidrofóbica facilitam a formação de agregados micelares em AOT/isooctano.

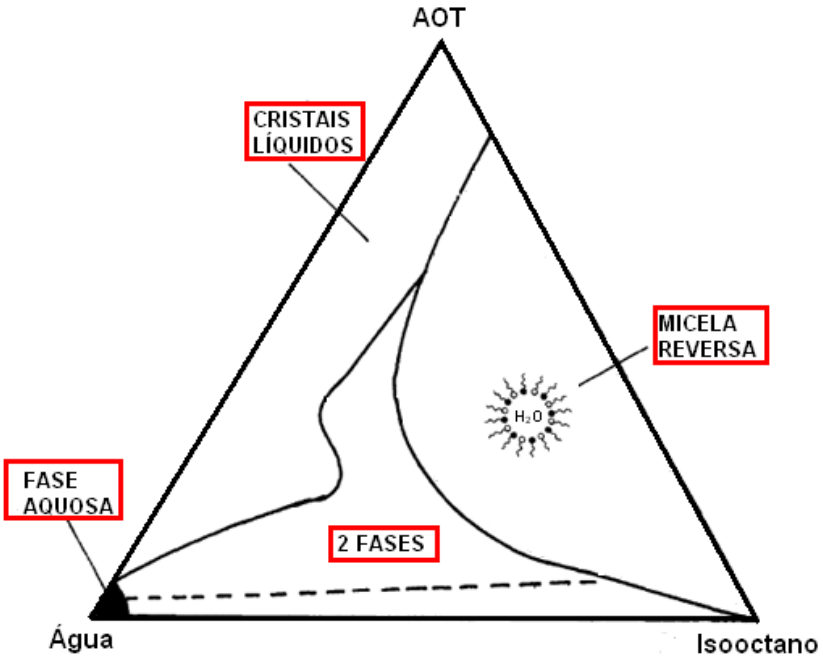


Figura 2. 12: Representação esquemática diagrama de fases do sistema AOT/isooctano/água (adaptado de DE; MAITRA, 1995).

O tipo de surfactante utilizado para formar a micela reversa pode influenciar a atividade da enzima (USKOKOVIĆ, DROFENIK, 2007). Os surfactantes desempenham um papel importante na formação da interface do nanoreator, essencial para a atividade biocatalítica das enzimas. Assim, De Maria et al (2004) estudaram a importância de dois surfactantes na síntese enzimática de laurato de propila e oleato de heptila em micela reversa e observaram que o uso da lecitina para a formação do sistema gerou melhores resultados do que as realizadas com AOT. Segundo os autores, isso poderia ser atribuído ao efeito tóxico que o AOT exerce sobre as lipases de *Candida rugosa*, como previamente reportado por Del-Val e Otero, (1998). Entretanto, Rees et al. (1995) compara a atividade de cinco lipases de origem microbianas em diferentes microemulsões e verifica que a atividade de lactonização foi maior em AOT do que em CTAB. Fletcher e Robinson (1985) também chegaram a tal conclusão depois de realizarem um estudo de hidrólise de *p*-nitrofenilesteres de ácidos graxos em micelas reversas formadas por CTAB e AOT.

Recentemente, o nosso grupo estudou a esterificação de (R,S)-1,2-*O*-isopropilideno glicerol com ácido esteárico catalisada por *Candida antarctica* imobilizada em micelas reversas onde foram observados melhores rendimentos nas reações realizadas com micelas formadas com AOT do que com lecitina (ITABAIANA et al, 2013b).

2.5.1.2. Solubilização de proteínas em micelas reversas

Micelas reversas possibilitam a enzima de se localizarem em um microambiente compatível com a sua conformação nativa ou intracelular e assim permitindo com que haja uma continuidade ou até melhoria em sua atividade catalítica. Enzimas solúveis em água tendem a se localizar no interior do núcleo aquoso da micela sendo protegidas do efeito prejudicial do solvente orgânico (Figura 2.13a). As enzimas, especialmente as lipases, podem ao mesmo tempo, interagir com a camada superficial das micelas, ou até mesmo ser parcialmente agregada a ela (Figura 2.13b). A enzima também pode entrar em contato com o solvente orgânico como visualizado na Figura 2.13c (CARLSON; NAGARAJAN, 1992). A taxa de troca de elétrons hidratados é menor quando as enzimas se localizam na interface micelar do que aquelas que se localizam no núcleo. A localização da enzima pode ainda afetar o tamanho da micela reversa e consequentemente a atividade catalítica da enzima (PILENI et al, 1985).

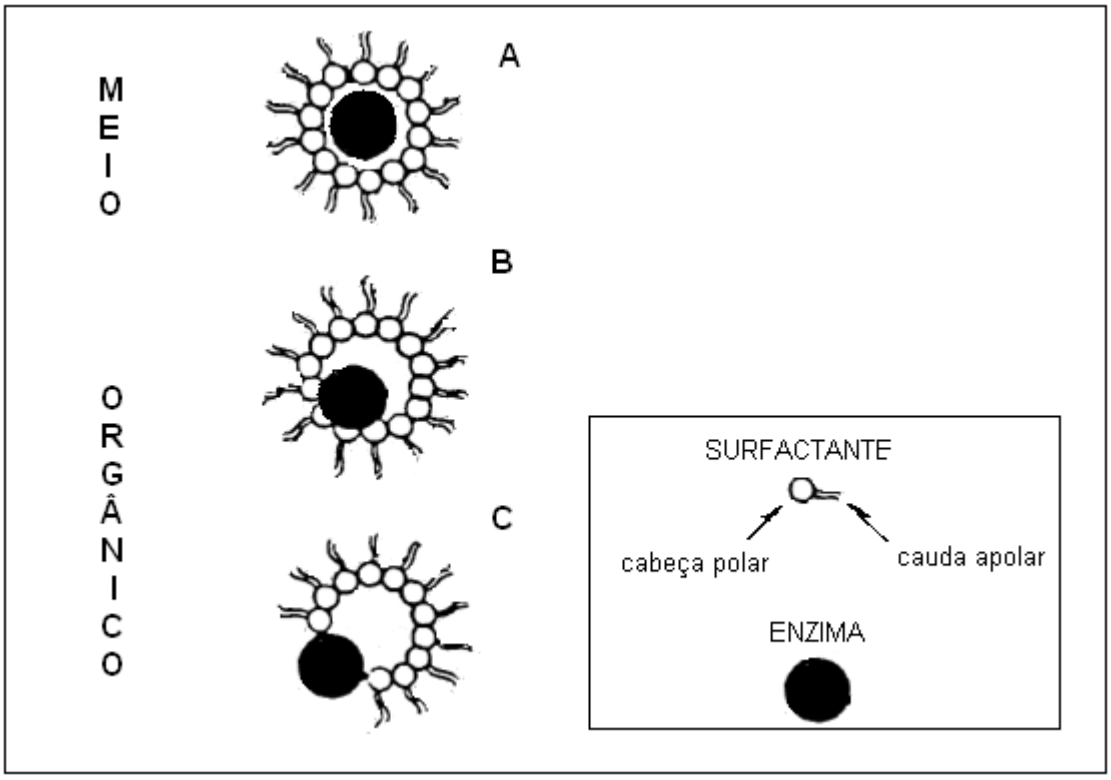


Figura 2. 13: Localização da enzima na micela reversa. (a) enzima hidrofílica, (b) enzima ativa na superfície, (c) enzima na membrana (adaptado de CARLSON; NAGARAJAN, 1992).

As enzimas quando microencapsuladas estão protegidas dos efeitos deletérios do solvente, pois se localizam no interior das micelas reversas, podendo ou não interagir com a

interface micelar dependendo da espécie enzimática (PILENI et al, 1985). As diferenças observadas no comportamento dos tipos de lipases sobre a sua especificidade foi atribuída a várias formas e teorias de solubilização da enzima na micela reversa (PAPADIMITRIOU et al, 1995). Papadimitriou e colaboradores (1995) em um estudo estrutural mostraram que na formação de micelas reversas com as Lipases de *Penicillium simplicissimum*, por exemplo, as enzimas localizam-se perto da camada do surfactante, enquanto lipases da espécie *Rhizopus* mais próximas do centro, da água. Nesse mesmo estudo os autores atribuíram a localização da molécula da enzima no sistema de microcompartimento da micela reversa como a responsável pela especificidade apresentada para diferentes substratos que não existia ou diferia, quando a reação era catalisada por lipases em outros meios.

2.5.1.3. Encapsulamento da enzima

Enzimas têm sido encapsuladas em micelas reversas por três metodologias formando uma solução opticamente transparente. Entre elas a técnica de injeção é a mais utilizada, devido a sua maior simplicidade de procedimento, menor tempo necessário e preciso controle de água na solução micelar. Ela consiste na injeção de uma solução aquosa de enzima numa solução de surfactante em solvente orgânico. A incorporação da enzima no núcleo aquoso é quase instantânea e requer apenas agitação por alguns segundos (MOULIK; PAUL, 1998).

A transferência de fase é outra técnica, que envolve a passagem de uma solução aquosa de enzima a uma solução de tensoativo-solvente de mesmo volume. Esta técnica foi sugerida e utilizada por Luisi e colaboradores (1979). O tempo de duração para a realização do equilíbrio e a incapacidade de controlar o grau de hidratação da solução micelar resultante são os principais problemas enfrentados nessa técnica.

Uma terceira técnica, de dissolução desenvolvida por Menger; Yamada (1979) consiste na adição de uma preparação liofilizada de enzima com surfactante em solvente orgânico com grau de hidratação desejado. O grau de hidratação das micelas é inversamente proporcional ao tempo de encapsulamento da enzima. Martinet et al (1986) realizaram um estudo provando que é possível alcançar uma solubilidade de 25 $mg.L^{-1}$ da enzima quimotripsina nas micelas reversas se a solução de enzima for colocada em contato com a solução micelar inúmeras vezes. Esta técnica de dissolução caiu em desuso devido à rápida desnaturação das proteínas que ocorre durante o processo de encapsulamento. Outra desvantagem deste método é que a maioria das enzimas não é disponível na forma liofilizada.

Matzke et al (1992) compararam as propriedades de solubilização de quimotripsina e álcool desidrogenase (LADH) em micelas reversas em meio orgânico pelas três diferentes técnicas de solubilização. Relataram que quando uma solução aquosa de enzima é injetada, sua solubilização não é fortemente dependente do tamanho da micela, ao contrário da dissolução de uma enzima em pó, onde ela não solubiliza completamente até que o diâmetro da micela reversa seja semelhante à da enzima. Mostrando, assim, que a capacidade de solubilização depende do método usado de adição da enzima. Para a solubilização de quimotripsina através da técnica de transferência de fase com um surfactante positivamente carregado seguiu-se as esperadas interações eletrostáticas, porém quando utilizado surfactante com carga negativa, em baixo pH, a sua solubilização não se adequou nesse mecanismo de interação eletrostática.

2.5.2. Imobilização da micela em organogel

Os surfactantes utilizados na formação das micelas reversas dificultam a aplicação desse meio na prática. Isso porque a presença dos surfactantes interfere na separação dos produtos e reagentes do meio reacional por métodos usuais de extração e destilação, devido à formação de emulsões e espuma. A recuperação dos produtos da mistura de reação, bem como a regeneração da enzima é um entrave a ser vencido. Dessa maneira a imobilização das microemulsões em uma matriz gelatinosa torna-se uma alternativa viável visando a aplicabilidade industrial.

As microemulsões podem ser aprisionadas em matrizes gelatinosas através de agentes geleficantes derivados de celulose ou ágar. Esses geleficantes formam um sistema sólido ou semi sólido poroso que permite a difusão de solventes entre seus canais. Quando esse solvente é água eles são chamados de hidrogeles e quando é um solvente apolar são chamados de organogeles (ZOUMPANIOTI et al, 2010).

As primeiras publicações do preparo de uma microemulsão suportada em organogel foram em 1986 por Haering e Luisi, pela mistura de uma solução aquosa de gelatina acima da temperatura de gelificação que quando resfriada produzia um gel transparente que tinha propriedades físicas reprodutíveis.

Lipases em microemulsões e imobilizadas em gel mantêm sua estabilidade e atividade catalítica por longos períodos. Além disso, a matriz gelatinosa retém totalmente o surfactante, a água e os componentes da enzima permitindo a difusão dos substratos apolares ou produtos

entre o solvente orgânico e os *pellets* do gel (REES et al, 1991). Entretanto, alguns inconvenientes como a baixa estabilidade térmica e mecânica e baixa resistência em ambientes hidrofílicos levaram ao uso de outros biopolímeros como os derivados de celulose (DELIMITSOU et al, 2002). O hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um desses derivados de celulose que mantém a atividade catalítica da enzima mesmo em temperaturas acima de 50 ^{0}C (ZOUMPANIOTI, et al, 2008). Pastou et al (2000) realizaram a esterificação entre propanol e ácido láurico catalisada por lipases de *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica* imobilizadas em organogéis e observaram que a taxa reacional era maior na imobilização em HPMC do que em agar devido à maior difusibilidade dos substratos nessa matriz (BLATTNER et al., 2006). Outra vantagem é a integridade estrutural do HPMC que segundo alguns autores, se mantêm estável em solventes apolares por mais tempo (DELIMITSOU et al, 2002; BLATTNER et al, 2006; PASTOU et al, 2000).

Esses polímeros compatíveis ou biopolímeros (organogel) utilizados para o aprisionamento de microemulsões estão sendo usados em meios não convencionais sendo rígidos e estáveis mesmo permanecendo por um longo tempo no meio reacional. O uso do organogel nas matrizes de imobilização enzimática apresenta a vantagem da ¨dupla¨ imobilização da enzima, ou seja, primeiro na micela reversa (microemulsão) e em segundo lugar no sistema polimérico (ZOUMPANIOTI et al, 2010).

2.6. Reatores enzimáticos

As enzimas imobilizadas são empregadas em reatores, normalmente similares aos utilizados em catálise química (CAO, 2005). Esses reatores quando operados com células, enzimas ou organelas são definidos como biorreatores. O reator enzimático, portanto, é um biorreator no qual a catálise é realizada por uma enzima.

Os reatores enzimáticos dividem-se em dois grandes grupos: os contínuos e os descontínuos (batelada). Quando se dispunha apenas de enzimas livres, nos primeiros processos enzimáticos, o único tipo de reator utilizável era o de batelada. Entretanto, com o avanço da tecnologia de membranas e de imobilização de enzimas, tornou-se possível a utilização de outros tipos de reatores. Em alguns casos, os reatores em batelada são operados de forma semi-contínua através da retirada intermitente de parte do meio reacional e adição de uma nova solução de substrato. Quando há entrada e saída contínua de fluido do tanque reacional, ele é considerado um reator agitado contínuo. Os tipos de reatores podem ser observados na Figura 2.14.

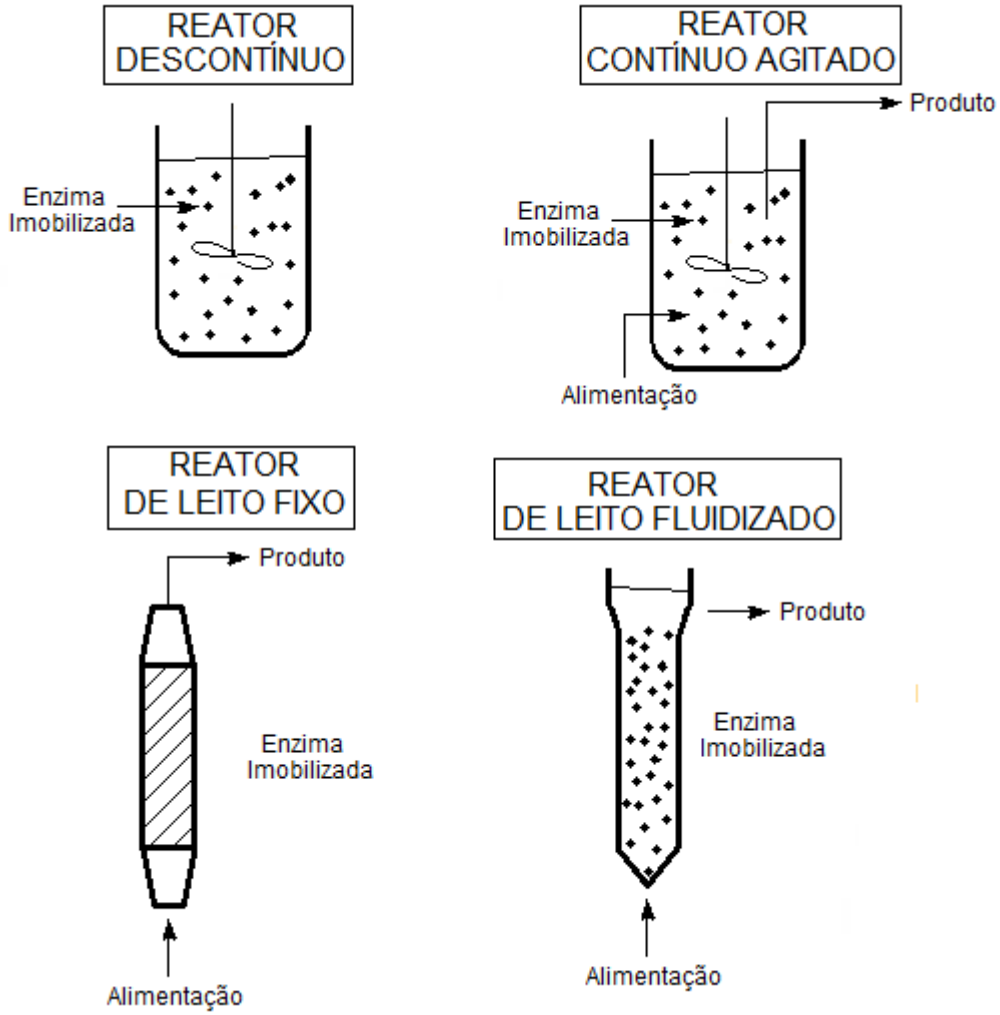


Figura 2. 14: Tipos de reatores enzimáticos (RIBEIRO, 1989).

A escolha inadequada do reator pode provocar prejuízos à atividade do biocatalisador como por exemplo o cisalhamento do suporte de imobilização. Desta forma, é importante escolher o melhor reator que permita uma boa atuação da enzima no processo reacional (CAO, 2005). Segundo Schimidell et al (2001), fatores como reutilização da enzima, uso, custos e requisitos operacionais devem ser considerados quanto à escolha de um determinado tipo de reator para enzimas imobilizadas.

2.6.1. Reatores descontínuos

Em um reator em batelada o substrato e a enzima são introduzidos simultaneamente no início da reação. O reator em batelada pode ser usado em processos onde terminada a reação a

enzima imobilizada pode ser separada da mistura final com relativa facilidade através de um processo de filtração e/ou decantação, por exemplo.

As principais vantagens do uso do reator em batelada é a melhor eficiência da transferência de massa devido à agitação do sistema, controle de contaminação e adequação flexível a variações das características da matéria-prima.

Esse tipo de reator possibilita a adequação do seu sistema de agitação sendo dessa maneira, indicado para o uso em processos que apresentam solução de alta viscosidade (ZANIN, 1989).

2.6.2. Reatores contínuos

O uso de lipases livres em reator batelada, pode em alguns casos trazer prejuízos ao processo devido ao alto custo do biocatalisador necessitando de reciclo para minimizar essas perdas. Quando o biocatalisador é imobilizado e utilizado em sistema em batelada apresenta a desvantagem da susceptibilidade ao cisalhamento devido aos efeitos da agitação causando a lixiviação da proteína ao meio reacional, minimizando as taxas reacionais nas reações subsequentes (HARTMANN; JUNG, 2010). Assim, os reatores contínuos são alternativas atraentes para minimizar esse tipo de problema.

Reatores contínuos são os que operam o tempo todo com entrada de alimentação e saída de produto. O uso do reator de fluxo contínuo tem ganhado cada vez mais importância na síntese orgânica como uma ferramenta para o desenvolvimento de novas metodologias de reação.

As reações realizadas em condições de fluxo contínuo, em particular o leito fluidizado, também podem gerar alguma lixiviação de proteína (BORNSCHEUER, 2003). Assim, o uso do leito fixo se torna a melhor escolha para minimizar esse efeito, visto que não há a movimentação do biocatalisador.

Este tipo de reator é constituído por um leito com o biocatalisador imobilizado e uma bomba peristáltica que leva o reagente através da coluna sob um fluxo específico que determina o tempo de reação de acordo com o volume da coluna (Figura 2.15).

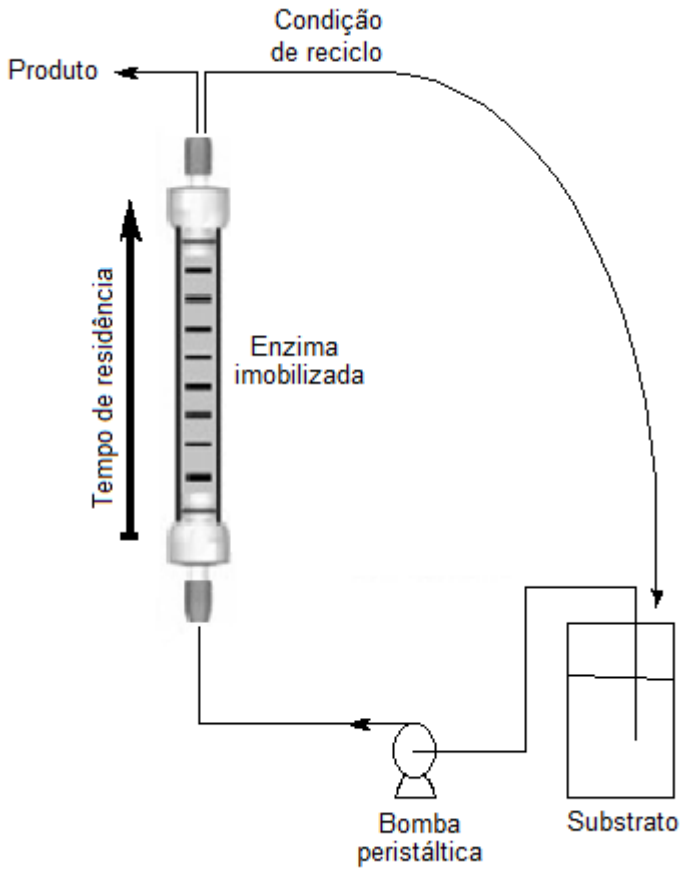


Figura 2. 15: Esquema operacional de reator enzimático de fluxo contínuo de leito fixo.

Reações de esterificação na busca de ésteres de frutose tem sido uma importante aplicação dos reatores de leito fixo. Pyo e Hayes (2009) desenvolveram um método para a esterificação contínua de frutose com ácido oléico catalisado por lipase sem solvente que foi comparado a um sistema em batelada. No entanto, a taxa de reação do sistema contínuo (84,4% em 27 dias de recirculação) foi menor quando comparado ao sistema em batelada (80% em 13 dias de reação), devido às baixas concentrações de frutose. Já Ye e Hayes, (2011 e 2012) em dois trabalhos consecutivos afirmaram que tanto a conversão quanto a taxa de esterificação para a produção de oleato de frutose em fluxo contínuo foi melhor do que em batelada (92,6 % e 92,3% de rendimento em 132 horas de recirculação para o trabalho de 2011 e 2012, respectivamente).

Devido, principalmente, à melhor e mais fácil automatização e operação, assim como elevada produtividade, reprodutibilidade, segurança e controle de processo (KIRCHNING et al, 2006), uma maior atenção tem sido dada nos últimos anos aos processos biocatalíticos envolvendo fluxo contínuo em alternativa aos processos em batelada (ITABAIANA et al, 2013). Entretanto, para se certificar se há vantagem de substituir os processos em batelada

pelo contínuo, é necessária uma avaliação criteriosa em relação ao custo e a produtividade gerada pelo sistema (RAO et al, 2009).

CAPÍTULO 3
MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os solventes heptano, tolueno, *terc*-butil metil éter (TBME) e *para*-cimeno foram adquiridos da Sigma Aldrich e utilizados sem tratamento prévio, exceto aqueles empregados nas reações em micela reversa que foram secos em sulfato de sódio anidro.

Os substratos utilizados foram:

- ácido palmítico (AP) (Vetec);
- resíduo de ácido graxo oriundo do refinamento de óleo de palma (RAG) (AGROPALMA);
- 2,3:4,5-O-diisopropileideno-b-D-frutopiranose o diacetonídeo da frutose sintetizado (DAF).

Para as reações catalisadas pela enzima imobilizada em micela reversa foi utilizado o bis (2-etilhexil)sulfosuccinato de sódio (AOT) adquirido da Fluka, Basel, Switzerland e hidroxi-propil-metil celulose (HPMC) (3500–5600 cP) da Sigma Aldrich, Brasil.

3.1.1. Enzimas

As enzimas comerciais utilizadas na primeira etapa do trabalho foram lipase de *Rhizomucor miehei* livre (RML) e imobilizada (RM IM) – Novozymes, lipase B de *Candida antarctica* livre (Cal B) – Novozymes, Novozym 435 imobilizada (435) – Novozymes, lipase de *Thermomyces lanuginosus* livre (TLL) – SIGMA e imobilizada (TL IM) - Novozymes, lipase de *Burkholderia cepacia* livre (PSL) – SIGMA e imobilizada (PS IM) – Amano.

Na segunda etapa, as reações de esterificação realizadas com o biocatalisador em micela reversa imobilizado em organogel, a lipase B liofilizada de *Candida antarctica* (Cal B) da Novozymes foi utilizada.

3.2. Métodos

3.2.1. Síntese de 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (diacetonídeo da frutose - DAF)

Com o intuito de aumentar a solubilidade da frutose em meio orgânico, quatro hidroxilas da molécula de frutose foram protegidas. Para tal, em um reator de 2000 mL foram adicionado 30 g (44,8 mmol) de açúcar comercial (sacarose) e 400 mL acetona e agitado vigorosamente (agitação mecânica) a 5 ^{0}C por 15 minutos. Foram adicionados lentamente ao meio reacional 16 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. A solução foi mantida sob agitação por 150 minutos. Após, a solução foi resfriada (0-10^{0}C) em banho de gelo e neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) 50% (p/V) – pH final ajustado com solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). A mistura foi filtrada em papel para retirada do carbonato de sódio e açúcar não reagidos, posteriormente rotaevaporada a 55^{0}C (FERREIRA et al, 2001; RIANELLI, 2006).

O xarope formado foi diluído com 400 mL de diclorometano. Após foram adicionados 200 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 M e agitado vigorosamente durante 120 minutos. A fase orgânica foi separada e lavada com bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), água e seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). O solvente foi evaporado a vácuo até a obtenção de um sólido branco o qual foi recristalizado em hexano, com filtração à quente em carvão ativo.

3.2.2. Teste de solubilidade do DAF e da frutose em solventes orgânicos

Com o intuito de comparar a solubilização do DAF com a frutose foram realizados testes de solubilidade em diferentes solventes orgânicos. Para tal uma massa de substrato correspondente a 100 mM e 200 mM de DAF e frutose foi colocada em cada *criotubo* e agitados em vórtex por 1 minuto em temperatura ambiente com 1 mL do referido solvente. A solubilidade era avaliada através de análise visual após dissolução ou não dos substratos em cada solvente por um tempo médio de 10 minutos.

3.2.3. Reutilização da enzima

Ao final da reação a enzima era filtrada em papel e lavada com 30 mL do referido solvente 3 vezes para ser testada na próxima reação, podendo assim verificar o número de vezes que o biocatalisador pode ser utilizado com satisfatória conversão. As enzimas comerciais imobilizadas eram secas na estufa durante 2 horas a 40°C enquanto que a Cal B em micela reversa imobilizada em organogel permanecia durante o mesmo período a temperatura ambiente.

3.2.4. Aumento de Escala e Estudo da Influência de um Reator de Tanque agitado na esterificação do DAF

A esterificação do DAF, previamente realizada em sistema de batelada com agitação magnética foi investigada em um reator de batelada de tanque agitado (CSTR) Easy Max (Mettler Toledo). Nesta etapa, 100mL de uma solução (1:1) de substratos (ácido palmítico e DAF – 32.5 mM em n-heptano) foi previamente preparada e adicionada no reator submetido a temperatura de 75°C, 300 rpm de agitação, 15% (p/p) da lipase RM IM. As reações foram realizadas em duplicata por um tempo reacional máximo de 24 horas.

3.2.5. Dessorção da enzima Rhizomucor miehei de seu suporte

A lipase de *Rhizomucor miehei* foi retirada de seu suporte através de metodologia modificada descrita por Cabrera et al (2009), para a enzima Novozym 435 e reproduzida por Costa et al (2011). Para tal, 1g de RM IM foi colocada em contato com 50 mL de tampão fosfato 25 mM, pH 7,0, contendo 2,5% (v/v) de Triton X-100. O sistema foi submetido a agitação orbital de 150 rpm durante 4 horas. A suspensão foi filtrada a vácuo, sendo o sobrenadante submetido a ensaio de quantificação de proteínas através do método de Bradford (1976). A concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (BSA, Sigma).

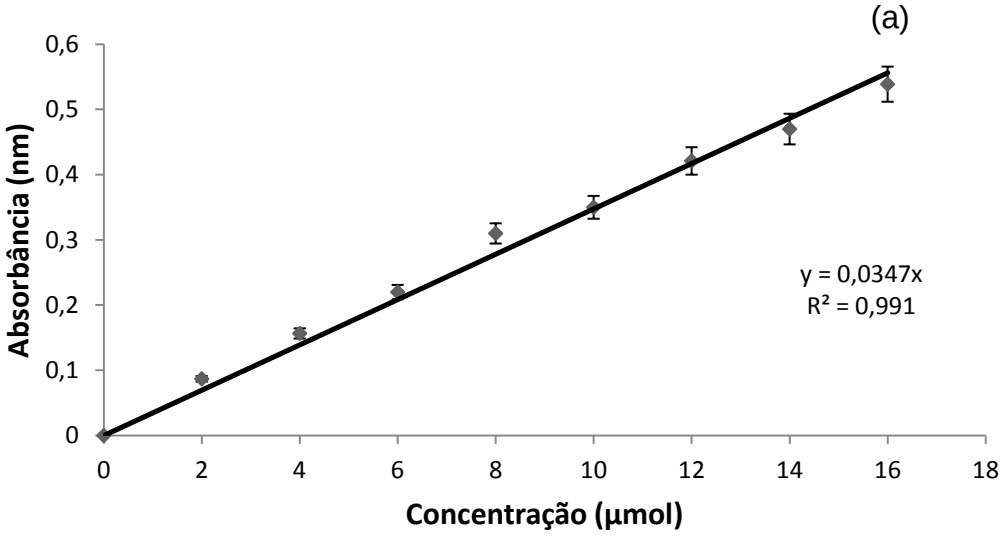
3.3. Métodos analíticos

3.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Todas as reações de esterificação foram acompanhadas por CCD em cromatoplacas (Merck, F254). Antes da quantificação reacional, a presença do éster e do DAF foi visualizada por uma solução reveladora (5% ácido sulfúrico em álcool etílico). A fase móvel empregada foi ciclohexano:acetato de etila (4:1). Este método teve por objetivo a verificação qualitativa da conversão em éster do DAF durante a reação.

3.3.2. Lowry–Tinsley

A conversão das reações de esterificação foi medida através do método Lowry–Tinsley adaptado (LOWRY; TINSLEY, 1976). Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres, solúveis em fase orgânica. Para tal, em um *criotubo* era colocado, 0,3 mL do meio reacional, 0,3 mL de uma solução de 5% acetato de cobre-piridina (pH 6), 0,6 mL do respectivo solvente e agitados vigorosamente em vórtex por 30 segundos. O sobrenadante era medido em espectrofotômetro UV/visível em 715 nm de comprimento de onda. A concentração residual de ácidos graxos presente na amostra foi calculada com base na equação gerada pela curva padrão do respectivo ácido utilizado (Figura 3.1), comparando-se com a concentração inicial demonstrada pela solução-estoque.



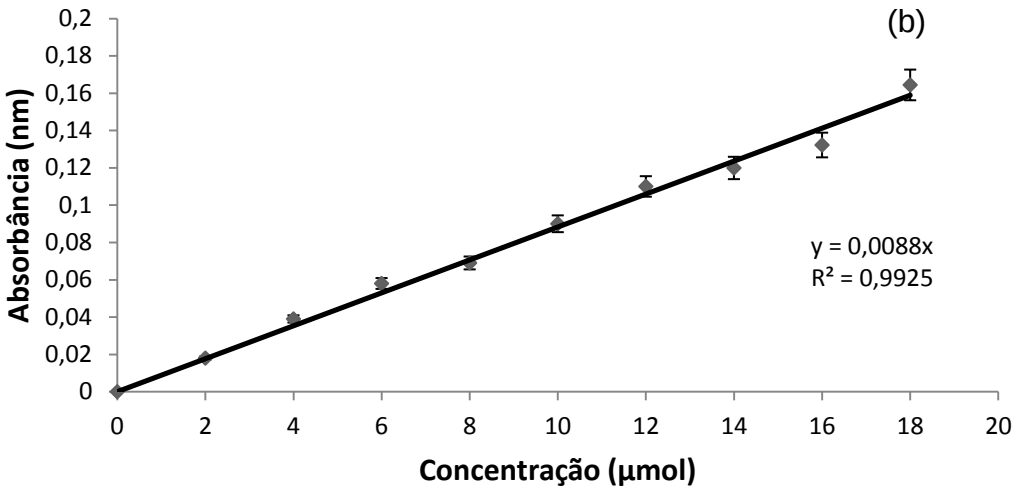


Figura 3. 1: Curvas padrão dos ácidos graxos utilizados como reagentes de partida. Curva padrão do ácido palmítico (AP), (a); curva-padrão do resíduo de ácido graxo (RAG), (b).

Cada reação foi analisada em triplicata, e a conversão foi calculada pela diferença da concentração da solução antes e após a reação segundo a equação 3.1. Tal metodologia para determinação de ácido residual vai ao encontro com as metodologias analíticas cromatográficas e é amplamente utilizada (BARON et al, 2005; FERNANDES et al, 2007; JUNIOR et al, 2011; RUELA et al, 2013; FERNANDES et al, 2004; JUNIOR et al, 2012; GONÇALVEZ et al, 2013; ITABAIANA et al, 2013).

Eq. 1. $$C\ (\%) = 100 - \frac{[A.G.]_i x\ 100}{[A.G.]_f}$$

Onde C é a conversão de ácido graxo expressa em porcentagem, $[A.G.]_i$ é a concentração de ácido graxo no início da reação e $[A.G.]_f$ é concentração de ácido graxo no final da reação.

3.3.3. Análise de Infravermelho de Transmissão

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um equipamento NICOLET MAGNA-IR 760, sob a forma de pastilhas de KBr na faixa de comprimento de onda que vai de 400 a 4000 cm^{-1}.

3.3.4. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de 1H e 13C (RMN 1H e RMN 13C) foram realizados no espectrômetro BRUKER AC-200, com frequência de 200 MHz (1H) e 50 MHz (13C), utilizando como padrão interno o $(CH_3)_4Si$ (TMS).

As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades representadas por: singleto, dupleto, duplo-dupleto, tripleto, multipleto, etc. Os deslocamentos químicos (δ) foram relatados em unidades adimensionais que representam partes por milhão (ppm) da frequência aplicada. Utilizou-se como solvente clorofórmio deuterado.

3.3.5. Cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A análise quali e quantitativa dos ácidos graxos presentes no resíduo de ácidos graxos oriundo do refino de óleo de palma utilizado como substrato foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e realizada em duplicata. Assim, foi preparado em clorofórmio uma solução de 1 mL de 50 mM de resíduo de ácido graxo (baseado na massa molar do ácido palmítico). Em seguida, cada amostra foi submetida a um processo de derivatização com MSTFA, a fim de serem transformados em seus derivados mais voláteis. Para tal, 50 µL da solução era posto em contato com 100 µL do agente derivatizante e acondicionados em um *shaker* a 150 rpm e 60 ^{0}C por 30 minutos. Após, adicionou-se 1 mL de $CHCl_3$ a cada amostra, sendo estas carreadas para frascos de 2mL, e submetidas a análise por CG-EM.

Utilizou-se um aparelho Shimadzu 2010 equipado com coluna DB 5-HT (Agilent J&W Scientific, USA – 10m 0.32mm 0.1 mm). Os ácidos foram identificados através de comparação com os espectros de massas da biblioteca NIST05s.LIB. A temperatura do injetor, assim como a do detector foi de 270°C. As condições de aquecimento da coluna cromatográfica utilizada podem ser visualizadas na tabela 3.1.

Tabela 3. 1: Rampa de aquecimento utilizada para a análise de RAG em CG-EM.

Velocidade (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
-	60	1,00
10	290	16,00

3.3.6. Análise do Suporte da Enzima por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A fim de averiguar o desgaste do suporte dos biocatalisadores gerados nos sucessivos reciclos das enzimas comerciais imobilizadas, bem como avaliar a morfologia do organogel aplicado como suporte a enzima Cal B em micela reversa, na esterificação do DAF, realizou-se a análise através de microscopia eletrônica de varredura em um microscópio Shimadzu SuperScan SS-550 no laboratório de microscopia do GMPC-UEM, sob a responsabilidade da doutoranda Andreia Fátima Zanetti. Para a obtenção de cada micrografia, as superfícies dos suportes foram previamente recobertas por ouro em um metalizador marca Shimadzu. Para isso, as amostras foram colocadas sobre o porta-amostra em fitas de carbono, sob vácuo e foram metalizadas. Após o recobrimento do material, as amostras foram posicionadas no microscópio e bombardeadas por feixes de elétrons que interagem com os átomos do suporte produzindo partículas e radiação que foram usadas para formar uma imagem ampliada da amostra.

3.3.7. Medidas dos tamanhos de partícula das micelas reversas

A medição dos tamanhos de partícula das micelas reversas foi realizada através da técnica de dispersão dinâmica de luz usando um equipamento comercial Horiba LB-950.

3.3.8. Análise estatística dos dados

Os planejamentos de experimentos e resultados foram realizados com o auxílio do *software* Statistica 6.0 (Statsoft, Inc, USA), de acordo com o nível de significância estabelecido para se obter os modelos matemáticos. A variância explicada pelos modelos foi dada pela determinação múltipla de coeficientes, R^2. A significância dos coeficientes de regressão e as probabilidades associadas, p(t) foram determinadas por teste F de Fisher.

3.4. Reação em batelada

3.4.1. Enzima comercial imobilizada

3.4.1.1. Seleção de lipases comerciais – esterificação do DAF e AP

A reação de esterificação do DAF e ácido palmítico foi investigada em sistema batelada. Reatores de 4 mL foram utilizados em placa de carbeto de silício (Figura 3.2 a), que

permitem até 24 reações simultâneas com total homogeneização da temperatura reacional (Figura 3.2 b). As reações foram realizadas a 60^0C com agitação magnética. Uma solução estoque 1:1 (50mM e 50mM) de DAF e AP foi preparada em heptano. As reações foram realizadas em triplicata em 1 mL de meio reacional com as enzimas comerciais em sua forma livre e imobilizada (Tabela 3.1). Ao final do tempo reacional (24 horas) as reações eram submetidas a análise pela metodologia Lowry–Tinsley para quantificação de ácido graxo residual.

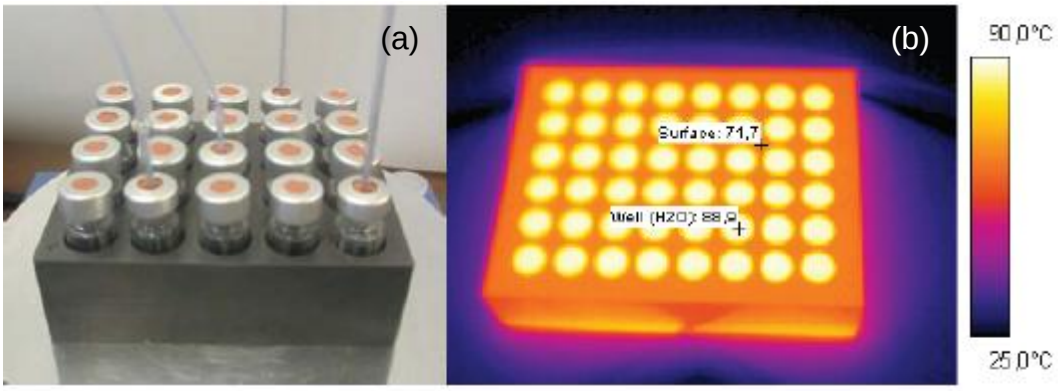


Figura 3. 2: Placa de carbeto de silício (a) e demonstração da homogeneização da temperatura (b).

Tabela 3. 2: Lipases comerciais utilizadas na reação de esterificação (DAF e AP).

Enzima
Lipase de *Rhizomucor miehei* (RML)[a]
Lipase de *Rhizomucor miehei* (RM IM)[b]
Lipase B de *Candida antarctica* (Cal B)[a]
Novozym 435 (435)[b]
Lipase de *Pseudomonas cepacia* (PSL)[a]
Lipase de *Pseudomonas cepacia* (PS IM)[b]
Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL)[a]
Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TL IM)[b]

[a] enzima em sua forma livre, (150 µL)
[b] enzima imobilizada, (150 mg)

3.4.1.2. Determinação do tempo reacional

Os tempos reacionais foram testados utilizando as duas lipases comerciais que apresentaram os melhores resultados da seleção das lipases comerciais na esterificação em

batelada de DAF e AP. As reações foram realizadas nos tempos de 1,2, 3, 4, 5, 12, 15, 24, 48 e 72 horas. Reatores de 4 mL foram utilizados no sistema de carbeto de silício a 60^0C com agitação magnética, com 150 mg de enzima. Uma razão molar 1:1 (50 mM e 50 mM) de DAF e AP foi preparada em 1 mL de heptano como meio reacional.

3.4.1.3. Planejamento fatorial para otimização das variáveis independentes da reação catalisada pelas enzimas imobilizadas em suporte sólido

Primeiramente, foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} para as lipases que geraram melhores conversões, *Rhizomucor miehei* (RM IM) *e Termomices lanuginosus* (TL IM) com o intuito de determinar as variáveis de maior significância e as condições ótimas de reação para a esterificação do DAF e ácido palmítico. As variáveis independentes avaliadas foram temperatura, concentração de substrato e quantidade de enzima, variando em dois níveis com triplicata dos pontos centrais para o cálculo do erro experimental. O tempo reacional foi previamente determinado com o intuito de não gerar detrimento dos dados estatísticos (RODRIGUES; IEMMA, 2005; GONÇALVES et al, 2012; JUNIOR et al, 2011). Os respectivos níveis das variáveis avaliadas para o planejamento fatorial fracionário (FFD) são apresentados na tabela 3.3.

Tabela 3. 3: Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) das variáveis independentes (2^{3-1}) para as lipases avaliadas, RM IM e TL IM.

Variáveis	-1	0	+1
Temperatura (^{0}C)	50	60	70
Quantidade de enzima (mg)	10	105	200
Concentração de substrato (mM)	5	27,5	50

Uma vez que as variáveis relevantes foram selecionadas através do planejamento fatorial fracionário (DFF), um delineamento composto central (DCC) para a enzima RMIM e um delineamento composto central rotacional (DCCR) para a TL IM foram utilizados para se obter as condições ótimas de esterificação dos respectivos biocatalisadores. Nas Tabelas 3.4 e 3.5 são apresentados os valores reais e codificados utilizados nos planejamentos para a enzima RM IM e TL IM, respectivamente.

Tabela 3. 4: Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) das variáveis independentes (2^2) para as reações catalisadas pela enzima RMIM.

Variáveis	-1	0	+1
Quantidade de enzima (mg)	50	150	250
Concentração de substrato (mM)	10	32,5	55

Tabela 3. 5: Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) das variáveis independentes (2^3) para as reações catalisadas pela enzima TLIM.

Variáveis	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (^{0}C)	55	59,1	65	70,9	75
Quantidade de enzima (mg)	50	91	150	209	250
Concentração de substrato (mM)	10	19,1	32,5	45,9	55

3.4.2. Enzima em micela reversa imobilizada em organogel

3.4.2.1. Preparação das micelas reversas

As micelas foram formadas pela adição de concentração apropriada de enzima Cal B a uma solução de 0,2 M de tampão Tris/HCl pH 7,5 formando soluções de 5-30 mg.mL^{-1} de lipase. As microemulsões contendo a lipase foram preparadas misturando a solução de Cal B com outra de 0,2 M de AOT/isooctano resultando em uma quantidade de 30-180 µg de biocatalisador por reação (método injeção). A micela foi formada pela agitação com barra magnética da solução até que esta ficasse límpida (PAPADIMITRIOU et al, 1995). O conteúdo de água, expresso em termos da razão molar de água e tensoativo foi de 8.

3.4.2.2. Imobilização das micelas reversas em organogel

As microemulsões imobilizadas em organogel foram preparadas através da introdução de quantidades adequadas de AOT contendo lipase (sem substratos) a uma segunda solução de hidroxipropilmetil celulose (HPMC) em água. Num experimento típico, 0,2 mL de

microemulsão de AOT contendo 30-180 µg de lipase foi gelificada com 0,2 g de HPMC e 0,4 mL de água à temperatura ambiente.

3.4.2.3. Procedimento de reação em batelada da enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel

As reações realizadas com a enzima em micela reversa imobilizada em organogel foram realizadas em reatores de 4 mL em *shaker* com controle de agitação. Para tal, com o intuito de evitar erros de pipetação, uma solução estoque de AP e DAF na proporção 1:1 em concentrações de 5 a 100 mM foram preparadas em heptano e em tolueno. Em cada reator foi colocado 0,75 g de organogel contendo de 30-180 µg de lipase Cal B e 2 mL da solução estoque (AP e DAF) do designado solvente nas respectivas concentrações de acordo com o planejamento de experimentos. Peneira molecular de 3 Å (ångström) foi usada também de acordo com o planejamento de experimentos (10-20% p/v). Os reatores eram incubados a temperatura de 40-55 ºC com agitação de 50-250 rpm.

3.4.2.4. Planejamento fatorial para otimização das variáveis independentes da reação catalisada pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel

Utilizando a mesma estratégia de otimização de processo adotada nas reações realizadas com as enzimas imobilizadas comerciais, primeiramente, foi realizado um planejamento fracionário, 2^{5-1} com o intuito de determinar o efeito e a significância das variáveis para a reação de esterificação catalisada pela enzima Cal B imobilizada em micela reversa em cada solvente avaliado (heptano e tolueno). As variáveis independentes analisadas foram temperatura, quantidade de enzima, concentração de substrato, peneira molecular e agitação em diferentes níveis, conforme pode ser visualizado na Tabela 3.6.

Tabela 3. 6: Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) das variáveis independentes avaliadas no delineamento fatorial fracionário (DFF) 2^{5-1} para a reação catalisada em diferentes solventes pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel.

Variável	-1	0	+1
Temperatura (^{0}C)	40	45	50
Quantidade de enzima (µg)	30	105	180
Concentração de substrato em heptano (mM)	5	27,5	50
Concentração de substrato em tolueno (mM)	5	52,5	100
Peneira molecular (%)*	10	15	20
Agitação (rpm)	50	150	250

*p/v

Após a seleção das variáveis relevantes através do planejamento fatorial fracionário, um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi aplicado para a reação em cada solvente avaliado com o intuito de se obter as condições ótimas da esterificação do DAF com o AP. Para os planejamentos avaliados, pontos axiais foram indexados para a construção de modelos quadráticos. As variáveis independentes e seus respectivos valores reais e codificados são apresentados na Tabela 3.7 e 3.8, para o heptano e tolueno, respectivamente.

Tabela 3. 7: Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) para as variáveis independentes avaliadas no DCCR (2^3) para as reações realizadas em heptano.

Variável	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Quantidade de enzima (µg)	30	54,3	90	125,7	150
Concentração de substrato (mM)	5	10,1	17,5	24,9	30
Agitação (rpm)	150	180,4	225	269,6	300

Condições mantidas constantes: temperatura (50^{0}C) e peneira molecular (15%, p/v).

Tabela 3. 8: Valores reais e codificados (+ nível superior, 0 intermediário, - nível inferior) para as variáveis independentes avaliadas no DCCR (2^3) para as reações realizadas em tolueno.

Variável	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura (^{0}C)	45	47	50	53	55
Concentração de substrato (mM)	5	10,1	17,5	24,9	30
Peneira molecular (%)*	10	12,02	15	17,98	20

Condições mantidas constantes: quantidade de enzima (105 µg) e agitação (150rpm).
*p/v

3.5. Reação em reator de fluxo contínuo

Para as reações realizadas em fluxo contínuo, tanto a esterificação catalisada pelas enzimas comerciais quanto a enzima em micela reversa imobilizada em organogel foi utilizado um sistema fabricado pela SYRRIS série ASIA como pode ser visualizado na figura 3.3. Em todas reações realizadas em fluxo, primeiramente o respectivo solvente puro era bombeado no sistema durante 5 min enquanto a mistura reacional (DAF e AP) era agitada e aquecida na temperatura a ser testada. Enquanto isso o equipamento foi equipado com coluna de leito fixo marca Omnifit contendo a lipase imobilizada trabalhada na referida etapa. Após os tempos de residência, as conversões foram analisadas pela metodologia citada anteriormente (3.3.2) e o solvente puro mais uma vez era bombeado no sistema afim de eliminar qualquer resíduo remanescente.

Figura 3. 3: Equipamento Asia (SYRRIS) de fluxo contínuo.

3.5.1. Catalisada por enzima imobilizada em suporte sólido

As reações realizadas em concentração até 50 mM catalisadas pelas lipases comerciais de *Rhizomucor miehei* IM e *Thermomyces lanuginosus* IM foram realizadas nos fluxos de 0,1 a 3 $mL.min^{-1}$ com um reator de volume 2,4 mL (950 mg de lipase suportada). As reações foram realizadas nas melhores condições obtidas na otimização em batelada das referidas enzimas: 10 mM de uma mistura (1:1) de AP e DAF em heptano a 60^0C para a RM IM e para a TL IM, 19,1 mM de substrato a 70,9 ^{0}C.

Para as reações em concentração até 500 mM foram utilizados *terc*-butilmetil éter (TBME), tolueno e *para*-cimeno como meio reacional e catalisada pela enzima RM IM nas mesmas condições de fluxo e volume reacional.

3.5.2. Catalisada pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel

Para as reações catalisadas pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel foi utilizado um volume reacional de 4,71 mL contendo 3.4 g de organogel (600 µg de lipase). Fluxos de 0,1 a 0,6 $mL.min^{-1}$ foram testados. Primeiramente, as reações foram realizadas nas melhores condições obtidas na otimização em batelada: 5 mM de uma mistura (1:1) de ácido palmítico e DAF em heptano e em tolueno a 50^0C. Após, reações com 20 e 40 mM de substrato também foram testadas.

CAPÍTULO 4
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese de 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (diacetonídeo da frutose - DAF)

Um sólido branco como produto sob forma de agulhas finas foi obtido (p.f 96°C, lit. 95-96°C) na síntese do 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (DAF) após recristalização com um rendimento de 30% submetido à análise de infravermelho (Figura 4.1).

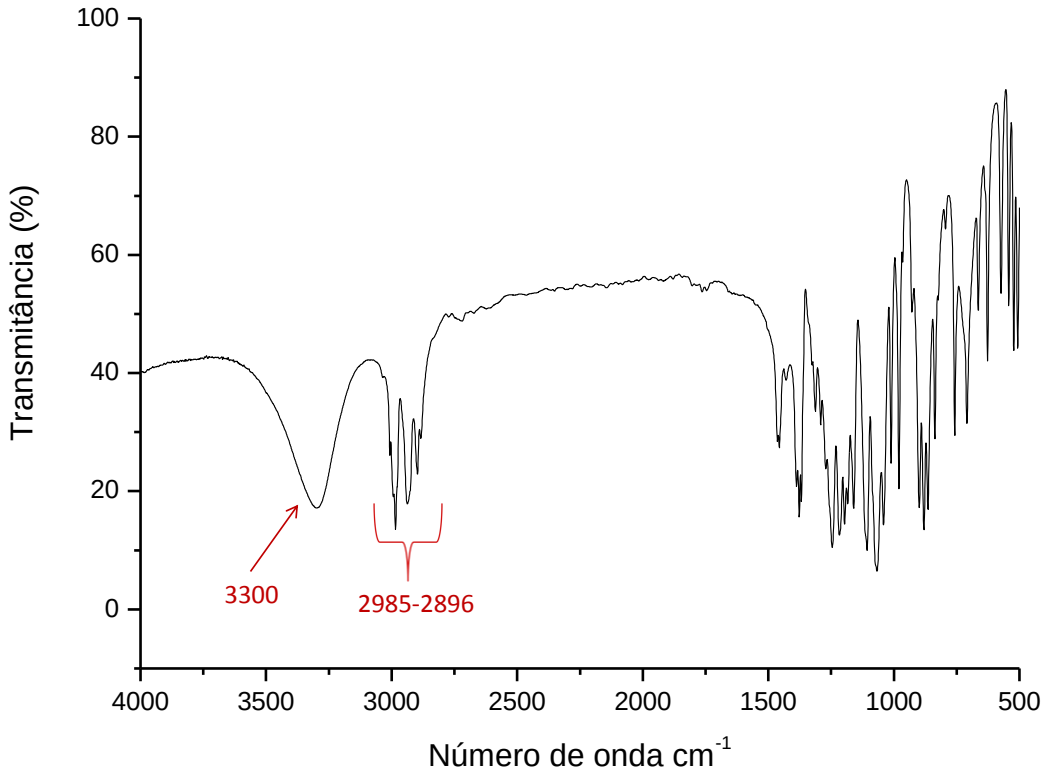


Figura 4. 1: Espectro de infravermelho (KBr) do 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D frutopiranose (DAF).

Evidencia-se na Figura 4.1 a banda em 3300 cm^{-1} que representa a vibração de deformação axial de O-H. Quando se compara o espectro de infravermelho da frutose (Figura 4.2) com o do DAF, pode-se observar a diminuição desta banda referente ao O-H,

dando indício da efetividade na proteção desses grupos através dos acetais (isopropilideno). Observa-se também no espectro a deformação axial C-H de carbonos alifáticos nas bandas entre 2985-2896 cm^{-1} evidenciando o estiramento das metilas germinais dos grupamentos isopropilidênicos.

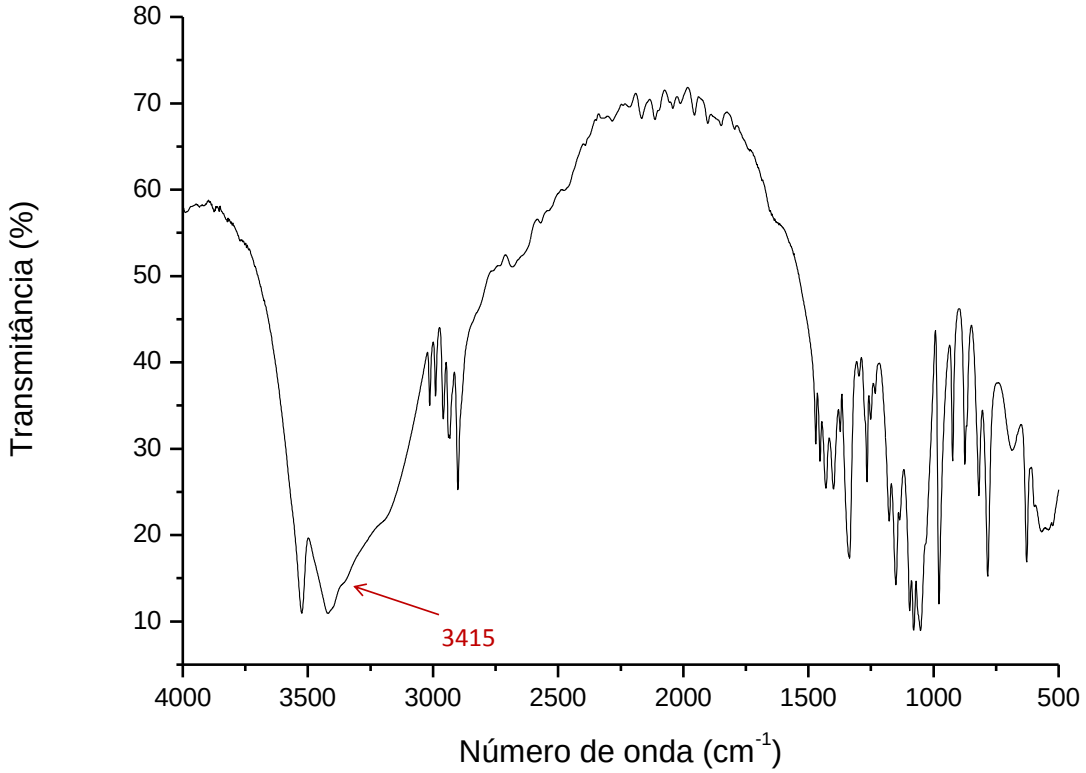


Figura 4. 2: Espectro de Infravermelho (KBr) da frutose.

O produto também foi confirmado através de análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{1}H (Apêndice A 1), ^{13}C (Apêndice A 2) e bi-dimensional (COSY, HMBC e HSQC – Apêndice A 3 - 5) indo ao encontro com os dados da literatura (FERREIRA et al, 2001).

4.1.1. Teste de solubilidade do DAF e da frutose em diversos solventes

A fim de confirmar a eficácia da proteção das hidroxilas do carboidrato foram realizados testes comparativos de solubilização do DAF e da frutose. Neste ensaio, concentrações molares de 100 e 200 mM das moléculas foram testadas em *criotubos*, a temperatura ambiente, em diferentes solventes orgânicos e agitados em vórtex. As análises de

solubilidade não apresentaram dissolução parcial nem mostraram turbidez, portanto foram avaliadas de maneira qualitativa, como pode ser visualizado na tabela 4.1.

Tabela 4. 1: Teste de solubilidade da frutose e do DAF em concentrações de 100 e 200 mM em diferentes solventes a temperatura ambiente.

Solvente		**Frutose**		**DAF**	
	Constante dielétrica	**100 mM**	**200 mM**	**100 mM**	**200 mM**
acetato de etila	6,02	-	-	+	+
acetona	21	-	-	+	+
acetonitrila	37,5	-	-	+	+
álcool etílico	24,55	+	-	+	+
álcool isopropílico	19,92	-	-	+	+
álcool metílico	32,7	+	+	+	+
álcool propílico	20,33	-	-	+	+
ciclo-hexano	2,02	-	-	+	-
diclorometano	8,93	-	-	+	+
dioxano	2,25	-	-	+	+
dimetilformamida	36,71	+	+	+	+
dimetilsulfóxido	46,68	+	+	+	+
n-heptano	1,92	-	-	+	-
n-hexano	1,88	-	-	+	-
iso-octano	1,94	-	-	+	+
metiletilcetona	18,51	-	-	+	-
ter- butil metil éter	2,6	-	-	+	+
terc-butanol	17,51	-	-	+	+
tolueno	2,38	-	-	+	+

+ solúvel
- insolúvel

Geralmente a constante dielétrica fornece uma medida aproximada de polaridade do solvente. Solventes com uma constante dielétrica menor do que 15 são considerados apolares enquanto que solventes polares possuem constantes maiores que 15 (REICHARDT, 1990). Partindo do princípio que semelhante dissolve semelhante, ou seja, solvente polar dissolve substâncias polares, podemos observar que a frutose foi solúvel em solventes polares como etanol, metanol, DMF e DMSO. De acordo com Lide (2004), a frutose é solúvel em álcool

metílico e álcool etílico. Porém, como mencionado na revisão, esses solventes possuem grupos hidroxila livres que podem competir com o substrato, não sendo desejáveis em reação de esterificação. Já solventes como DMF e DMSO podem causar efeitos de inibição ou até inativar biocatalisadores não sendo desejados em catálise enzimática (PLOU et al., 2002).

Sabe-se que o emprego da temperatura e agitação melhora o poder de solvatação dos solventes, entretanto, são necessários altos tempos de contato soluto/solvente para que haja a solubilização do carboidrato. Fonseca (2008), por exemplo, conseguiu solubilizar a mesma concentração de frutose em *terc*-butanol (100 mM), entretanto, necessitou de 24 horas de agitação (200 rpm) e temperatura (55^0C). Já o DAF se mostrou solúvel em *terc*-butanol em concentração superior (200 mM) à temperatura ambiente, o que mostra a vantagem de solubilização do DAF frente à frutose.

Como pode ser visualizado na Tabela 4.1, o DAF foi solúvel em todos os solventes e em quase todas as concentrações testadas, comprovando que a proteção da frutose por grupos isopropilideno foi satisfatória para aumentar a solubilidade do carboidrato tanto em solventes apolares quanto em polares.

Pelo fato do nosso grupo já vir realizando trabalhos de esterificação enzimática com resultados satisfatórios (JUNIOR et al, 2011; JUNIOR et al, 2012; JUNIOR et al, 2012), o n-heptano foi inicialmente utilizado como solvente para as reações com as enzimas imobilizadas em suporte sólido.

4.2. Reação em batelada

4.2.1. Enzimas imobilizadas comerciais

4.2.1.1. Seleção de lipases comerciais

A fim de se encontrar um biocatalisador para as reações de esterificação realizadas neste estudo, foi feita uma triagem dentre as lipases disponíveis em laboratório, as quais estão descritas na seção experimental. Nesta ocasião, investigou-se a capacidade de esterificação do DAF e AP, no solvente anteriormente escolhido (Figura 4.3).

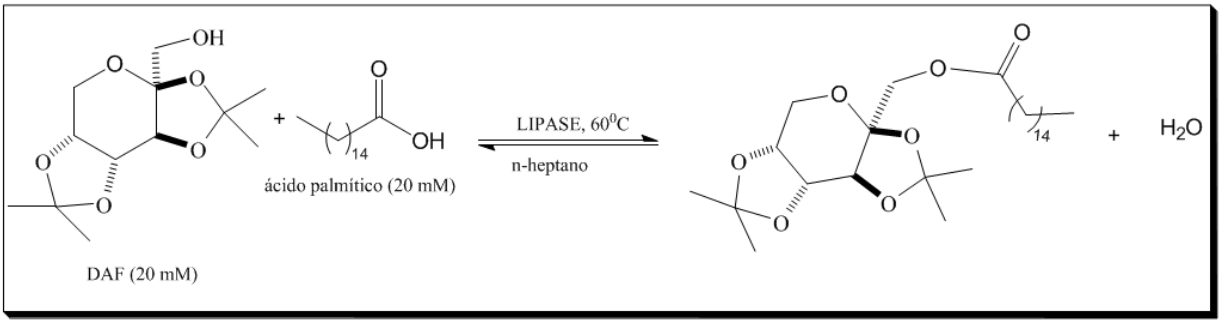


Figura 4. 3: Reação de esterificação entre o DAF e o AP, realizada a 60°C, razão molar 1:1, e volume reacional de 1 mL.

A Figura 4.4 apresenta os resultados de conversão de monopalmitato de DAF para as enzimas livres e imobilizadas avaliadas.

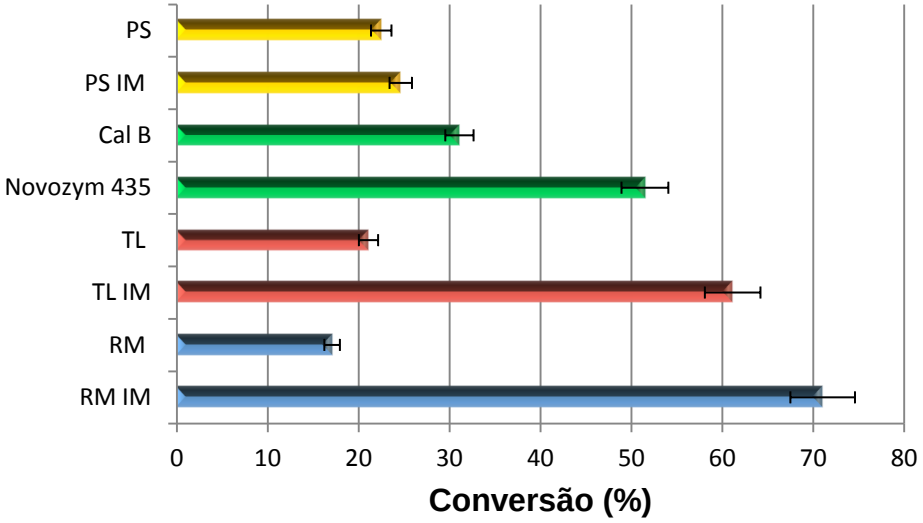


Figura 4. 4: Investigação inicial de lipases comerciais livres e imobilizadas na reação de esterificação do DAF com AP. Condições reacionais: temperatura 60^0C, razão molar 1:1 (20mM e 20mM) de DAF e AP em 1mL de n-heptano, 15% p/p ou p/v de enzima, tempo reacional de 24 horas.

A dessorção da proteína do suporte das enzimas imobilizadas não foi realizada nesta etapa, portanto os biocatalisadores testados em sua forma livre estão em concentração de proteína superior aos imobilizados. Mesmo possuindo provavelmente uma menor concentração de proteína, as enzimas imobilizadas apresentaram resultados superiores em comparação às enzimas livres. Isso também foi observado em outras reações de esterificação realizadas pelo nosso grupo (JUNIOR et al, 2011; JUNIOR et al, 2012; JUNIOR et al, 2012). Diversos autores (CUNHA et al, 2008, GUISAN et al, 2001) afirmam que a imobilização da

enzima confere algumas vantagens ao biocatalisador, como por exemplo, a formação de uma camada de solvatação no microambiente em torno do biocatalisador, capaz de manter uma dinâmica molecular mínima, essencial à atividade enzimática em ambientes orgânicos. As enzimas livres tendem a se agregar e aderir às paredes do reator, quando suspensas em um solvente orgânico e submetidas a agitação, apresentando assim, uma distribuição desuniforme pelo meio reacional. A imobilização de enzimas em suportes sólidos minimiza esse efeito, refletindo em melhores conversões. A imobilização de enzimas pode ainda, fornecer proteção à enzima contra a ação danosa do solvente as águas de hidratação aumentando assim sua atividade de esterificação devido a otimização da rigidez da estrutura molecular (ILLANES, 1994).

As lipases imobilizadas de *Thermomyces lanuginosus* (TL IM) *e Rhizomucor miehei* (RM IM) apresentaram excelentes resultados, com 61,1% e 71% de conversão, respectivamente. Dessa maneira as enzimas RM IM e TL IM foram escolhidas para serem submetidas à otimização de suas condições reacionais.

4.2.1.2. Confirmação do éster sintetizado

A cromatografia em camada delgada mostrou uma grande diferença entre os índices de retenção do substrato e da reação revelando a provável formação do produto de interesse (monopalmitato de 2,3:4,5-O diisopropileideno-β-D-frutopiranose). A confirmação foi realizada por análise de infra-vermelho como pode ser observado na Figura 4.5 para o espectro do monopalmitato de DAF obtido na catálise da enzima RM IM. Pode-se observar a banda de deformação axial característica de carbonila de éster em 1747 cm^{-1}. Observa-se também entre 2900 e 3000 cm^{-1} a deformação axial de C-H alifático, e em 1471 cm^{-1} aparece a banda de deformação angular de CH_2.

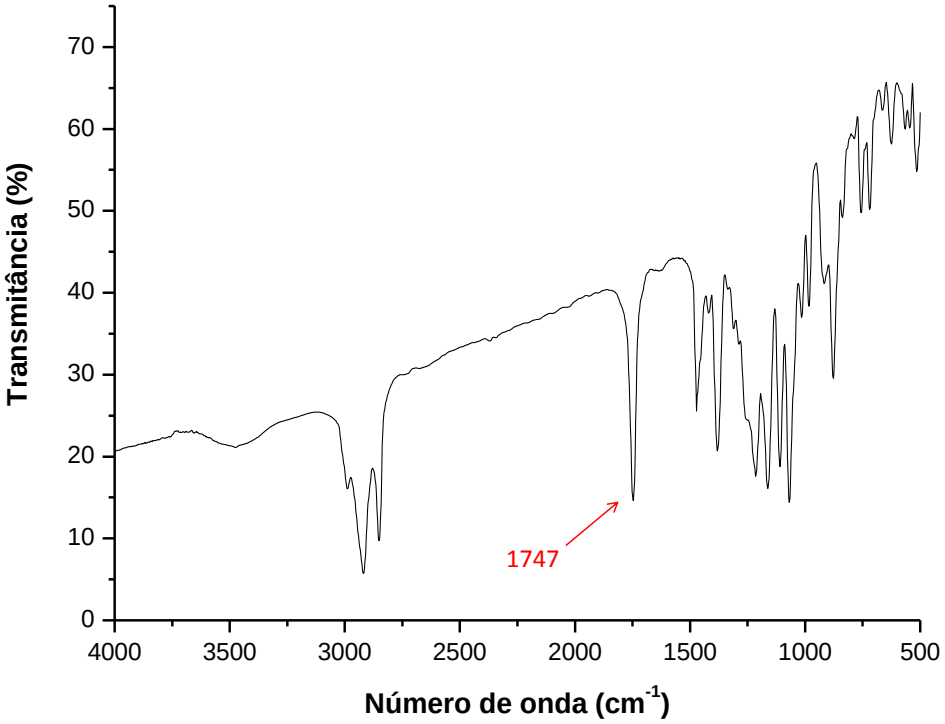


Figura 4. 5: Espectro infravermelho (KBr) do éster (palmitato do diacetonídeo da frutose) obtido.

A caracterização por Ressonância Magnética Nuclear, 200 MHz; $CDCl_3$ de ^1H (Apêndice A 3) e ^{13}C (Apêndice A 4) corroborou com o espectro de infra-vermelho confirmando a esterificação entre o AP e o 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose. Quando se compara os espectros de ^{13}C do DAF (Apêndice A 2) e do éster (Apêndice A 4) pode-se observar o aparecimento de um quarto carbono quaternário com deslocamento químico de 173,6 ppm, referente a carbonila do éster.

4.2.1.3. Determinação do tempo reacional

A fim de encontrar o tempo para a posterior otimização dos parâmetros reacionais foram realizados testes em tempos variados. A Figura 4.6, mostra os resultados de conversão nos diferentes tempos testados para a esterificação entre o AP e DAF catalisada pela enzima RM IM e TL IM.

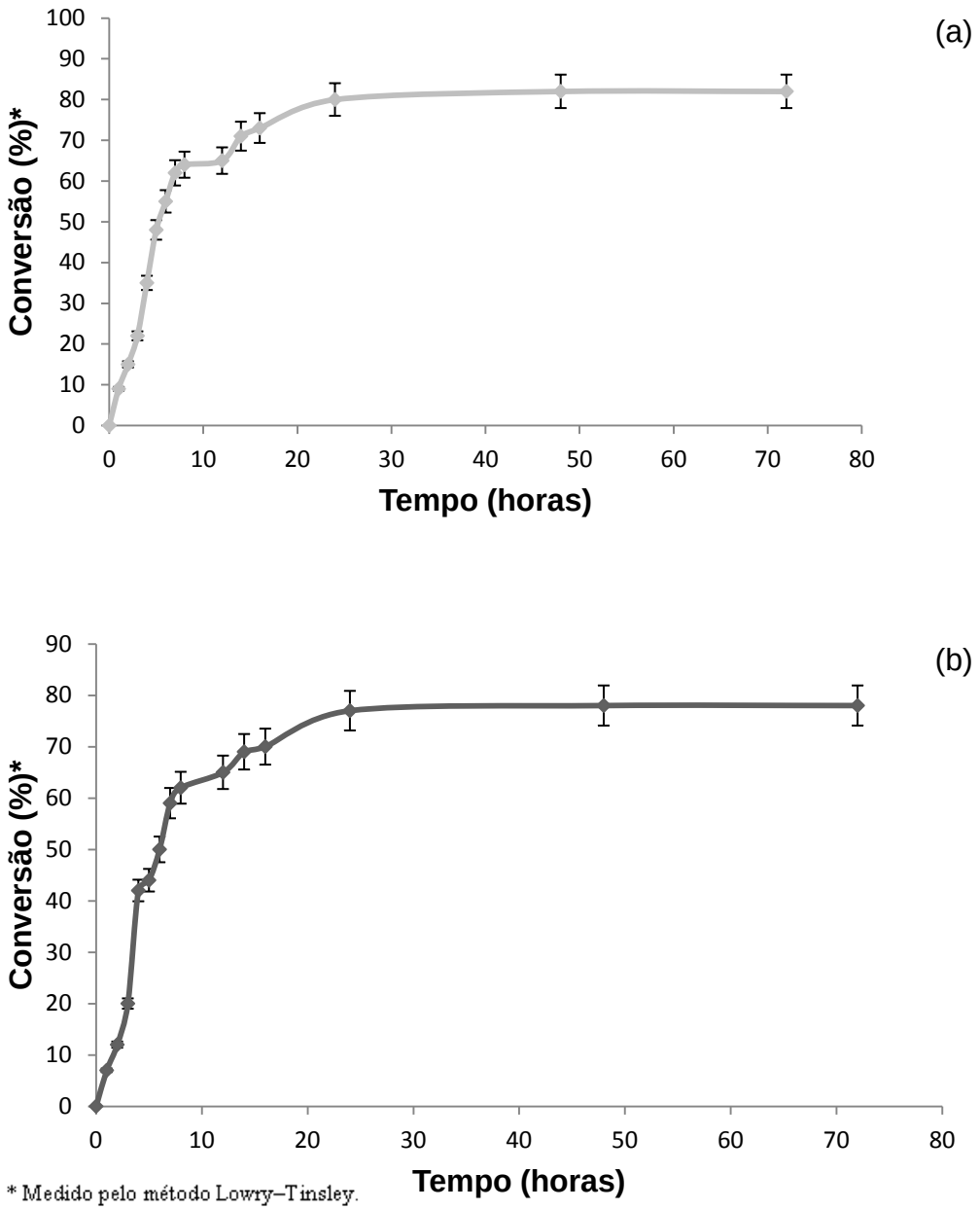


Figura 4. 6: Conversão nos diferentes tempos testados para a esterificação entre o DAF e o AP catalisada pela enzima RM IM (a) e TL IM (b). Temperatura reacional 60^0C, razão molar ácido e álcool (1:1), 15 % (p/p) de enzima.

Observa-se na Figura 4.6 o comportamento similar das duas enzimas avaliadas (RM IM e TL IM). As duas enzimas apresentaram estabilidade em suas conversões após 24 horas de reação. Assim, o tempo de 24 horas foi determinado como tempo reacional para a otimização do processo.

4.2.1.4. Delineamento fatorial fracionário (DFF) e delineamento composto central rotacional (DCCR)

A estimativa dos efeitos do planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} é usada para indicar as variáveis mais importantes que devem ser incluídas no próximo planejamento, bem como definir as novas faixas das variáveis a serem trabalhadas. Os resultados de conversão e a matriz do planejamento fracionário das enzimas avaliadas para a seleção das variáveis mais relevantes da esterificação são apresentados na Tabela 4.2. O DFF consiste de quatro pontos fatoriais e triplicata do ponto central para o cálculo do erro experimental.

Tabela 4.2: Matriz delineamento experimental fatorial fracionário 2^{3-1} com valores codificados e conversão para as enzimas avaliadas.

Entrada	Variáveis			Conversão (%)	
	T (^{0}C)	E (mg)	S (mM)	RM IM	TL IM
1	-1 (50)	-1 (10)	+1 (50)	25,6	19,5
2	+1 (70)	-1 (200)	-1 (5)	5,3	4,1
3	-1 (50)	+1 (10)	-1 (5)	61,0	20,9
4	+1 (70)	+1 (200)	+1 (50)	77,6	69,9
5	0 (60)	0 (105)	0 (27,5)	41,4	49,1
6	0 (60)	0 (105)	0 (27,5)	42,1	49,6
7	0 (60)	0 (105)	0 (27,5)	42,9	47,4

Como pode ser observado nas conversões da Tabela 4.2, a Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM apresentam melhores resultados no ponto fatorial superior para ambas as variáveis (Experimento 4). Isso é um indicativo do efeito positivo das variáveis na reação, isto é, tanto um aumento na quantidade de substrato e temperatura quanto na quantidade de biocatalisador gerará um aumento nos resultados de conversão de éster. Isso pode ser comprovado através da Tabela 4.3. Observa-se que todas as variáveis estatisticamente significativas apresentaram efeito positivo no processo.

Tabela 4. 3: Estimativa dos efeitos do planejamento fatorial fracionário (DFF) 2^{3-1} para as enzimas avaliadas.

	Efeito		**Valor de p**	
Variáveis	**RM IM**	**TL IM**	**RM IM**	**TL IM**
Média	42,3750	28,6000	<0,0001[a]	<0,0001[a]
Curvatura	-0,4833	40,2000	0,7143	0,0019[a]
Temperatura (^{0}C)	-1,8500	16,8000	0,1326	0,0046[a]
Quantidade de enzima (mg)	53,8500	33,6000	0,0001[a]	0,0011[a]
Concentração de substrato (mM)	18,4500	32,2000	0,0016[a]	0,0012[a]

[a] estatisticamente significativo com 95% de confiança

Pode-se observar ainda na Tabela 4.3 que para a enzima RM IM que a quantidade de enzima e concentração de substrato foram as variáveis que apresentaram significância na reação por apresentarem $p<0,05$ e, portanto foram selecionadas para serem otimizadas no planejamento completo. A curvatura não foi significativa para a enzima RM IM, sendo um modelo linear suficiente para explicar os resultados. A temperatura não apresentou significância sendo assim mantida constante a 60^{0}C no planejamento subsequente.

Como podem ser visualizadas na Tabela 4.3 para a TL IM, todas as variáveis foram significativas ($p<0,05$) e, portanto utilizadas no planejamento subsequente. A curvatura também foi significativa ($p=0,0019$), havendo dessa forma a necessidade de adição de pontos axiais para a construção de um modelo quadrático, o delineamento composto central rotacional (DCCR).

Se compararmos os resultados dos planejamentos fracionários da enzima RM IM e TL IM (Tabela 4.3) pode-se verificar a maior significância da temperatura para a TL IM. O efeito da temperatura na enzima TL IM foi significativo sendo considerado no DCCR, ao contrário da RM IM. Tanto a enzima TL como a RM quando imobilizadas podem ser consideradas termoestáveis, apresentando atividade em temperaturas superiores a 70^{0}C (TORRES et al, 2002; COLLINS et al, 2011). Por isso, no DCCR, temperaturas acima de 70 ^{0}C puderam ser usadas.

O delineamento composto central utilizado para encontrar as condições ótimas que maximizassem os resultados de conversão para a reação de esterificação são mostrados na Tabela 4.4 para a enzima RM IM.

Tabela 4. 4: Planejamento fatorial completo 2^2 com valores codificados e resultados de conversão da reação de esterificação catalisados pela enzima RM IM.

Experimentos	Quantidade de enzima (mg)	Concentração de substrato (mM)	Conversão (%)
1	-1 (50)	+1 (55)	34,8
2	+1 (250)	+1 (55)	90,7
3	-1 (50)	-1 (10)	22,9
4	+1 (250)	-1 (10)	91,6
5	0 (150)	0 (32,5)	66,7
6	0 (150)	0 (32,5)	69,1
7	0 (150)	0 (32,5)	69,7

Na Tabela 4.4 observa-se os sete tratamentos das duas variáveis selecionadas e a conversão para cada experimento. Os primeiros quatro experimentos são suficientes para a determinação do modelo matemático e são referentes ao delineamento estatístico 2^2 e do experimento 5 ao 7 são as triplicatas dos pontos centrais para obtenção do erro experimental.

As maiores conversões foram obtidas nos experimento 2 e 4 (90,7 e 91,6% respectivamente), com as mesmas quantidades de biocatalisador, mas com concentrações de substrato diferentes. Isso nos sugere que a quantidade de substrato não teve importância significativa na reação de esterificação para a enzima RM IM na faixa estudada. Tal afirmação pode ser averiguada quando se observa a Tabela 4.5 e Figura 4.7, confirmando que a variável concentração de substrato não foi estatisticamente significativa por apresentar um valor de $p>0,05$. Na Tabela 4.5 e na Figura 4.7 pode-se observar ainda que apenas a quantidade de enzima foi significativa por apresentar um valor de $p<0,05$ pelo teste t de *Student*.

Tabela 4. 5: Estimativa dos efeitos dos parâmetros avaliados no planejamento fatorial completo 2^2 para a enzima RM IM.

Variável	**Effect**	**p value**
Média	63,6428	<0,0001[a]
Quantidade de enzima (mg) - E	62,3000	0,0006[a]
Concentração de substrato (mM) – S	-5,5000	0,0741
[E] x [S]	6,4000	0,0563

[a] estatisticamente significativo com 95% de confiança

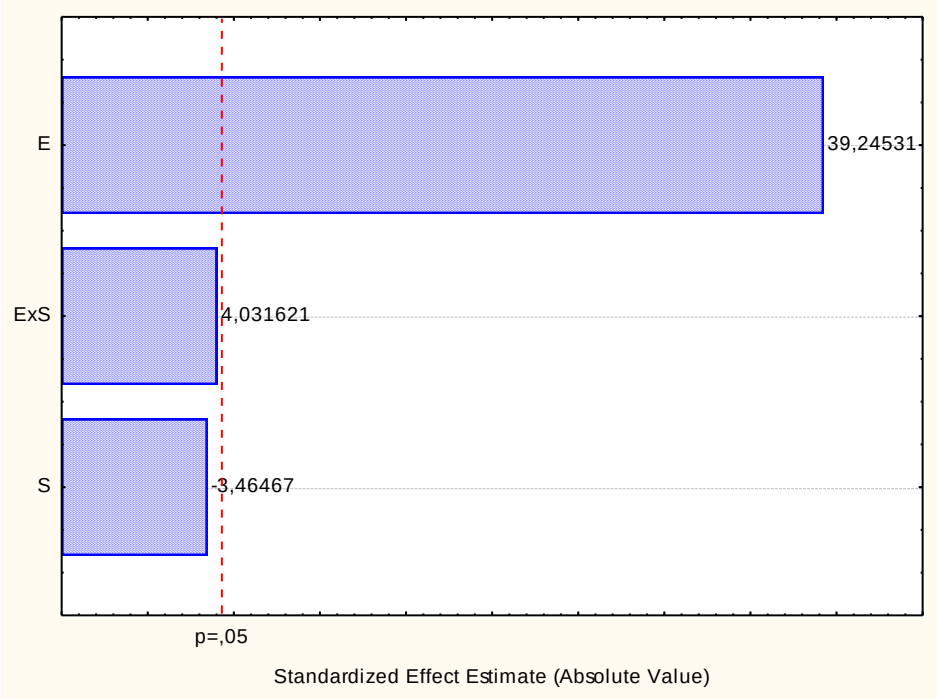


Figura 4. 7: Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo da enzima RM IM mostrando a significância das variáveis avaliadas: E, quantidade de enzima; S, concentração de substrato.

A Tabela 4.6 apresenta a matriz experimental para o delineamento composto rotacional para as reações catalisadas pela enzima TL IM. Observa-se um total de 17 tratamentos das três variáveis selecionadas e a porcentagem de conversão para cada experimento. Os primeiros oito experimentos são suficientes para a determinação do modelo matemático e são referentes ao delineamento estatístico 2^3, do 9 ao 14 temos os pontos axiais para a construção do modelo quadrático e do experimento 15 ao 17 são as triplicatas dos pontos centrais para obtenção do erro experimental.

Tabela 4. 6: Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com valores codificados e os resultados de conversão da reação de esterificação catalisados pela enzima TLIM.

Experimentos	Temperatura (^{0}C)	Quantidade de enzima (mg)	Concentração de substrato (Mm)	Conversão (%)
1	-1 (59,1)	-1 (91)	-1 (19,1)	45,7
2	+1 (70,9)	-1 (91)	-1 (19,1)	82,1
3	-1 (59,1)	+1 (209)	-1 (19,1)	44,8
4	+1 (70,9)	+1 (209)	-1 (19,1)	92,6
5	-1 (59,1)	-1 (91)	+1 (45,9)	76,4
6	+1 (70,9)	-1 (91)	+1 (45,9)	69,4
7	-1 (59,1)	+1 (209)	+1 (45,9)	79,8
8	+1 (70,9)	+1 (209)	+1 (45,9)	72,8
9	-1,68 (55)	0 (150)	0 (32,5)	65,5
10	+1,68 (75)	0 (150)	0 (32,5)	82,6
11	0 (65)	-1,68 (50)	0 (32,5)	69,3
12	0 (65)	+1,68 (250)	0 (32,5)	80,4
13	0 (65)	0 (150)	-1,68 (10)	70,2
14	0 (65)	0 (150)	+1,68 (55)	70,4
15	0 (65)	0 (150)	0 (32,5)	74,0
16	0 (65)	0 (150)	0 (32,5)	77,0
17	0 (65)	0 (150)	0 (32,5)	75,1

A Tabela 4.7 e Figura 4.8 mostram a estimativa dos efeitos e os valores de *p* e *t* de *student* para o DCCR da enzima TL IM. Podemos observar que todas as variáveis T, E e S foram significativas na reação. A temperatura apresentou um efeito positivo de 15,82, evidenciando que um aumento de temperatura maximiza a conversão. Isso pode ser observado nos experimentos 1 e 2 da Tabela 4.6, realizados exatamente nas mesmas condições de substrato (19,1 mM) e enzima (91 mg). Quando aumentamos a temperatura de 59,1 para 70,9 ^{0}C, aumenta-se a conversão de 45,7% para 82,1%. Isso talvez ocorra pelo aumento da homogeneização gerada no meio reacional com o aumento da temperatura nas condições trabalhadas (GUMEL et al, 2011).

O experimento 4, Tabela 4.6, gerou o maior resultado de conversão 92,6%, com 209 mg de enzima TL IM (Tabela 4.6). Porém, quando comparamos esse resultado com o

experimento 2, 82,1% com quantidade inferior de enzima (91mg) podemos verificar que com menos da metade da massa de biocatalisador podemos chegar a resultados similares. Isso, diante do custo da enzima é um fator preponderante a ser considerado na reação (GUMEL et al, 2011).

Tabela 4. 7: Efeitos estimados das variáveis avaliadas no DCCR 2^3 para a enzima TLIM.

Variável	**Efeito**	**Valor de p**
Média	75,5263	0,0001[a]
Temperatura (^{0}C) – T	14,4922	0,0031[a]
T^2	-2,0309	0,1537
Quantidade de enzima (%) – E	5,1356	0,0246[a]
E^2	-1,4652	0,2465
Concentração de substrato (mM) - S	4,9113	0,0268
S^2	-4,6826	0,0353[a]
T x E	2,8500	0,1173
T x S	-24,5500	0,0019[a]
E x S	0,7000	0,5811

[a] Estatisticamente significativo com 95% de confiança.

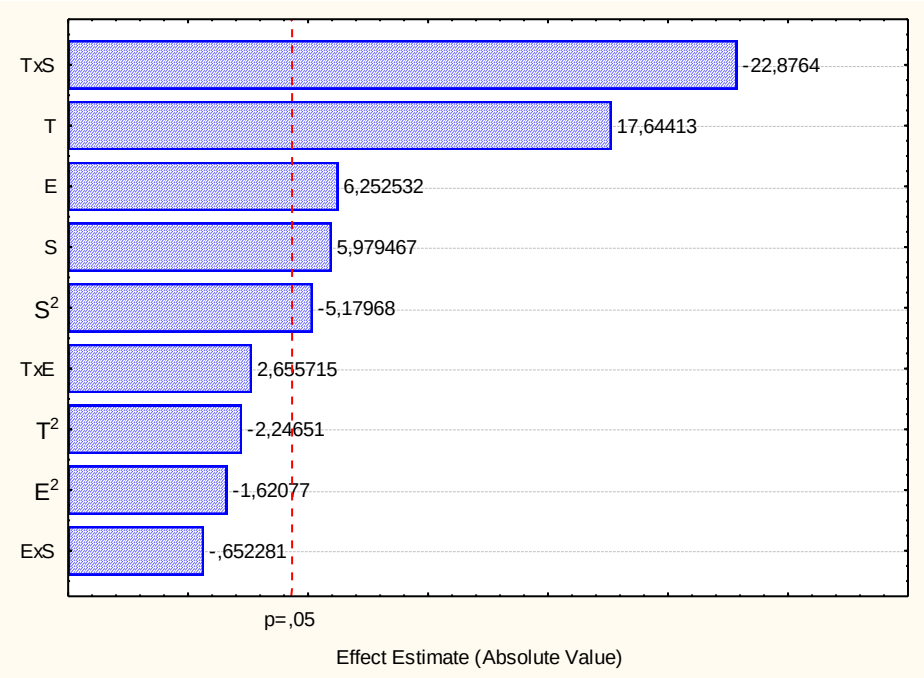


Figura 4. 8: Gráfico de Pareto para o DCCR da enzima TL IM mostrando a significância dos respectivos efeitos lineares e quadráticos das variáveis avaliadas: E, quantidade de enzima; S, concentração de substrato; T, temperatura.

Assim como na estimativa dos efeitos no planejamento fracionário, a variável concentração de substrato apresentou efeito positivo, porém menor no DCCR para a catálise da enzima TL IM (3,2 para 4,91). Esse efeito positivo provavelmente acontece, pois o aumento da quantidade de substrato, na faixa estudada, gera um aumento de contato da enzima com o substrato, levando a uma maximização da conversão (GUNAWAN et al, 2005).

Em geral, a conversão de esterificação com ácido graxo de 10 ou menos carbonos pode ser aumentada com um excesso desse substrato. Porém, para uma esterificação envolvendo ácidos graxos com longas cadeias carbônicas (16 ou mais) uma baixa razão molar de ácido graxo é preferível (CAO, BORNSCHEUER, SCHMID, 1999; SOULTANI, ENGASSER, GHOUL, 2001). Isso, pois uma relação equimolar de substratos pode minimizar efeitos de inibição à atividade enzimática tanto pelo carboidrato, com a remoção da água necessária ao biocatalisador (TARAHOMJOO, ALEMZADEH, 2003), quanto pelo ácido graxo que pode gerar diferenças de viscosidade no meio reacional dificultando a acessibilidade do substrato ao sítio ativo da lipase (HUMEAU et al., 1998).

Uma baixa concentração de substrato pode melhorar a viscosidade do meio reacional maximizando o contato do carboidrato com o sítio ativo da enzima (HUMEAU et al., 1998). Isso pode explicar os melhores resultados obtidos tanto para a enzima RM IM quanto para a TL IM em baixas concentrações de substrato (10mM e 19.1mM respectivamente) nos planejamentos completos.

Tanto para as reações catalisadas pela enzima RM IM quanto pela TL IM a otimização foi atingida, pois a conversão reacional foi maximizada do planejamento fracionário para o planejamento final, de 77,6% e 69,9% para 91,6% e 92,6% para a RM IM e TL IM, respectivamente. Porém, tais resultados foram obtidos com elevadas concentrações de enzima, o que prejudica a aplicabilidade industrial, devido, como já mencionado, ao alto custo do biocatalisador. Outros autores como Ha, Hiep e Koo (2010) também precisaram de uma elevada quantidade de biocatalisador (100 mg da lipase N435 em 1 mL de meio reacional) para a esterificação da frutose e ácido palmítico e obtiveram 76% de conversão em 14 horas de reação em líquido iônico. Isso abre um precedente para a realização da reação em fluxo contínuo, já que altas concentrações de enzima são utilizadas nesse sistema.

4.2.1.5. Validação modelo matemático

As equações 2 e 3 representam o modelo matemático da conversão do monopalmitato de 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose obtido através dos dados experimentais para a enzima RM IM e TL IM, respectivamente, em função das variáveis estudadas.

Equação 2. $Y = 63{,}64286 + 31{,}15 \times E$

Equação 3. $Y = 73{,}8018 + 7{,}2461 \times T + 2{,}5678 \times E + 2{,}4556 \times S - 1{,}9426 \times S^2 - 12{,}2750 \times T \times S$

Onde Y é porcentagem da taxa de conversão, T, E e S são as variáveis temperatura, quantidade de enzima e concentração de substrato, respectivamente. Os testes estatísticos dos modelos foram feitos pelo teste F de Fisher através de análise de variância para as enzimas avaliadas (Tabela 4.8).

Tabela 4. 8: Análise de Variância (ANOVA) para a validação dos modelos das enzimas estudadas.

Fator	**Soma dos quadrados**		**Graus de liberdade**		**Quadrado médio**		**F calculado**		**F tabelado**		**p-valor**	
	RM	**TL**	**RM**	**TL**	**RM**	**TL**	**RM**	**TL**	**RM**	**TL**	**RM**	**TL**
Regressão	3952,50	2144,04	3	5	1317,50	428,80	30,66	26,59	9,27	3,20	$9{,}4 \times 10^{-3}$	$8{,}5 \times 10^{-6}$
Resíduo	128,90	177,34	3	11	42,96	16,12						
Falta de ajuste	123,85	172,737	1	9								
Erro puro	5,04	4,607	2	2								
TOTAL	4081,39	2321,381	6	16								

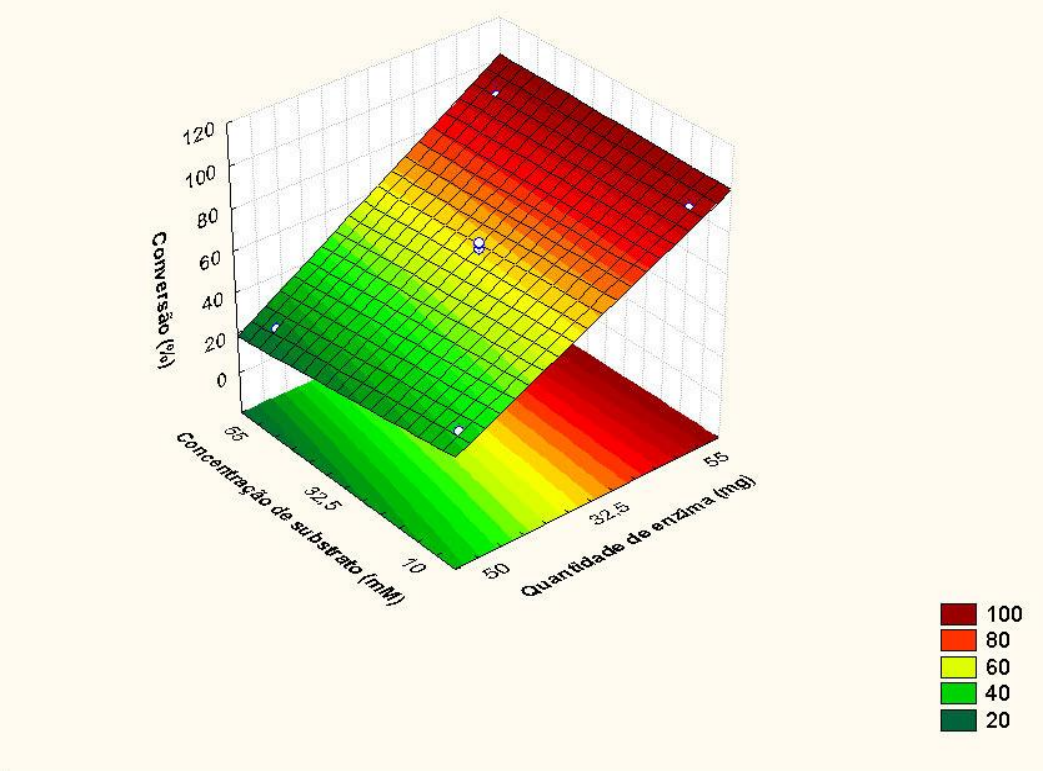
*Nível de confiança 95%.

A Tabela 4.8 de análise de variância (ANOVA) mostra a validade dos modelos pelo teste F e o resíduo que mostra a magnitude do erro experimental. O F calculado tanto para a enzima RM IM (30,66) quanto para a TL IM (26,59) foi maior que o F tabelado ($F_{3,3} = 9{,}27$ e $F_{5,11} = 3.20$), mostrando a validade do modelo experimental.

A boa relação do modelo com os dados experimentais pode ser checada pelo coeficiente de determinação (R^2) 0,95 e 0,93 para a RM IM e TL IM, respectivamente. O

coeficiente de determinação implica que 95% e 93% de produção do éster é atribuída as variáveis independentes e pode ser explicada pelo modelo.

Através da superfície de resposta e curva de contorno, Figura 4.9 (a e b) respectivamente, pode-se observar claramente o quão bem o modelo linear descreve a reação para a enzima RM IM. Observa-se na figura 4.9a, a boa correlação do modelo matemático com os pontos experimentais.



(a)

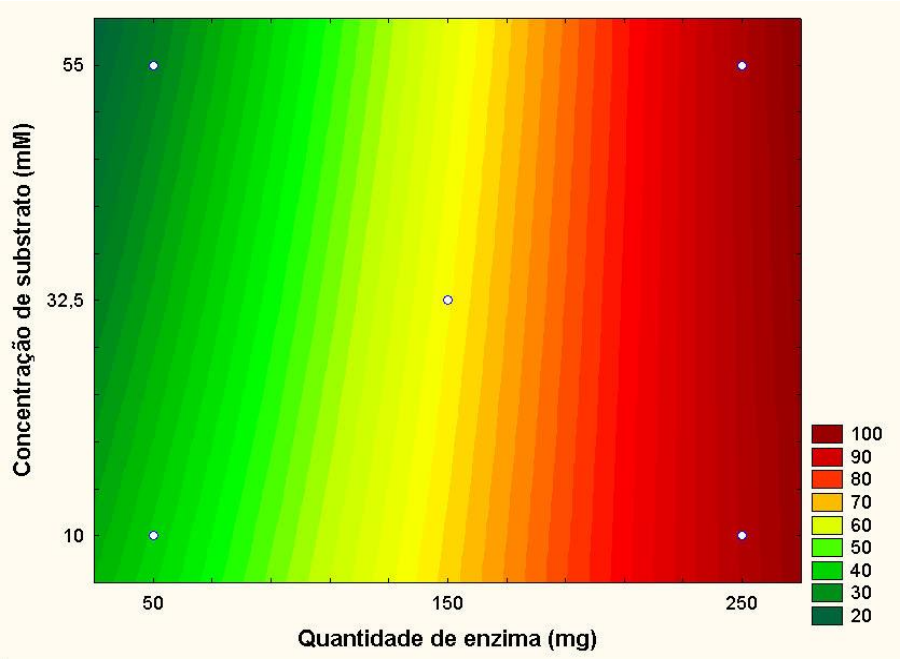
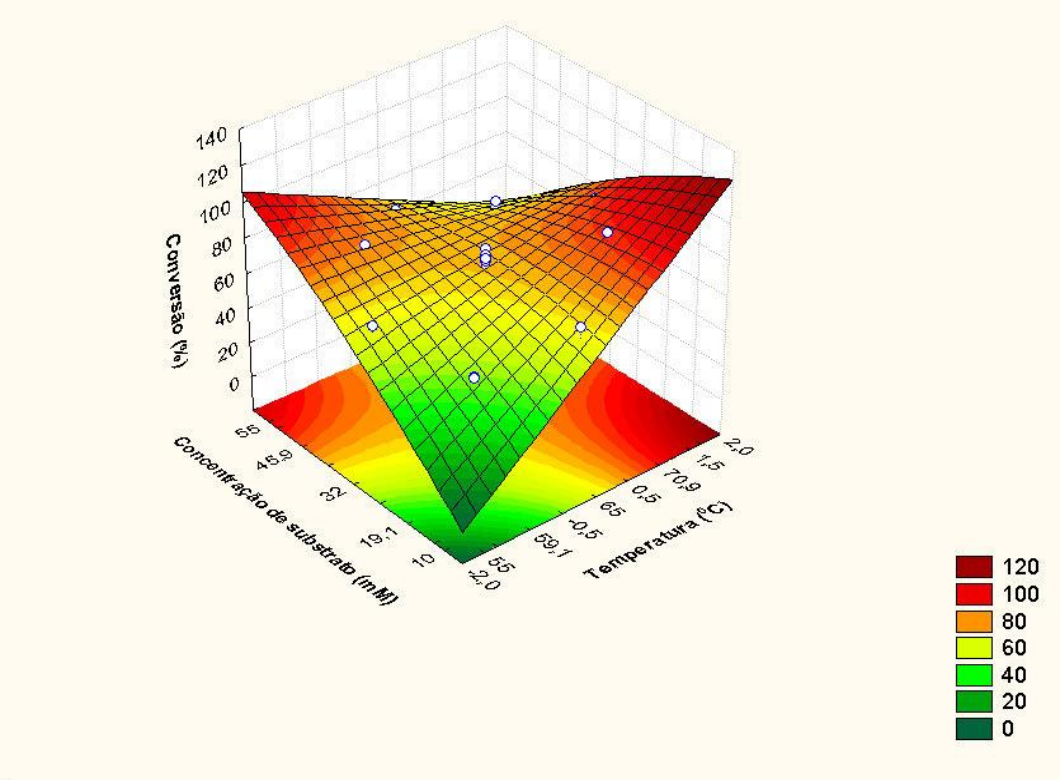


Figura 4. 9: Superfície de resposta (a) para a reação de esterificação da enzima RM IM e curva de contorno (b) em função da quantidade de enzima e da concentração de substrato. Em cada figura as variáveis não apresentadas foram fixadas no ponto central.

Para a enzima TLIM a necessidade de um modelo quadrático se torna evidente quando observamos a superfície de resposta e respectiva curva de contorno (Figura 4.10 a e b). Essa necessidade de curvatura é gerada devido ao efeito significativo da variável quadrática, quantidade de substrato. Enquanto que para as variáveis temperatura e quantidade de enzima, o efeito quadrático não foi significativo, o que pode ser observado pela linearidade de interação entre as variáveis nas figuras 4.11(a e b).

Na superfície ilustrada na Figura 4.10 a e superfície de contorno, Figura 4.10 b, que mostra a temperatura em função da concentração de substrato, podemos observar a susceptibilidade da enzima TL IM ao efeito da temperatura. Pois existem dois pontos de ótimo, quando se trabalha com uma baixa concentração de substrato (em torno de 20 mM) e quando a concentração de substrato é mais alta (em torno de 45 mM).



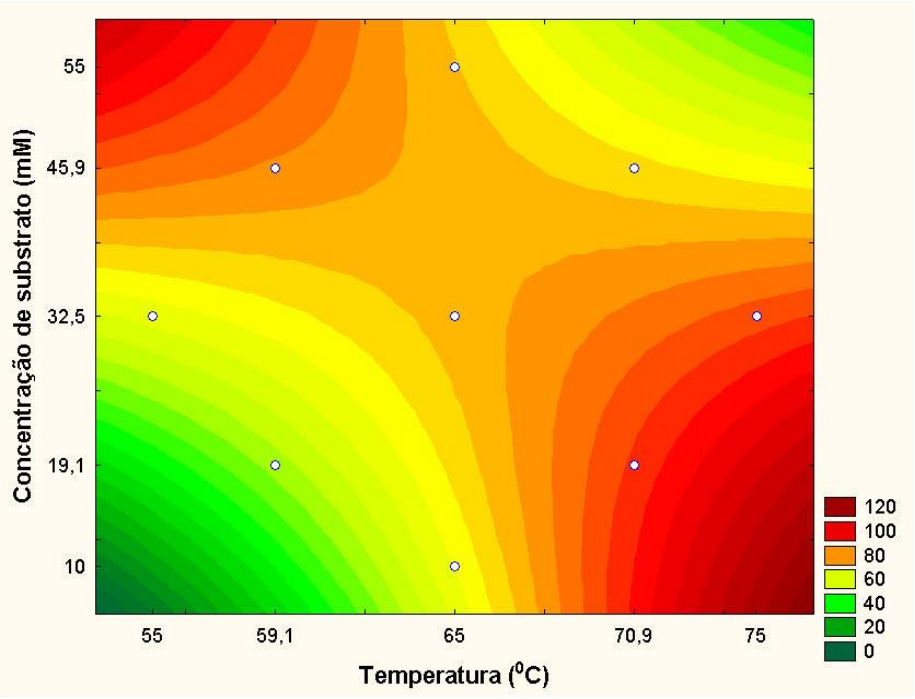
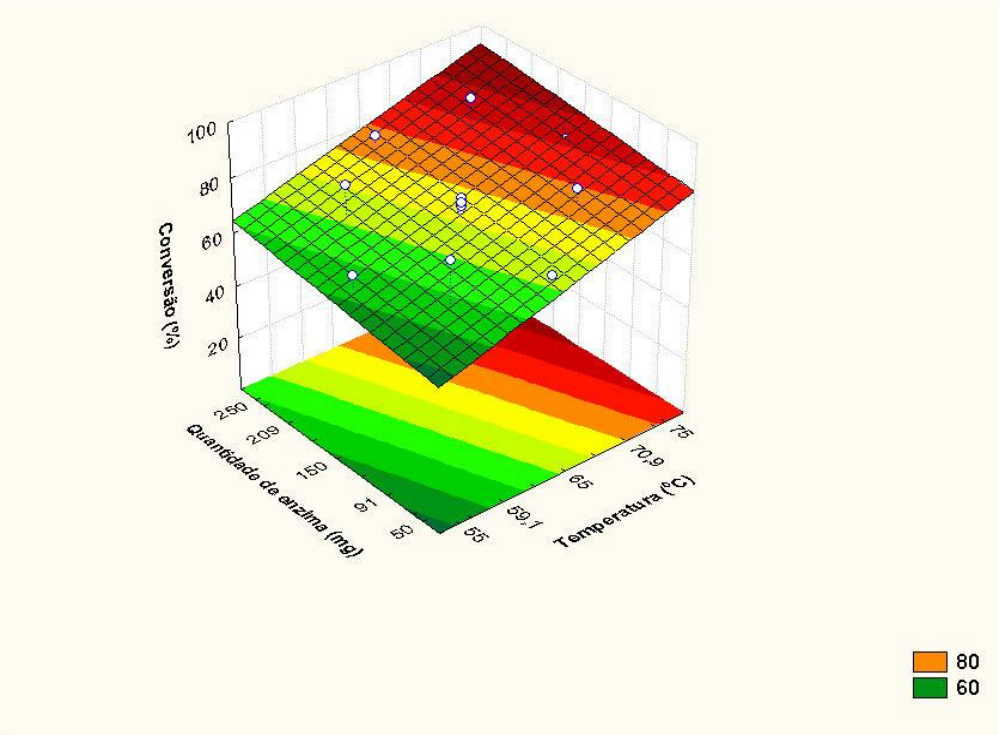


Figura 4. 10: Superfície de resposta (a) para a reação de esterificação com a enzima TLIM e curva de contorno (b) em função da temperatura e da concentração de substrato. Em cada figura as variáveis não apresentadas foram fixadas no ponto central.



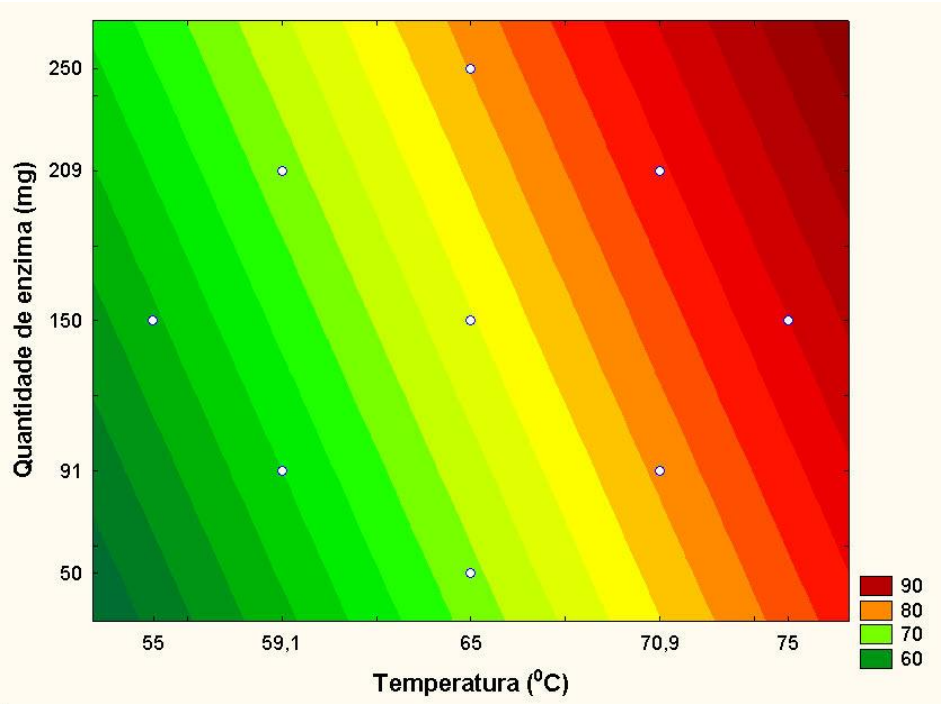


Figura 4. 11: Superfície de resposta (a) para a reação de esterificação com a enzima TL IM e curva de contorno (b) em função da quantidade de enzima e da temperatura. Em cada figura as variáveis não apresentadas foram fixadas no ponto central.

4.2.1.6. Capacidade de reuso das enzimas avaliadas

As lipases RM IM e TL IM foram investigadas quanto as suas capacidades de reutilização. Entre cada ciclo, a lipase foi lavada com n-heptano em papel de filtro, e posteriormente foi seca em estufa a 40^0C por 2 horas. Com o intuito de comparar os perfis biocatalíticos de cada lipase os experimentos foram realizados nas mesmas condições reacionais para as duas enzimas: 10 mM de substrato razão molar 1:1, temperatura de 60^0C e 250 mg de enzima. Cada reação foi realizada em duplicata em carbeto de silício com agitação magnética. A Figura 4.12 apresenta a conversão em função do número de bateladas da respectiva enzima para a esterificação do DAF com AP.

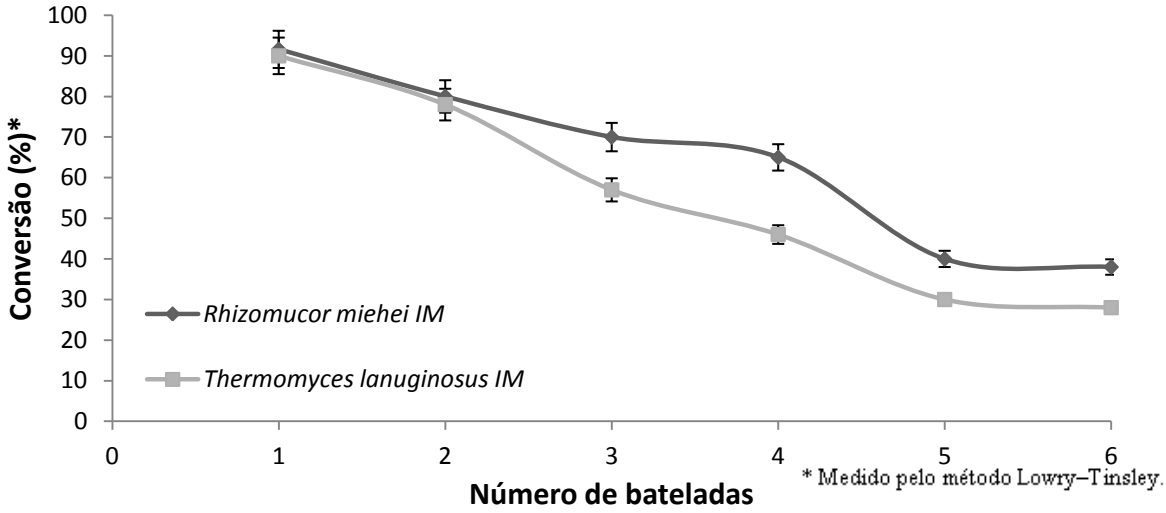
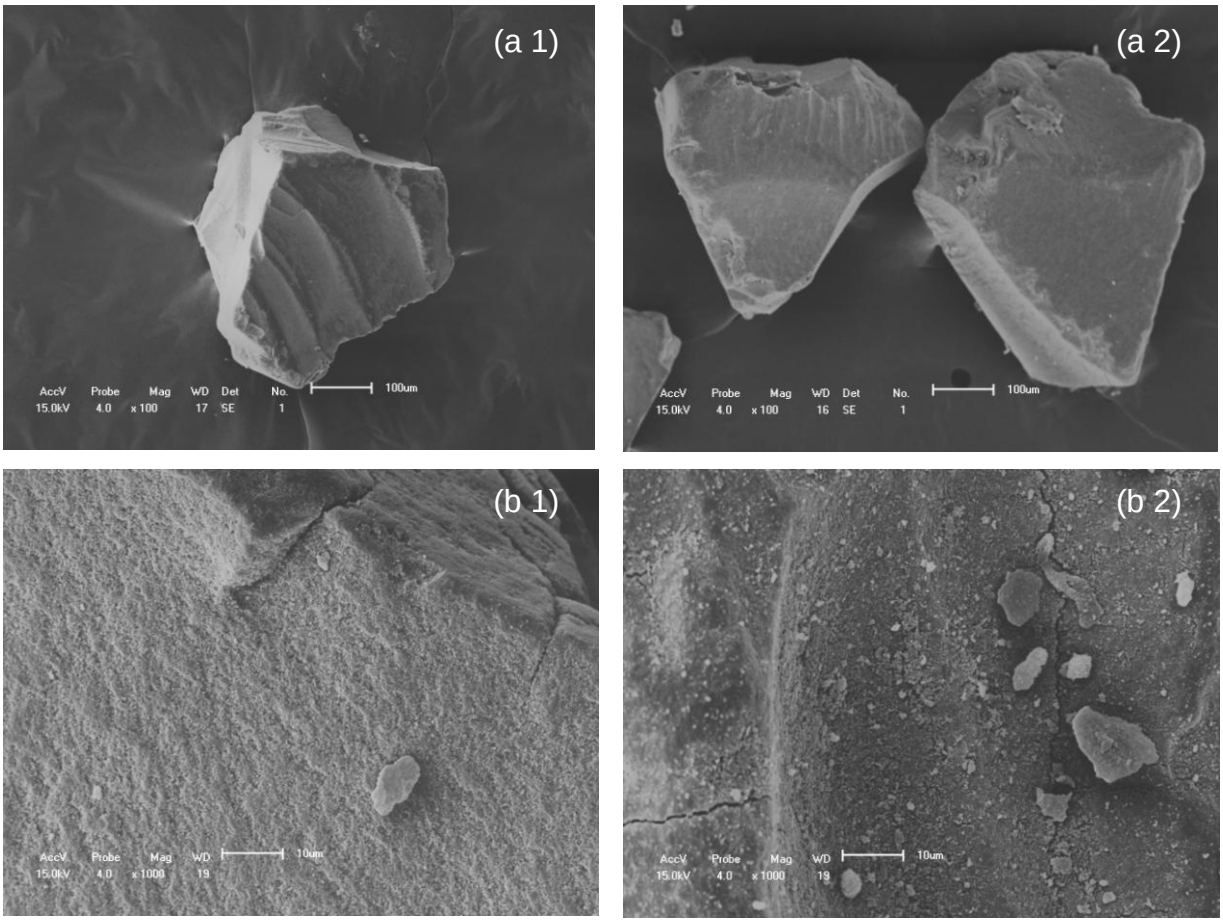


Figura 4. 12: Conversão em função do número de reutilização da enzima RM IM e TL IM para a esterificação do DAF com AP. Condições reacionais: 10 mM de substrato razão molar 1:1, temperatura de 60^0C, 250 mg de enzima.

Enzimas imobilizadas apresentam a vantagem de poderem ser reutilizadas, porém a sua atividade diminui com o aumento do número de reciclos. A Figura 4.12 mostra uma queda de conversão para ambas as enzimas nas bateladas subsequentes. Tal fenômeno pode ser explicado pela agitação magnética que confere um *stress* mecânico ao biocatalisador o que gera o cisalhamento do suporte da enzima com o decorrer das reações resultando na lixiviação da enzima para o meio reacional. Dessa forma, a enzima lixiviada torna-se mais susceptível às ações deletérias do solvente orgânico e aos efeitos de temperatura e agitação.

As enzimas avaliadas tiveram um comportamento de conversão remanescente similares até o segundo reuso (80,2 ± 2,3 e 78 ± 2,2 para RM IM e TL IM, respectivamente).

A partir da terceira até a sexta batelada observa-se uma maior diferença de conversão entre os dois biocatalisadores. No sistema em batelada, a agitação pode ser responsável por danos ao suporte das enzimas, tais como ranhuras, rachaduras, ou até mesmo cisalhamento de toda a estrutura, devido ao atrito entre as partículas do suporte. Assim, um maior dano ao suporte pode gerar maiores perdas de proteína ao meio reacional. Com o intuito de averiguar os danos causados pela agitação aos suportes, investigamos através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) a morfologia das enzimas avaliadas (Figura 4.13), antes e após o último reuso.



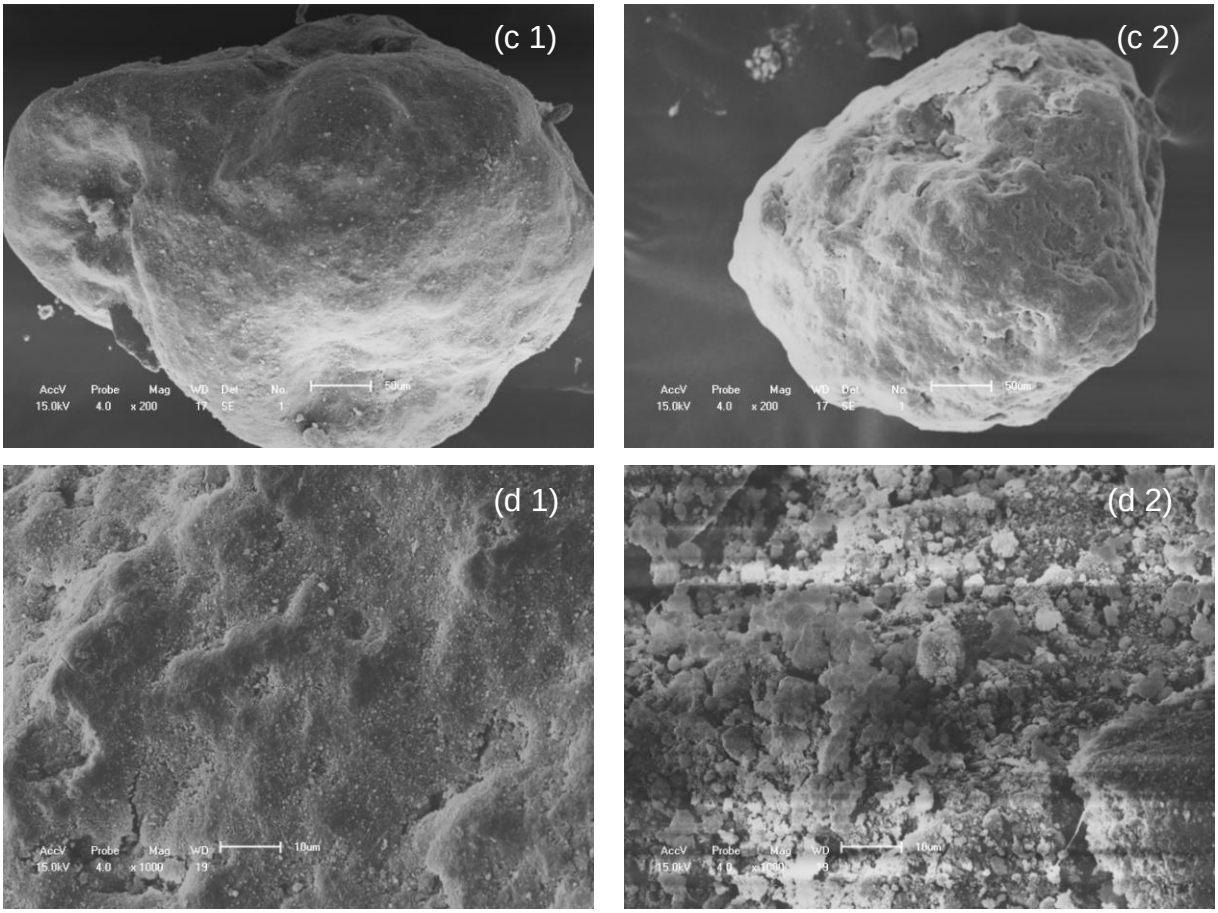


Figura 4. 13: Fotomicrografia do suporte da enzima RM IM (a e b) e TL IM (c e d) antes (1) e após (2) as seis bateladas. Aumento de 100x e 200x (a) e (c), respectivamente e aumento de 1000x (c e d). Condições reacionais: 10 mM de substrato razão molar 1:1, temperatura de 60^0C, 250 mg de enzima.

O suporte empregado na imobilização da lipase Lipozyme RM IM é uma resina macroporosa de troca aniônica, do tipo fenólica, no qual a enzima é fortemente ligada por adsorção, sem a utilização de agentes de ligação cruzada. O aspecto do produto é granular irregular (Figura 4.13 a) com tamanho de partícula entre 0,2 e 0,6 mm (NOVO NORDISK, 1992a e 1999). Enquanto que a enzima Lipozyme TL IM é imobilizada em sílica por ligação covalente através de tratamento com glutaraldeído. O seu suporte apresenta grânulos irregulares arredondados, conforme pode ser visualizado na Figura 4.13 c**,** com tamanho de partícula que variam entre 0,2 e 0,7 mm (CHRISTENSEN; KIRK; PEDERSEN, 2003; PENG et al, 2002).

Ao compararmos as morfologias do suporte antes e ao final das reações da enzima RM e TL (Figura 4.13 a,b e c,d), observa-se que aparentemente a agitação sucessiva ocasionou danos mais severos a enzima TL IM, desgastando mais o suporte da mesma. Os maiores danos ocasionados à TL podem levar a uma maior lixiviação de proteína ao meio reacional.

As deformações da superfície do suporte da lipase RM IM e TL IM podem ser mais bem visualizadas em um aumento de 1000 vezes, Figura 4.11 b e d, respectivamente, denotando a maior irregularidade da superfície da enzima TL.

4.2.1.7. Comparação das conversões obtidas pelo método Lowry-Tinsley e a massa de éster

Ao final do estudo de otimização da esterificação foi realizado um ensaio comparativo do método Lowry-Tinsley com o rendimento bruto (em massa) da reação. A comparação foi realizada nas condições reacionais previamente trabalhadas para a enzima RM IM: 55 mM de solução (1:1) de DAF e AP em 40 mL de heptano, 60^0C e 25% (p/v) de biocatalisador. Os testes foram feitos em duplicata e conduzidos em balão com agitação magnética durante 24 horas. No final do tempo reacional as reações foram lavadas três vezes com uma solução aquosa de carbonato de sódio (10%) e uma vez com água destilada. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 4.9.

Tabela 4. 9: Comparação das conversões obtidas pelo método Lowry-Tinsley e massa de éster.

Método	**Conversão (%)**
Lowry-Tinsley adaptado	91,9 ± 2,7
Rendimento em massa	75,4 ± 4,1

Os resultados mostraram uma diferença de 16,5% entre a conversão e o rendimento bruto da reação. Uma diferença pequena se levarmos em consideração as perdas durante o processo de isolamento e purificação da amostra, já que 4 lavagens foram realizadas. A análise por ressonância magnética nuclear revelou a eficiência do isolamento do produto devido ao alto grau de pureza apresentado, não necessitando de purificação por coluna de sílica (Apêndice Figura A 6).

4.2.1.8. Aumento de Escala e Estudo da Influência de um Reator de Tanque agitado

Com o intuito de avaliar a reprodutibilidade da esterificação do AP com o DAF em reatores em um volume maior do que o utilizado na otimização anterior catalisada pela enzima TL IM, a referida reação foi realizada em reator de tanque agitado (CSTR) Easy-Max

da Mettler Toledo, com um volume reacional de 100 mL. O sistema é composto por reator em jaqueta, para controle de temperatura e agitador mecânico (Figura 4.14).

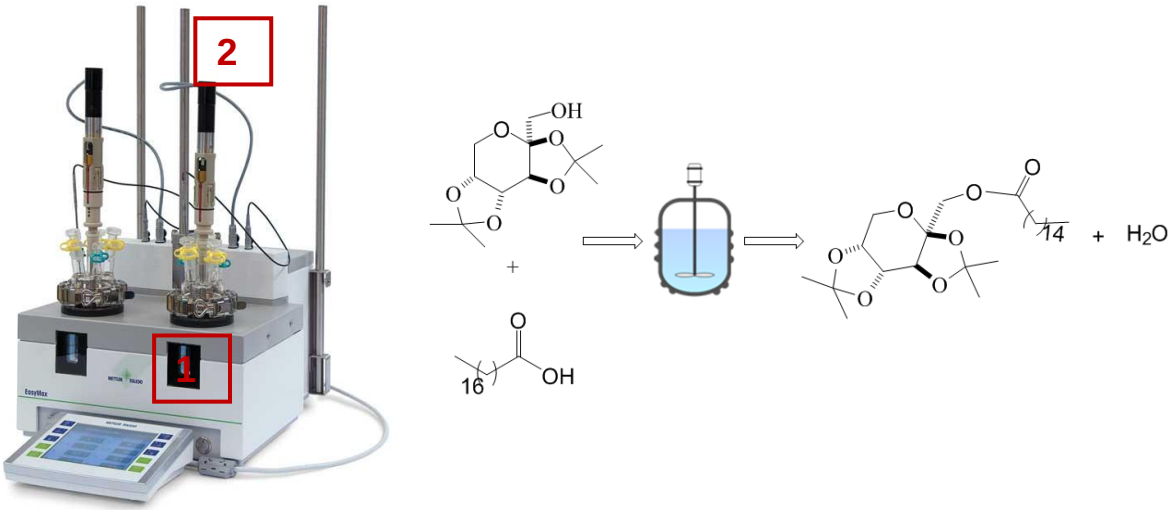


Figura 4. 14: Reator Easy Max, Metter Toledo. 1) reator jaquetado; 2- agitador mecânico.

A reação foi realizada em duplicata e as condições reacionais utilizadas foram as preconizadas pela otimização da enzima TL IM, Tabela 4.6, entrada 10. Tais condições reacionais foram as escolhidas, pois apresentaram uma boa conversão com quantidade intermediária de enzima. Assim, 100 mL de uma solução (1:1) de substratos (AP e DAF – 32,5 mM em n-heptano) foi previamente preparada e adicionada no reator submetido a temperatura de 55 °C. Como a variável agitação não foi avaliada na otimização anteriormente realizada, visto que as reações foram realizadas com agitação magnética em placa de carbeto de silício uma agitação de 300 rpm foi escolhida para ser aplicada na reação. Após a estabilização do sistema, a enzima (15% p/v) foi adicionada e as conversões monitoradas de 1 a 24 h (Figura 4.15).

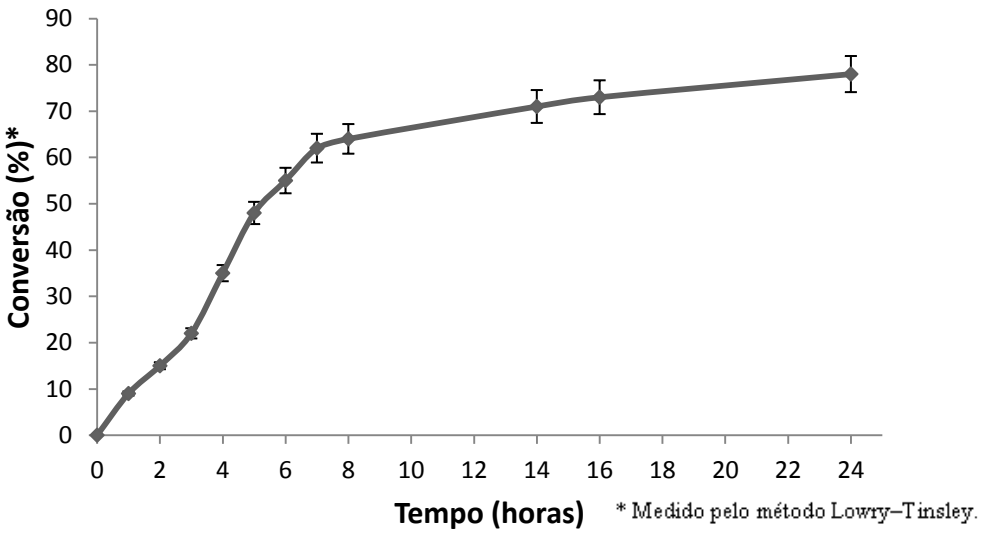


Figura 4. 15: Conversão em diferentes tempos da esterificação do DAF com AP em reator do tipo CSTR. Volume reacional de 100 mL, solvente n-heptano, 150 mg de enzima TL IM, 55^0C, 32,5 mM de substrato (1:1) e agitação de 300 rpm.

Nenhuma diferença significativa na conversão no ponto de 24 horas pode ser observada se comparado a reação realizada no planejamento com tal enzima nas mesmas condições reacionais (entrada 10, Tabela 4.6 - 82,6% de conversão). Isso demonstra que não houve problemas de transferência de massa ou limitações na dispersão do biocatalisador pelo meio reacional, devido à diferença de agitação utilizada.

No entanto, ao analisar os possíveis reciclos neste novo reator, observou-se que não foi possível manter a conversão no ciclo subsequente nas mesmas condições reacionais, pois uma perda em torno de 30% na conversão já no segundo ciclo foi observada. Tal resultado pode ser explicado pelo tipo de agitador empregado, que provavelmente, pode ter gerado um maior cisalhamento dos grãos do suporte, favorecendo o escape de proteínas para o meio reacional.

Assim, de modo geral, o aumento do volume reacional bem como a mudança de biorreator não propiciou diferença significativa na conversão comparado as reações otimizadas com agitação orbital em volume de 1 mL.

4.2.1.9. Dessorção da Lipase de *Rizhomucor miehei* de seu suporte

Para se avaliar a eficiência de um biorreator, é interessante realizar o cálculo da produtividade final gerada do sistema que relaciona a quantidade de produto gerado com o tempo reacional, além da quantidade de biocatalisador utilizado. Portanto, para fazer este tipo

de correlação, é importante conhecer a real quantidade de enzima contida no suporte utilizado na reação.

Trabalhos anteriores, como o de Cabrera et al (2008), demonstram que é possível realizar a dessorção da enzima N435 de seu suporte. Estes experimentos foram realizados com detergentes, como o Triton X-100, sugerindo que esta enzima é imobilizada, principalmente por interações hidrofóbicas com o suporte. Costa et al (2011) reproduziram a metodologia descrita por Cabrera e colaboradores (2009), atingindo resultados satisfatórios para o estudo de dessorção. Segundo a Novo Nordisk (1992), nome antigo da atual Novozymes®, fabricante do biocatalisador Novozym 435, a lipase produzida (*Candida antarctica*) é imobilizada em resina macroporosa de troca iônica do tipo acrílica, sob protocolo desconhecido.

A mesma fonte citada anteriormente revela que a preparação enzimática Lipozyme RM IM é imobilizada em uma resina macroporosa de troca aniônica, do tipo fenólica, no qual a enzima é ligada por adsorção, sem a utilização de agentes de ligação cruzada (Novo Nordisk, 1992a e 1999). Portanto, pelo fato da enzima em questão também ser imobilizada em um tipo de resina de troca iônica, e a imobilização ser realizada sem a ação de formadores de ligação cruzada, acredita-se, que grande parte das interações entre enzima e suporte sejam também proporcionadas por interações hidrofóbicas. Neste item, serão discutidos então, os resultados obtidos nos testes de dessorção da lipase de *Rhizomucor miehei* de seu suporte, utilizando a metodologia descrita por Cabrera et al (2009) e reproduzida por Costa et al (2011).

Teste com diferentes concentrações de Triton X-100 foram realizados para encontrar a quantidade de surfactante que seria necessária para retirar a enzima do suporte. Isto foi realizado através da medição da atividade de hidrólise pelo método de p-nitrofenol e pela medida da quatidade de proteína pelo método de Bradford utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Bradford 1976). Após extrações com soluções de diferentes concentrações de Triton X-100, a atividade do sobrenadante foi medida e comparada à atividade inicial da enzima indicando se toda a enzima foi retirada ou não do suporte Figura 4.16.

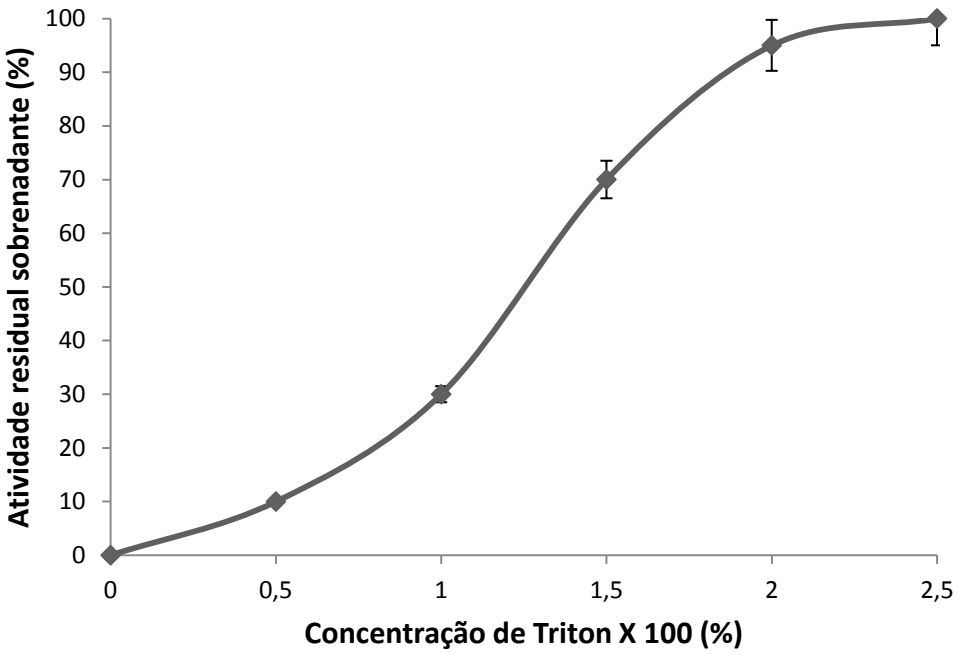


Figura 4. 16: Atividade Residual do sobrenadante de acordo com a concentração de Triton X-100 utilizada na dessorção da lipase RM IM de seu suporte, segundo a metodologia descrita por Cabrera et al (2008).

A Figura 4.16 mostra que uma solução de 2,5% (v/v) foi capaz de retirar toda a enzima suportada, de acordo com o ensaio de atividade do sobrenadante. A concentração de surfactante necessária é um pouco maior do que a relatada por Cabrera et al (2008), que utilizou uma solução de 2% v/v de Triton X-100 para a dessorção da enzima Novozym 435. Isto pode ter relação com o tipo de suporte utilizado, e a intensidade das interações com a enzima. Cabrera et al (2008) demonstra em seu trabalho, a quantidade máxima de lipase B de *Candida antarctica* imobilizada, de acordo com o suporte utilizado, como mostra a Tabela 4.10.

Tabela 4. 10: Quantidade de proteína imobilizada de acordo com o suporte imobilizado. Adaptado de Cabrera et al (2008).

Suporte	Quantidade de proteína imobilizada (mg/g de suporte)
Resina acrílica (Novozym 435)	30 ± 2
Octil-Agarose	23 ± 2
Octadecil-Sepabeats	20 ± 1,5
Butil-agarose	22 ± 2

Como visto na Tabela 4.10, o valor da quantidade de proteína lixiviada do suporte é coerente com os resultados obtifdos por Cabrera et al (2008). Assim, a quantidade de enzima de *Rhizomucor miehei* imobilizada na resina de troca iônica em questão, foi assumida por ser 24,3 mg de enzima/g de suporte para a realização dos cálculos de produtividade dos sistemas estudados.

4.2.2. Reação catalisada pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel

4.2.2.1 Teste formação da micela reversa (microemulsão)

A formação das micelas foi realizada pelo método de injeção (MOULIK; PAUL, 1998) e confirmada pelo seu perfil de distribuição de dimensão de partículas pela técnica de Difusão Dinâmica de Luz (*Dynamic Light Scaterling* – DLS). Os resultados podem ser visualizados na Figura 4.17 para a enzima utilizada na catálise das reações imobilizadas em micela reversa (Cal B).

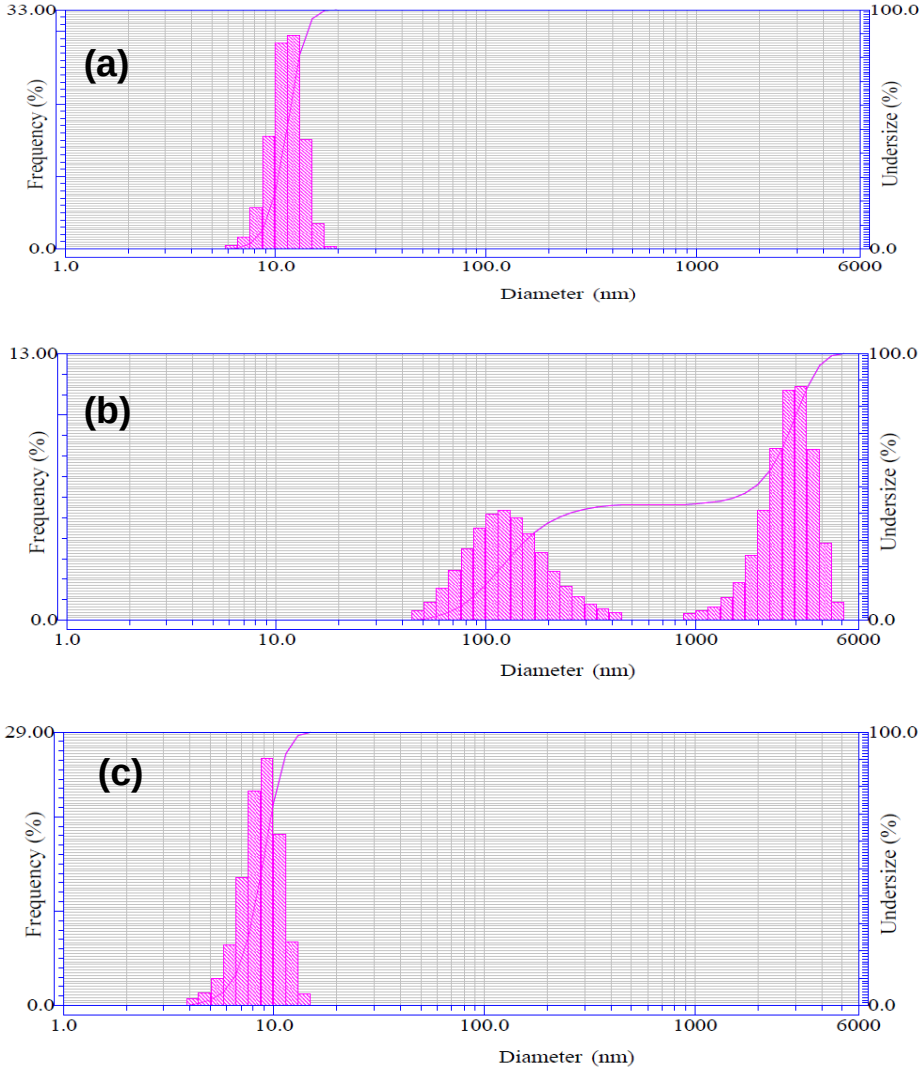


Figura 4. 17: Distribuição do tamanho das partículas da solução 0,1 M AOT/isooctano (a), CAL B na sua solução tampão (b) e micela reversa da enzima CAL B (c).

Como pode ser visualizado na Figura 4.17b, a enzima Cal B possui diâmetros de partículas variados devido as isoformas que apresenta (QIAN et al, 2009) enquanto que a solução com o surfactante possui um diâmetro definido (Figura 4.17a). Quando a lipase é colocada em contato com o AOT/isooctano, a solução resultante passa de turva para opticamente transparente após alguns segundos de agitação, devido ao aprisionamento do biocatalisador pelo tensoativo. A solução opticamente transparente apresenta distribuição de partículas uniforme, em torno de 10 nm como pode ser visualizado na Figura 4.17c, evidenciando a imobilização da enzima na micela reversa.

4.2.2.2. Imobilização da microemulsão da Cal B em organogel

A utilização do biocatalisador em micela reversa é uma alternativa atraente, visto que o ambiente de confinamento da enzima é propício para aumentar a atividade catalítica da lipase. Porém, a enzima permanece ainda em sua forma livre, apenas envolta pelo surfactante. Isso inviabiliza a reutilização da enzima e a recuperação dos produtos da mistura reacional. Dessa maneira a microemulsão foi imobilizada em uma matriz gelatinosa que possibilitou o reuso do biocatalisador através de uma simples filtração.

Todas as reações catalisadas pela lipase Cal B imobilizadas em micelas reversas foram suportadas em hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), um organogel que mantém a estabilidade e atividade catalítica do biocatalisador. A grande vantagem deste sistema é a possibilidade de manutenção da atividade catalítica da enzima em microemulsão devido ao efeito da ¨dupla¨ imobilização da enzima por estar imobilizada na micela reversa (microemulsão) e na matriz polimérica (ZOUMPANIOTI et al, 2010). A microemulsão suportada em organogel ou do inglês *microemulsion-based organogels* (MBGs), facilitou a manipulação do biocatalisador nas reações realizadas. A imobilização da microemulsão em gel de HPMC previamente hidratado, nas proporções descritas na seção experimental gerou uma matriz de aspecto semissólido opaco, como demonstrado na Figura 4.18a. O grão do organogel quando hidratado intumesce e forma uma rede cristalina que aprisiona a água, mas permite a fluidez do solvente. O grumo do gel tem a forma de uma vesícula rugosa e porosa, como pode ser observado na microscopia eletrônica de varredura (Figura 4.18b).

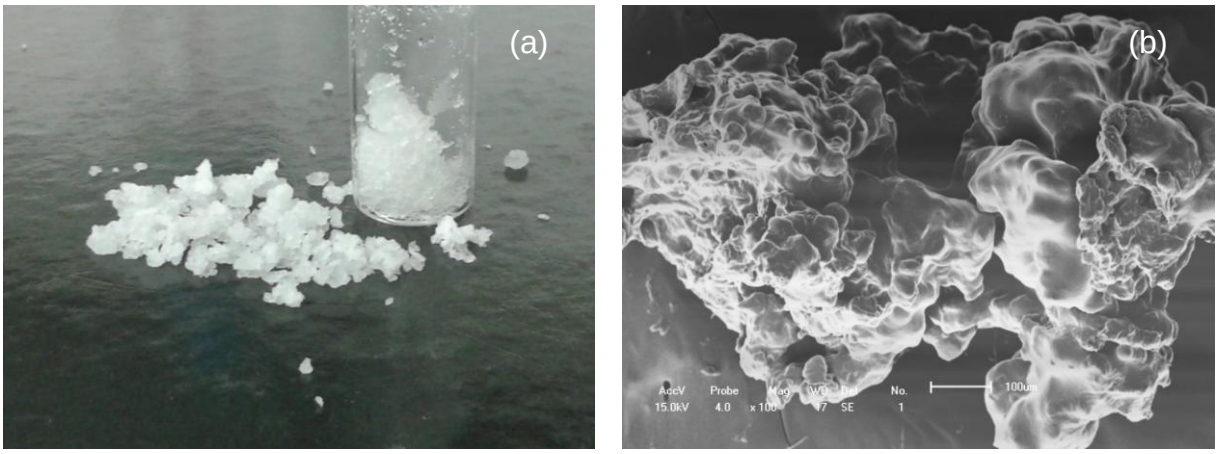


Figura 4. 18: Matriz de organogel de HPMC contendo a microemulsão AOT/CaL B (a) e microscopia eletrônica de varredura, aumento de 100x do grumo do gel.

A enzima Cal B foi escolhida para realizar as reações em MBGs, pois apresentou resultados satisfatórios na reação de esterificação do ácido esteárico com (R,S)-1,2-O-iso-propilideno glicerol (solketal) em trabalho prévio realizado pelo nosso grupo (ITABAIANA Jr. et al, 2013).

4.2.2.3. Avaliação inicial dos parâmetros reacionais usando Delineamento Fatorial Fracionário (DFF) da esterificação catalisada pela enzima Cal B em MBGs

Para as reações em batelada, primeiramente foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para a reação de esterificação catalisada pela Cal B imobilizada em MBGs realizada em heptano e em tolueno. As variáveis independentes testadas foram: temperatura, quantidade de enzima, concentração de substrato, quantidade de peneira molecular e a agitação variando em dois níveis.

Levando em consideração que o tempo de reação corresponde a uma variável que exerce grande influência sobre o processo reacional podendo mascarar os efeitos reais de outras variáveis (RODRIGUES; IEMMA, 2005) mais uma vez, nós decidimos avaliar univariavelmente a influência do tempo na produção de ésteres para evitar detrimento dos dados estatísticos. Assim, reagiu-se o AP com o DAF catalisada por 180 ug de Cal B imobilizada em MBG durante 5 horas sob as seguintes condições: pressão atmosférica, temperatura de 40°C, 10% (p/v) de peneira molecular, 40 mM de ácido palmítico e DAF (1:1) e 150 rpm de agitação. As reações foram monitoradas e amostras foram coletadas em momentos selecionados para a investigação em termos de produção de ésteres. A conversão (%) avaliada durante o referido período pode ser verificada para os dois solventes utilizados na Figura 4.19.

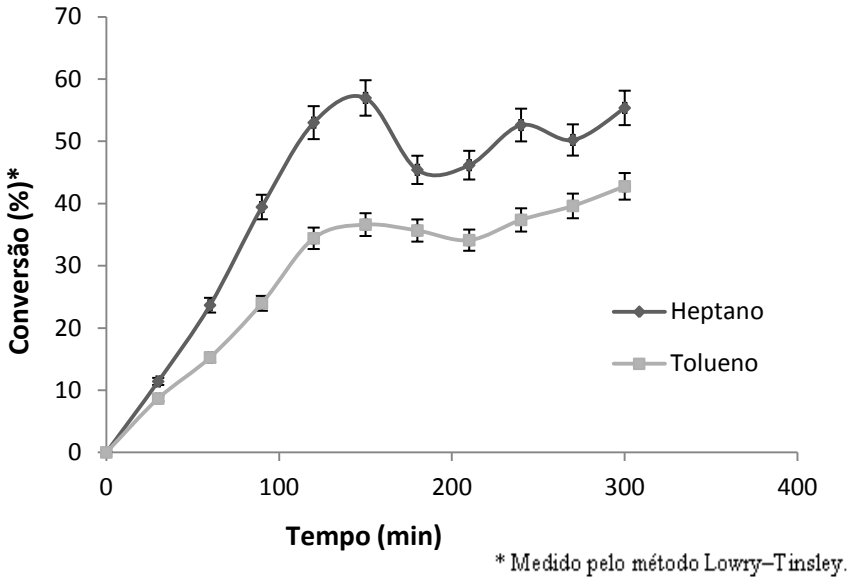


Figura 4. 19: Conversão da esterificação (%) do DAF com AP catalisada pela enzima Cal B em MBG em diferentes tempos reacionais. Condição reacional: 40 mM de ácido palmítico e DAF (1:1), temperatura de 40 ^{0}C, 10% (p/v) de peneira molecular e 150 rpm de agitação.

Tanto para n-heptano quanto para tolueno, a melhor conversão onde a enzima ainda está em velocidade inicial, foi obtida após 2 horas de tempo reacional, 52,9 ± 2,7 e 34,4 % ± 3,1, respectivamente. Portanto, 2 horas foi determinado como tempo reacional para o estudo da influência das variáveis nos planejamentos de experimentos

O delineamento fatorial fracionário (DFF) 2^{5-1} foi utilizado para indicar quais as variáveis deveriam ser incluídas no planejamento seguinte, bem como para definir os novos níveis dessas variáveis. É interessante ressaltar aqui que a variável peneira molecular (P. M.), ao contrário da esterificação com as enzimas imobilizadas comerciais, foi avaliada nesses experimentos catalisados pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em HPMC, pois as reações nesta etapa apresentam água, visto que esta é usada no intumescimento do gel. Os dados experimentais e a matriz para o DFF para os dois solventes testados são apresentados na tabela 4.11. O DFF consiste em dezesseis pontos fatoriais e três repetições do ponto central para o cálculo do erro experimental.

Tabela 4. 11: Matriz do delineamento fatorial fracionário (DFF) 2^{5-1} com valores codificados e resultados de conversão para cada experimento realizado em heptano e tolueno.

Exp.	T (^{0}C)	E (µg)	S (mM)	P. M. (%)[a]	Ag (rpm)	Hept. (%)[b]	Tol. (%)[b]
1	-1 (40)	-1 (30)	-1 (5)	-1 (10)	+1 (250)	62	64,1
2	+1 (50)	-1 (30)	-1 (5)	-1 (10)	-1 (50)	64,4	54,7
3	-1 (40)	+1 (180)	-1 (5)	-1 (10)	-1 (50)	56,1	52,8
4	+1 (50)	+1 (180)	-1 (5)	-1 (10)	+1 (250)	59,4	59,9
5	-1 (40)	-1 (30)	+1 (50* e 100**)	-1 (10)	-1 (50)	49,7	2,2
6	+1 (50)	-1 (30)	+1 (50* e 100**)	-1 (10)	+1 (250)	58,4	30,9
7	-1 (40)	+1 (180)	+1 (50* e 100**)	-1 (10)	+1 (250)	66	27,1
8	+1 (50)	+1 (180)	+1 (50* e 100**)	-1 (10)	-1 (50)	25,8	42,2
9	-1 (40)	-1 (30)	-1 (5)	+1 (20)	-1 (50)	56,1	56,6
10	+1 (50)	-1 (30)	-1 (5)	+1 (20)	+1 (250)	64,8	64,1
11	-1 (40)	+1 (180)	-1 (5)	+1 (20)	+1 (250)	56,7	49,0
12	+1 (50)	+1 (180)	-1 (5)	+1 (20)	-1 (50)	62,1	50,9
13	-1 (40)	-1 (30)	+1 (50* e 100**)	+1 (20)	+1 (250)	59,3	14,8
14	+1 (50)	-1 (30)	+1 (50* e 100**)	+1 (20)	-1 (50)	62,6	42,9
15	-1 (40)	+1 (180)	+1 (50* e 100**)	+1 (20)	-1 (50)	41	18,9
16	+1 (50)	+1 (180)	+1 (50* e 100**)	+1 (20)	+1 (250)	55,9	17,9
17	0 (45)	0 (105)	0 (27,5* e 52,5**)	0 (15)	0 (150)	46,2	35,9
18	0 (45)	0 (105)	0 (27,5* e 52,5**)	0 (15)	0 (150)	46,2	34,9
19	0 (45)	0 (105)	0 (27,5* e 52,5*)	0 (15)	0 (150)	44	33,8

[a] p/v
[b] Medido pelo método Lowry–Tinsley.
* Em heptano
** Em tolueno

Como pode ser visualizado na Tabela 4.11, resultados de conversão moderados foram obtidos para ambos os solventes na esterificação da Cal B em MBG entre DAF e AP. Um pequeno aumento dos resultados pode ser visto nas reações em n-heptano. Tolueno e n-heptano têm diferentes valores de log P, 2,72 e 4,27, respectivamente, e isto pode causar diferenças no comportamento catalítico da enzima. Atividade e estabilidade enzimática mais alta são geralmente observadas em solventes com baixa polaridade (log de P mais altos). Altos valores de log P alteram a conformação tridimensional da enzima proporcionando uma boa atividade catalítica (AKOH, MUTUA, 1994; LOUGHLIN, 2000).

A Tabela 4.12 mostra o efeito dos parâmetros estimados para as variáveis independentes avaliadas no DFF 2^{5-1} para ambos os solventes testados. Como pode ser observado na Tabela 4.12 nas reações realizadas com n-heptano, a variável quantidade de enzima, concentração de substrato e agitação apresentaram um $p<0,05$ e assim, foram selecionadas para serem otimizadas no delineamento composto central rotacional (DCCR). Temperatura e peneira molecular não foram significativas por apresentarem valores de $p>0,05$ e, portanto foram mantidas constantes em 50 ^{0}C e 15% respectivamente, no delineamento subsequente (DCCR).

Para as reações realizadas em tolueno, as variáveis significativas foram temperatura, concentração de substrato e peneira molecular ($p < 0,05$) e, portanto utilizadas no DCCR. Quantidade de enzima e a agitação não foram significativas em tolueno e foram mantidas constantes em 105 µg e em 150 rpm no delineamento subsequente. A curvatura foi significativa para ambos os solventes ($p = 0,0054$ e 0,0131 para n-heptano e tolueno, respectivamente), dessa maneira pontos axiais foram adicionados para a construção de um modelo quadrático.

Tabela 4. 12: Efeito estimado dos parâmetros do delineamento fatorial fracionário (DFF) 2^{5-1} das reações de esterificação em MBG para ambos os solventes avaliados.

Variável	**Efeito**		**Valor de p**	
	n-heptano	**tolueno**	**n-heptano**	**tolueno**
Média	56,2825	40,5706	<0,0001*	<0,0001*
Curvatura	-21,6317	-11,4079	0,0054*	0,0131*
Temperatura	0,8275	9,7637	0,3224	0,0028*
Quantidade de enzima	-6,7750	-1,4337	0,0086*	0,1120
Concentração de substrato	-7,8900	-31,9163	0,0064*	0,0002*
Peneira Molecular	2,1025	-2,3437	0,0803	0,0467*
Agitação	8,1000	0,8212	0,0060*	0,2583

*Estatisticamente significativo com 95% de confiança.

A variável peneira molecular apresentou diferentes significâncias para os solventes utilizados. Como pode ser observada na Tabela 4.11, ela apresentou efeito significativo nas reações realizadas em tolueno, enquanto que para as reações em n-heptano isso não foi observado ($p = 0,0803$ e 0,0467 para n-heptano e tolueno, respectivamente).

4.2.2.4. Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Após o delineamento fatorial fracionário um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi empregado para encontrar as condições ótimas que maximizem o rendimento de conversão da reação de esterificação catalisada pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em MBG para a síntese do éster em ambos os solventes (tolueno e n-heptano). A matriz experimental com os seus valores codificados e sua respectiva conversão para a esterificação realizada em n-heptano são apresentados na Tabela 4.13. No DCCR, ambas as variáveis selecionadas foram variadas em cinco níveis, resultando em 17 experimentos, incluindo oito pontos fatoriais e três pontos centrais, permitindo calcular o erro experimental. Para ajustar um modelo de segunda ordem, quatro pontos axiais com a mesma distância a partir do ponto central foram adicionadas à matriz para este planejamento.

Tabela 4. 13: Matriz de experimentos do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com valores codificados e os respectivos resultados de conversão para as reações em MBG realizadas em n-heptano.

Experimento	Variável			Conversão (%)*
	Quantidade de enzima (µg)	Concentração de substrato (mM)	Agitação (rpm)	
1	-1 (54,3)	-1 (10,1)	-1 (180,4)	61,9
2	-1 (54,3)	-1 (10,1)	+1 (269,6)	63,6
3	-1 (54,3)	+1 (24,1)	-1 (180,4)	35,5
4	-1 (54,3)	+1 (24,1)	+1 (269,6)	49,4
5	+1 (125,7)	-1 (10,1)	-1 (180,4)	71,8
6	+1 (125,7)	-1 (10,1)	+1 (269,6)	70,4
7	+1 (125,7)	+1 (24,1)	-1 (180,4)	29,1
8	+1 (125,7)	+1 (24,1)	+1 (269,6)	26,2
9	-1,68 (30)	0 (17,5)	0 (225)	66,7
10	1,68 (150)	0 (17,5)	0 (225)	67,7
11	0 (90)	-1,68 (5)	0 (225)	88,3
12	0 (90)	1,68 (30)	0 (225)	19,0
13	0 (90)	0 (17,5)	-1,68 (150)	62,5
14	0 (90)	0 (17,5)	1,68 (300)	71,0
15	0 (90)	0 (17,5)	0 (225)	60,6

16	0 (90)	0 (17,5)	0 (225)	61,6
17	0 (90)	0 (17,5)	0 (225)	61,6

Condições mantidas constantes: temperatura (50^0C) e quantidade de peneira molecular (15%).
* Medido pelo método Lowry–Tinsley..

Os resultados apresentados na Tabela 4.13 mostram que a melhor conversão obtida na otimização das condições reacionais que proporcionam o produto desejado com 88,3% de conversão foi o experimento 11. Quando se compara a entrada 11 e 12, experimentos diferindo apenas na concentração do substrato utilizado, pode-se observar o efeito negativo da referida variável independente. Aumentando a concentração de substrato de 5 para 30 mM, há um decréscimo de conversão de 88,3 para 19%. Isso pode ser confirmado quando se observa os efeitos estimados (Figura 4.20), em que a variável concentração de substrato apresenta um efeito negativo significativo de 114.

O efeito negativo da variável concentração de substrato na faixa estudada pode ter ocorrido, pois uma diminuição da concentração de substrato gera um aumento do contato do substrato com o sítio ativo da enzima devido à melhoria gerada na homogeneidade no meio reacional. Outra explicação plausível é de que poderia existir uma pequena inibição da enzima através de concentrações elevadas de substrato (JUNIOR et al, 2011). A figura 4.20 mostra também que todos os efeitos lineares das variáveis independentes foram estatisticamente significativos com 95% de confiança por apresentarem um valor de $p < 0,05$ pelo teste t de *Student*.

Uma produtividade de 66,8 g de éster . $h^{-1}.g^{-1}$ de proteína foi obtida no experimento 14 (Tabela 4.13), reação catalisada com 90 µg de enzima Cal B imobilizada em MBG resultando em 71% de conversão em 2 horas de reação. Esta é uma alta produtividade quando comparada com a reação da enzima RM IM (experimento 2 da Tabela 4.4) que apresenta uma produtividade de 8.1 g de éster . $h^{-1}.g^{-1}$ de proteína. Esta alta atividade catalítica da lipase pode ser atribuída à melhoria da "performance" da enzima na interface solvente orgânico/água propiciada pelo encapsulamento da enzima na micela reversa. Além disso, a dupla imobilização da enzima pode gerar um efeito de proteção aos efeitos deletérios do solvente, melhorando a atividade catalítica da enzima (STAMATIS, XENAKIS, KOLISIS, 1999; ZOUMPANIOTI, STAMATIS, XENAKIS, 2010).

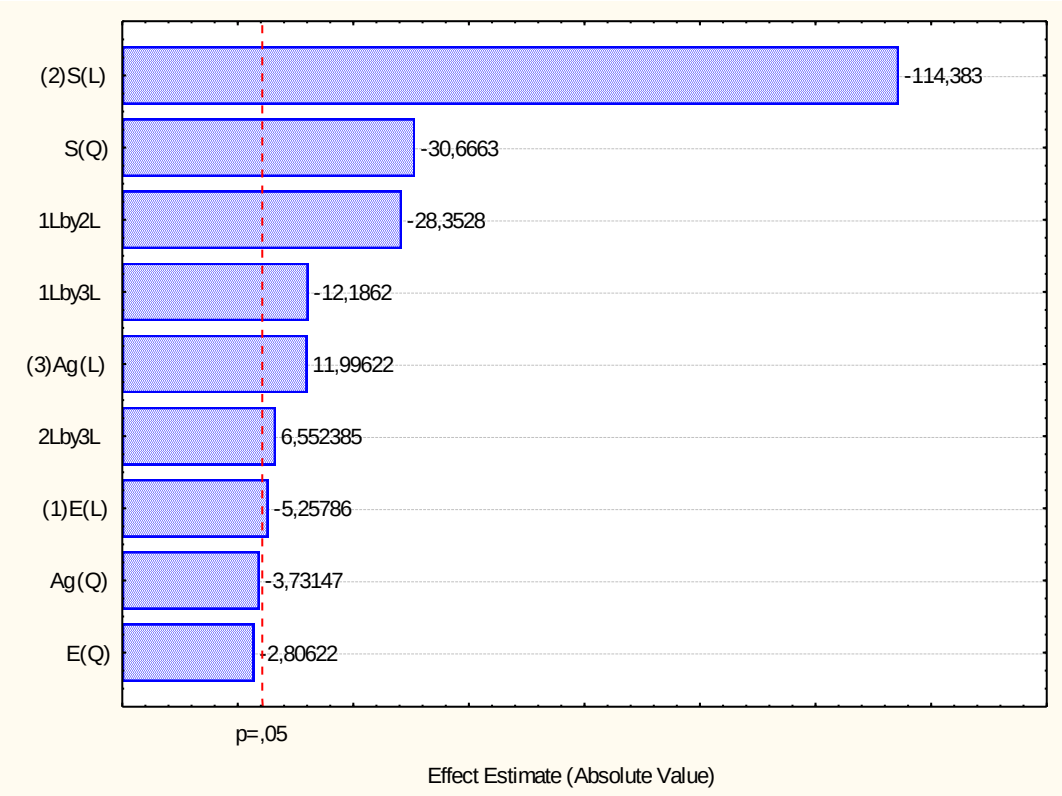


Figura 4. 20: Gráfico de Pareto do delineamento composto central rotacional (DCCR) das reações em MBG realizadas em n-heptano mostrando a significância da variável temperatura, T; concentração de substrato, S; quantidade de enzima, E e agitação, Ag dos efeitos lineares, L e quadráticos, Q.

Semelhante ao procedimento adotado para as reações realizadas em n-heptano foram usadas as variáveis com maior influência no processo de esterificação em tolueno num delineamento composto central rotacional (DCCR) utilizado para obter as condições ótimas para a síntese do éster do DAF. A Tabela 4.14 mostra o planejamento fatorial 2^3 para as reações em tolueno com as conversões correspondentes. Mais uma vez, os 8 primeiros experimentos são suficientes para determinar o modelo matemático e parâmetros estatísticos relacionados ao delineamento 2^3, do experimento 9 ao 14 são mostrados os pontos axiais para a construção do modelo quadrático e do 15 ao 17 são as triplicatas dos pontos centrais para a obtenção do erro experimental.

Tabela 4. 14: Matriz de experimentos do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com valores codificados e os respectivos resultados de conversão para as reações catalisadas pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em MBG realizadas em tolueno.

Experimento	Variável			Conversão (%)[a]
	Temperatura (^{0}C)	Concentração de substrato (mM)	Peneira molecular (%)[b]	
1	-1 (47)	-1 (10,1)	-1 (12,02)	54,8
2	-1 (47)	-1 (10,1)	+1 (17,98)	60
3	-1 (47)	+1 (24,9)	-1 (12,02)	34,8
4	-1 (47)	+1 (24,9)	+1 (17,98)	47,4
5	+1 (53)	-1 (10,1)	-1 (12,02)	53
6	+1 (53)	-1 (10,1)	+1 (17,98)	61,7
7	+1 (53)	+1 (24,9)	-1 (12,02)	34,8
8	+1 (53)	+1 (24,9)	+1 (17,98)	44,8
9	-1,68 (45)	0 (17,5)	0 (15)	41,2
10	1,68(55)	0 (17,5)	0 (15)	32,1
11	0 (50)	-1,68 (5)	0 (15)	71,2
12	0 (50)	1,68 (30)	0 (15)	33,9
13	0 (50)	0 (17,5)	-1,68 (10)	27,7
14	0 (50)	0 (17,5)	1,68 (20)	41,9
15	0 (50)	0 (17,5)	0 (15)	42,5
16	0 (50)	0 (17,5)	0 (15)	41,2
17	0 (50)	0 (17,5)	0 (15)	41,2

Condições mantidas constantes: quantidade de enzima (105 µg) e agitação (150rpm).
[a] Medido pelo método Lowry–Tinsley.
[b]p/v

Pode-se observar na Tabela 4.14 o efeito positivo da variável peneira molecular. Quando se observa os experimentos 13 e 14, ambas reações conduzidas nas mesmas condições reacionais, variando apenas a quantidade de peneira de 10 para 20% nota-se a importância da presença da peneira molecular na reações realizadas em tolueno. Esta mudança na quantidade de peneira molecular gerou um aumento na conversão de 27,7% para 41,9%.

Como ocorrido nas reações realizadas em n-heptano, a variável independente concentração de substrato apresentou efeito negativo na faixa estudada. Esse efeito pode ser mais bem visualizado quando se analisa os experimentos 11 e 12 da Tabela 4.14. O aumento

da concentração de substrato (de 5 para 30 mM) gerou uma redução na conversão de 71,2 para 33,9 %. A concentração de substrato foi a variável que teve a maior influência entre as variáveis independentes avaliadas nas reações em tolueno, como pode ser visualizado na Figura 4.21.

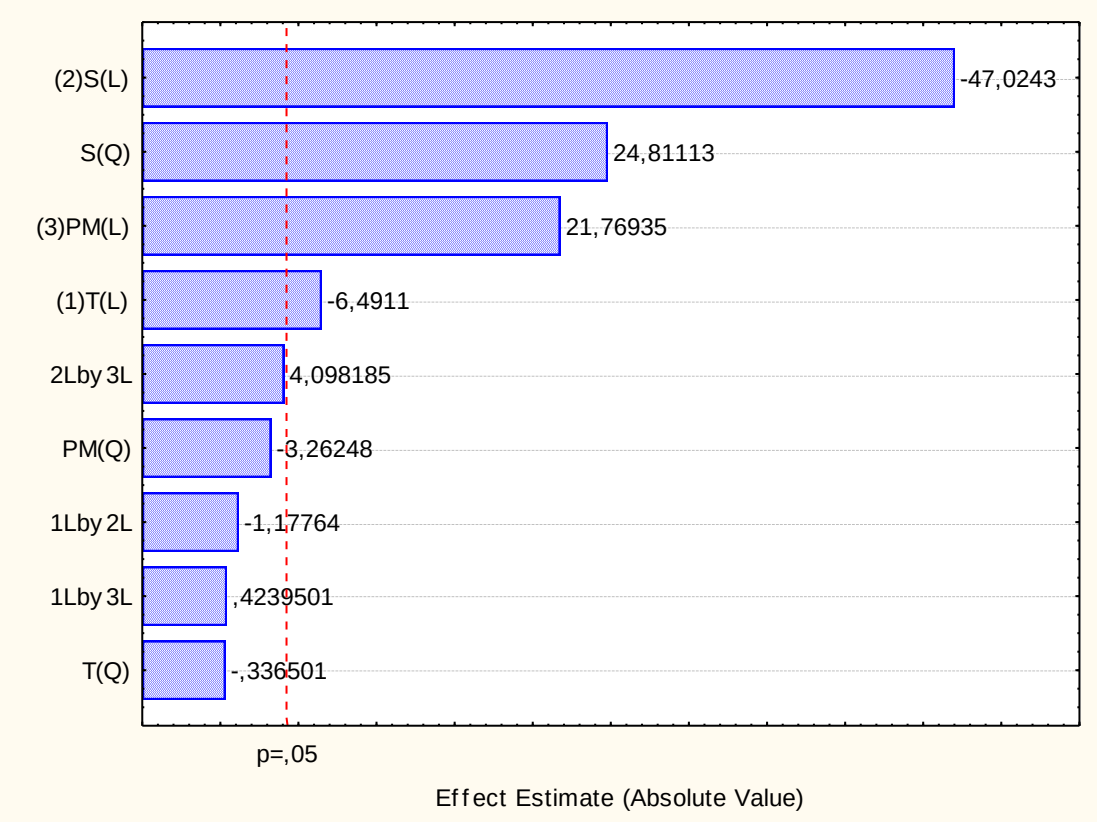


Figura 4. 21: Gráfico de Pareto do delineamento composto central rotacional (DCCR) das reações realizadas em tolueno mostrando a significância da variável temperatura, T; concentração de substrato, S e quantidade de peneira molecular PM; dos efeitos lineares, L e quadráticos, Q.

4.2.2.5. Validação dos modelos matemáticos e condições ótimas de reação

Assim, como para as reações com a enzima imobilizada comercial, os dados experimentais foram ajustados ao modelo matemático proposto e sua adequação foi realizada por análise de variância e parâmetro R^2. As equaçõe (4) e (5) representam os modelos matemáticos para a conversão de palmitato de 2,3:4,5-O diisopropileideno-β-D-frutopiranose catalisada pela lipase Cal B em MBG para as reações realizadas em heptano e tolueno, respectivamente.

Equação 4. $Y= 60,91 - 0,82 \times E - 17,87 \times S - 5,01 \times S^2 + 1,88 \times Ag - 5,79 \times E \times S - 2,49 \times E \times Ag + 1,35 \times S \times Ag$

Equação 5. $Y= 40,36 - 1,31 \times T - 9,55 \times S + 5,73 \times S^2 - 4,41 \times PM$

Onde Y é a porcentagem da taxa de conversão, E, T, S e PM são as variáveis codificadas para a quantidade de enzima, temperatura, concentração de substrato e peneira molecular, respectivamente. Os testes estatísticos dos modelos foram feitos pelo teste F de Fisher através de análise de variância ANOVA para os solventes avaliados e podem ser visualizados na Tabela 4.15.

Tabela 4. 15: Análise de Variância (ANOVA) para a validação dos modelos das reações catalisadas pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em MBG nos solventes estudados.

Fator	**Soma dos quadrados**		**Graus de liberdade**		**Quadrado médio**		**F calculado**		**F tabelado**	
	H	**T**	**H**	**T**	**H**	**T**	**H**	**T**	**H**	**T**
Regressão	5083,16	1964,10	7	4	726,16	491,02	11,90	23,87	3,29	3,25
Resíduo	549,12	246,82	9	12	61,01	20,56				
Falta de ajuste	548,45	245,60	7	10						
Erro puro	0,66	1,21	2	2						
TOTAL	5632,28	2210,91	16	16						

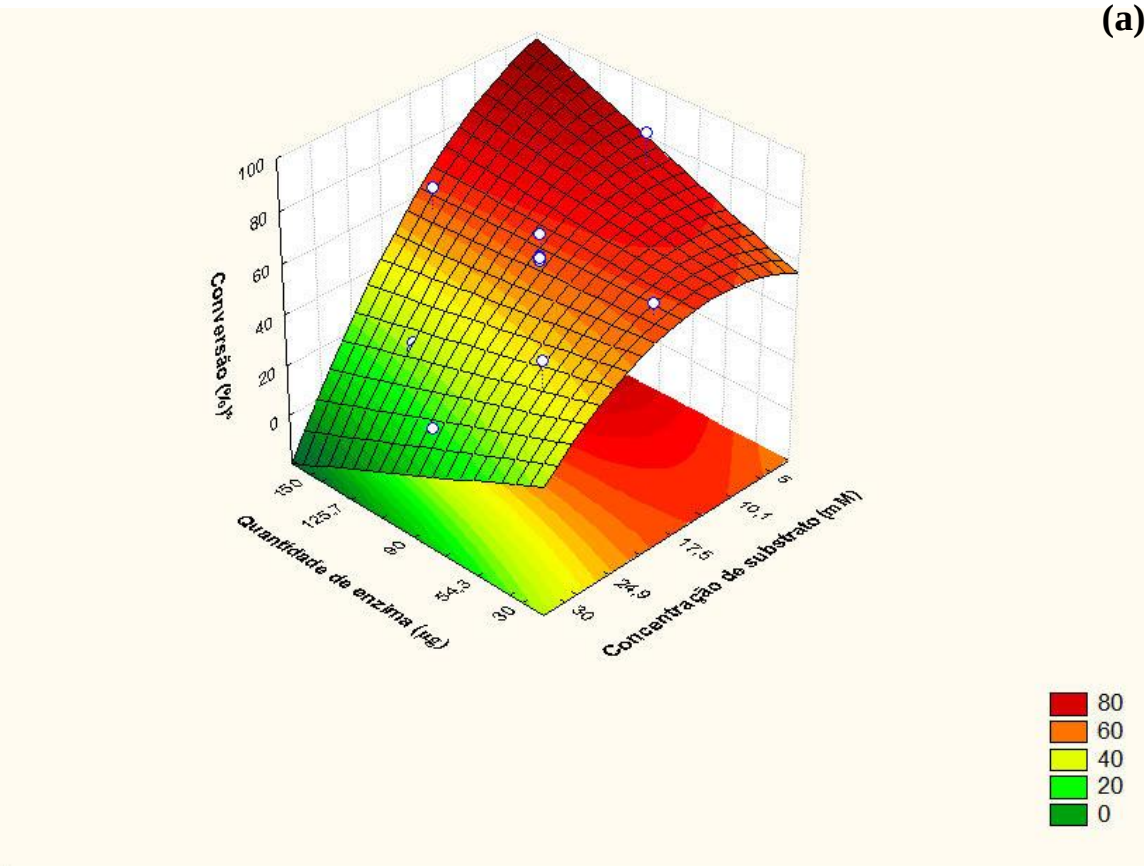
H - reações realizadas em heptano.
T - reações realizadas em tolueno.
Nível de confiança 95%.

A Tabela 4.15 representa a análise de variância (ANOVA), que mostra a validade do modelo de teste F e o resíduo que mostra a magnitude do erro experimental. Os valores de F calculados para os dois modelos, foi significativo, maior que o F tabelado, demonstrando a validade do modelo experimental. A boa correlação do modelo matemático e dos dados experimentais pode ser verificada pelo coeficiente de determinação (R^2). O coeficiente de determinação (R^2 = 0,90 e 0,89 para as reações em heptano e tolueno, respectivamente), implica que a variação da amostra de 90 e 89% para a produção de ésteres são atribuídos às variáveis independentes e pode ser explicado pela precisão do modelo.

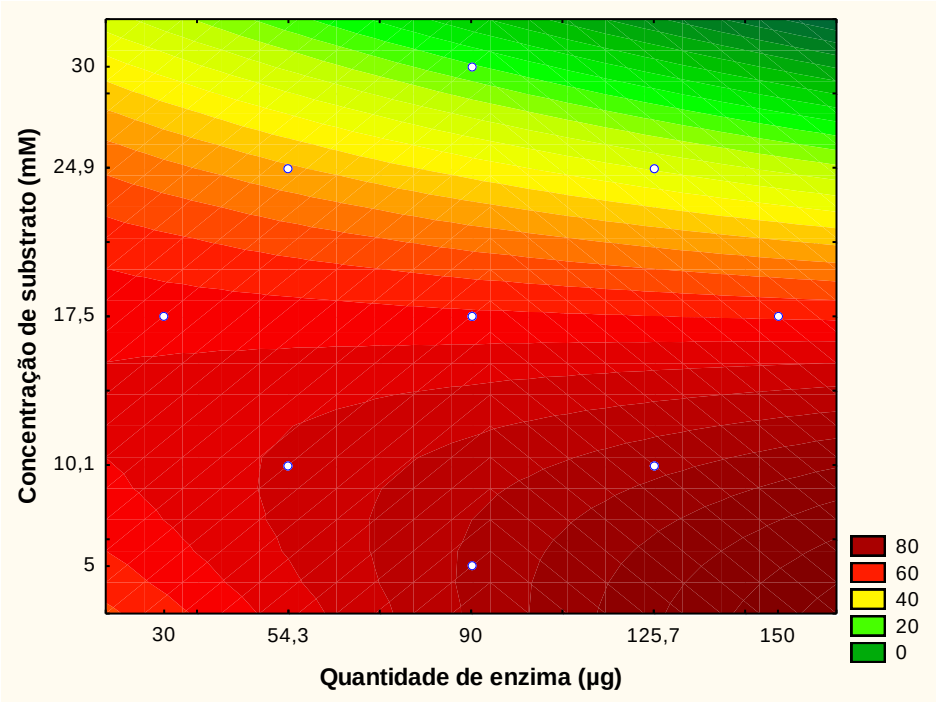
Após a validação dos modelos matemáticos as superfícies de resposta foram construídas. A Figura 4.22 mostra as superfícies de resposta e as curvas de contorno para os modelos propostos das reações realizadas em heptano (a, b) e em tolueno (c, d). O efeito negativo da variável concentração de substrato pode ser observado em ambos os gráficos,

onde o aumento da referida variável gera uma diminuição nos resultados de conversão. Na superfície de resposta para o tolueno (Figura 4.22 b) podemos observar o efeito positivo da peneira molecular. Quando aumentamos a quantidade de peneira molecular na reação temos um incremento nos resultados de conversão.

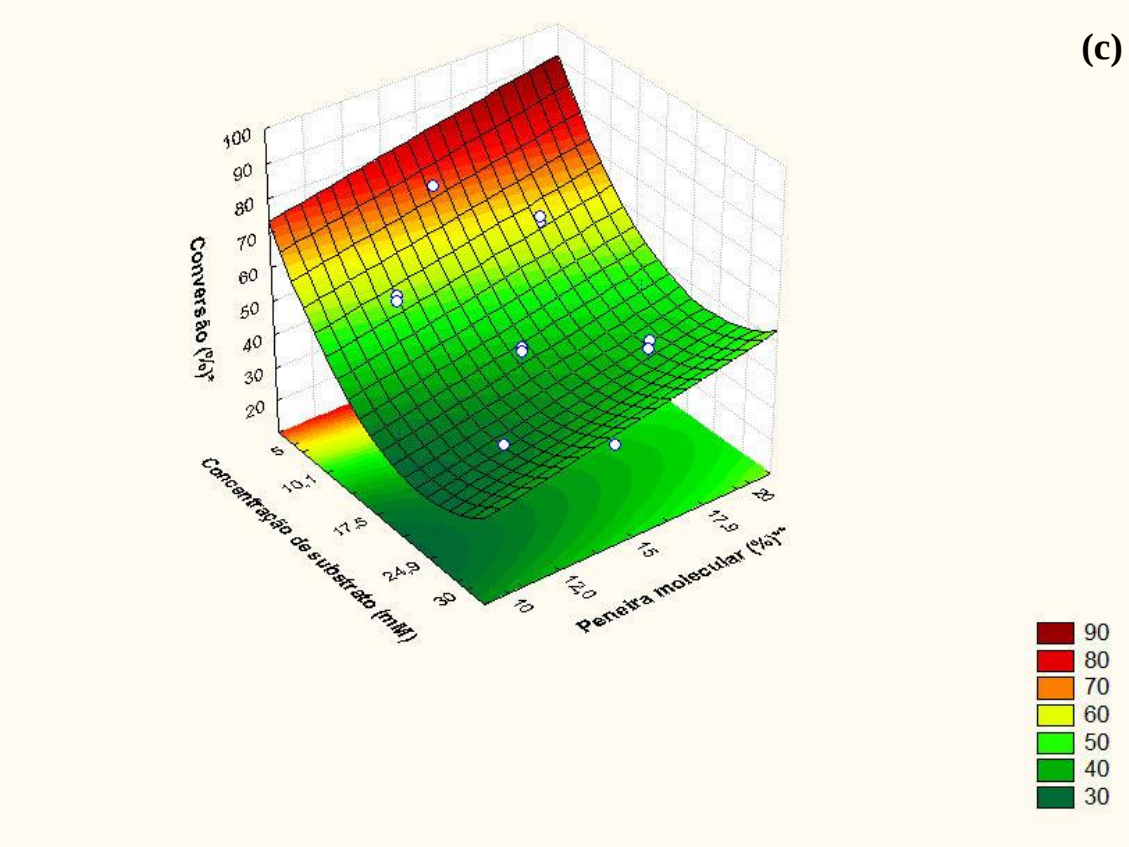
(a)



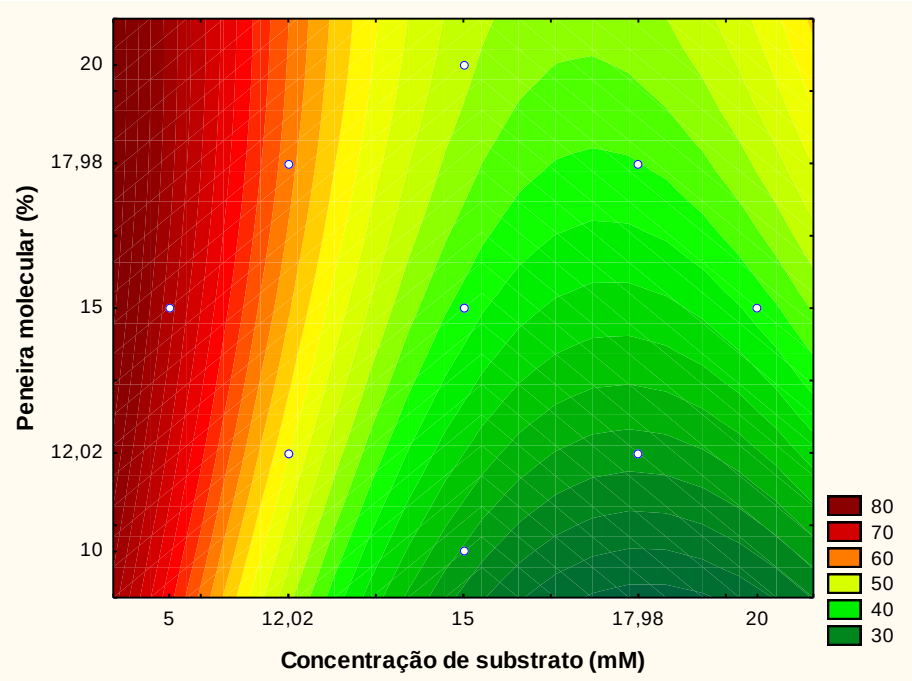
(b)


Concentração de substrato (mM)
30
24,9
17,5
10,1
5
30
54,3
90
125,7
150
Quantidade de enzima (µg)
80
60
40
20
0

(c)


Conversão (%)*
100
90
80
70
60
50
40
30
20
Concentração de substrato (mM)
5
10,1
17,5
24,9
30
Peneira molecular (%)**
10
12,5
15
17,5
20
90
80
70
60
50
40
30

(d)



* Medido pelo método Lowry–Tinsley.
** p/v

Figura 4. 22: Superfície de resposta para as reações de esterificação catalisadas pela enzima Cal B realizadas em n-heptano (a, b) e tolueno (c, d). Em cada figura as variáveis não apresentadas foram fixadas no ponto central.

4.2.2.6. Capacidade de reuso da lipase Cal B em sistema microemulsionado imobilizado em organogel

Um estudo da capacidade de reutilização para o sistema microemulsionado imobilizado em organogel com a lipase Cal B foi também investigado nos dois solventes avaliados (n-heptano e tolueno). Mais uma vez, os experimentos foram realizados usando as melhores condições reacionais previamente otimizadas. Entre cada ciclo, o gel foi lavado com o referido solvente em papel de filtro e aplicado na próxima reação. A Figura 4.23 apresenta a conversão em função do número de bateladas do respectivo solvente para a esterificação do ácido palmítico e do DAF no sistema microemulsionado imobilizado em organogel.

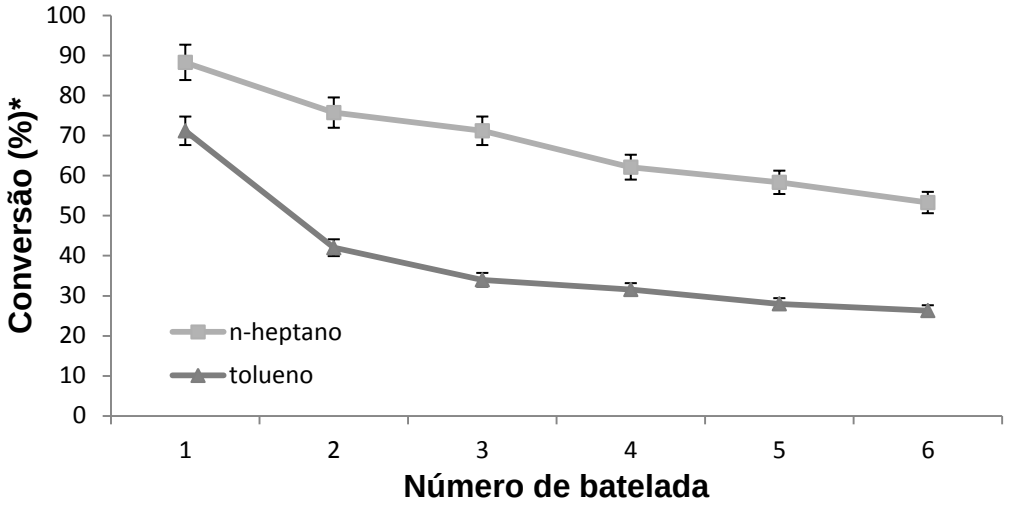


Figura 4. 23: Conversão em função do número de reciclos da enzima Cal B em MBG. *Medido pelo método Lowry–Tinsley.* Condições reacionais: 5 mM de substrato razão molar. 1:1, temperatura de 50^0C, 15% de peneira molecular, 105 µg de enzima e agitação de150 rpm para as esterificação realizadas em tolueno e para as reações realizadas em heptano foram usados 90 µg de lipase, 5 mM de substrato (1:1), agitação de 225 rpm, temperatura de 50^0C e 15% de peneira molecular.

Observa-se na Figura 4.23 que as conversões para as reações realizadas em ambos os solventes diminuíram logo após a segunda batelada. Ao compararmos os testes de reutilização para o sistema microemulsionado imobilizado em organogel com os das enzimas imobilizadas comerciais, ambos realizados em suas condições reacionais otimizadas, podemos reparar que o sistema microemulsionado apresentou um perfil de reutilização muito semelhante. Apesar da matriz utilizada para a imobilização do sistema microemulsionado ser aparentemente mais frágil, as reações nesse sistema parecem ter permanecido com boas conversões nos ciclos subsequentes. Tal fato pode ser explicado pela forma de agitação empregada nesse sistema, já que a agitação orbital confere um menor *stress* mecânico à matriz polimérica utilizada como suporte do que a agitação magnética empregada nas reações com a enzima imobilizada em suporte sólido.

4.3. Reações em condição de fluxo contínuo

4.3.1. Catalisada por enzimas imobilizadas em suporte sólido

Com o intuito de melhorar o tempo de reação e a produtividade para os procedimentos otimizados em batelada, as melhores condições de reação catalisadas pela lipase de *Thermomyces lanuginosus* IM e *Rhizomucor miehei* IM foram realizadas em condições de fluxo contínuo (Figura 4.24).

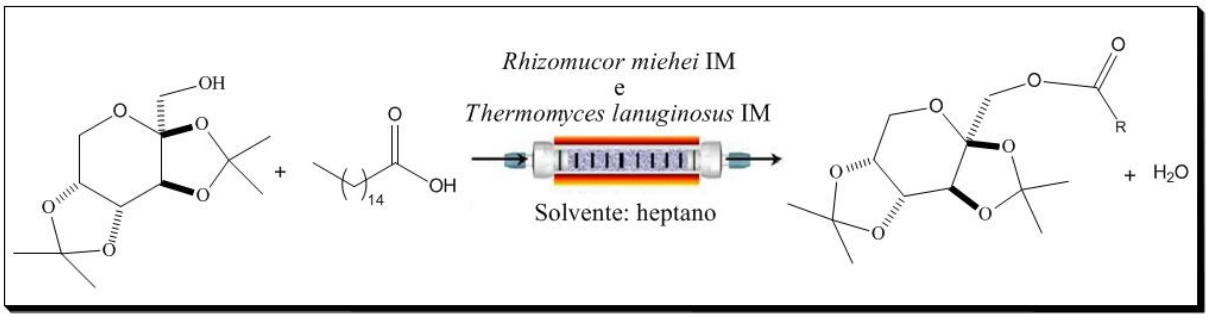


Figura 4. 24: Reação de esterificação do DAF com ácido palmítico em fluxo contínuo.

Para a enzima RM IM as condições otimizadas testadas foram 10 mM de uma solução de substrato (1:1) de DAF e AP, a 60 ^{0}C enquanto que para a TL IM uma solução de substrato de 19,1 mM (1:1) a 70,9 ^{0}C foi utilizada. Para as reações catalisadas pela TL IM as condições reacionais foram:10 mM de solução (1:1) de DAF e AP em n-heptano e temperatura de 60 ^{0}C. Um leito fixo de 2,39 mL de volume foi preenchido com a respectiva enzima e a reação foi realizada com diferentes taxas de fluxo de acordo com o tempo de residência desejado (Tabela 4.16).

Tabela 4. 16: Conversão de esterificação entre o DAF e AP catalisada pelas lipases estudas em condição de fluxo contínuo.

Fluxo (mL.min^{-1})	**Tempo de residência (min)**	**Conversão (%)[a]**	
		***Rhizomucor miehei* IM[b]**	***Thermomyces lanuginosus* IM[c]**
0,05	48	93,4 ± 3,9	91,1 ± 3,2
0,1	24	93,2 ± 3,3	86,4 ± 3,8
0,3	8	91,6 ± 3,4	69,1 ± 2,6
0,5	4,8	91,4 ± 3,1	21,2 ± 2,5
0,7	3,42	87,3 ± 2,9	17,4 ± 2,6
0,8	3	69,8 ± 2,5	13,4 ± 2,2
1,0	2,4	40,6 ± 2,5	15,7 ±1,9
1,5	1,6	23,7 ± 2,2	16,8 ± 2,0
2,0	1,2	14,0 ± 2,3	12,7 ± 1,5
2,5	1	6,3 ± 1,7	9,6 ± 1,8
3,0	0,8	5,0 ±1,8	6,4 ± 1,3

[a]Medida pelo método Lowry–Tinsley.
[b]Condições reacionais:10 mM de solução (1:1) de DAF e AP em n-heptano e temperatura de 60^{0}C.
[c]Condições reacionais: 19.1 mM de solução (1:1) de DAF e AP em n-heptano e temperatura de 70.9^{0}C

A Tabela 4.16 mostra que resultados semelhantes podem ser obtidos na faixa de fluxo entre 0,05 e 0,7 mL.min^{-1} para lipase RM IM, permitindo reações com tempos de residência pequenos (3,42 min), o que proporciona uma maior produtividade se comparado as reações em batelada que necessitavam de um tempo reacional de 24 horas. No caso da lipase TL IM os resultados obtidos mostram um comportamento completamente diferente. Excelentes resultados foram obtidos quando se trabalhou com taxas de fluxo lentas (0,05 e 0,1 mL.min^{-1}), mas o aumento na taxa de fluxo conduz a uma diminuição drástica da conversão para o produto desejado. Em ambos os casos foi utilizado o mesmo diâmetro e comprimento do leito fixo e a mesma quantidade de enzima (950 mg de biocatalisador imobilizado) de modo a minimizar a influência destes parâmetros sobre a conversão do produto desejado.

A capacidade de reciclo do sistema foi também avaliada. Entre cada ciclo a enzima era retirada do reator de leito fixo, lavada com n-heptano em papel filtro, seca em estufa a 40 ^{0}C por duas horas e submetida à próxima reação. O tempo de residência utilizado nesses ensaios foram 3,42 e 24 min para a enzima RM IM e TL IM, respectivamente nas mesmas condições utilizadas anteriormente.

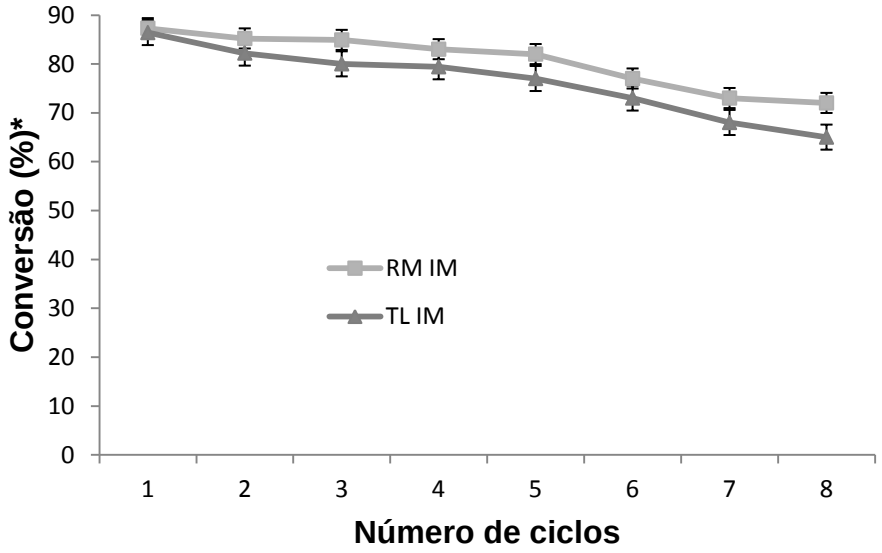


Figura 4. 25: Conversão em função do número de ciclos para as reações catalisadas pelas enzimas RM IM e TL IM em fluxo contínuo. Condições reacionais para a RM IM: fluxo de 0,7 mL/min, 10 mM de solução (1:1) de DAF e AP em n-heptano e temperatura de 60^{0}C. Condições reacionais para a TL IM: fluxo de 0,1 mL/min, 19.1 mM de solução (1:1) de DAF e AP em n-heptano e temperatura de 70.9^{0}C.

O gráfico (Figura 4.25) mostra uma pequena diminuição na conversão das reações para ambas as enzimas utilizadas no decorrer dos oito ciclos testados. O bom número de

ciclos obtido pode ser atribuído à ausência de cisalhamento ao suporte das enzimas, ao contrário do sistema em batelada, visto que as reações foram realizadas em leito fixo, onde o biocatalisador é sujeito apenas as forças do fluxo do solvente que passa pelo reator.

4.3.1.1. Esterificação com outros ácidos graxos

A fim de realizar uma aplicação reacional proposta no sistema de fluxo contínuo, a melhor condição para a esterificação do DAF com o AP para a catálise realizada pela enzima RM IM (0,7 mL/min, 60 ºC e 10 mM de substratos a 1:1) foram reproduzidas com diferentes fontes de ácidos graxos. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.17.

Tabela 4. 17: Esterificação com diferentes tipos de ácidos graxos em fluxo contínuo.

Ácido graxo	**Conversão (%)***
Esteárico	92,4 ± 1,7
Oleico	96,0 ± 2,5
Láurico	76,9 ± 1,3

*Medido pelo método de Lowry-Tinsley modificado

Pode-se observar na Tabela 4.17 que as maiores conversões foram obtidas para o ácido oleico e esteárico. Esses resultados mostraram que, aparentemente, os ácidos graxos de cadeias mais longas são melhores substratos para a lipase RM IM do que o ácido graxo de cadeia curta testado, o que corrobora com os bons resultados obtidos com o ácido palmítico. Autores como Cao et al (1999) e Soultani et al (2001) alegam que a atividade enzimática diminui com a minimização do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo na esterificação da frutose. O ácido oleico ainda possui a vantagem de ser líquido a temperatura ambiente, o que auxilia na solubilização da frutose e consequentemente nos rendimentos reacionais, sendo assim amplamente utilizado na esterificação com esse carboidrato (PYO, HAYES, 2009; YE, HAYES, 2012, YE; PYO; HAYES, 2010). As condições de reação não foram otimizadas para esses ácidos graxos, nem estudos de seletividade foram realizados para se confirmar tais resultados, já que o objetivo principal deste trabalho foi o uso do ácido palmítico como substrato.

4.3.1.1.1. Esterificação do DAF com resíduo de ácido graxo (RAG) em concentração superior de substrato

Com o intuito de agregar valor a uma amostra de resíduo de ácidos graxos oriunda da indústria de óleo de palma, decidimos, nesta etapa, realizar a reação de esterificação catalisada por enzima imobilizada comercial em fluxo contínuo utilizando-o como doador acila (Figura 4.26). O resíduo industrial foi gentilmente cedido pela empresa Agropalma®, localizada em Belém – PA.

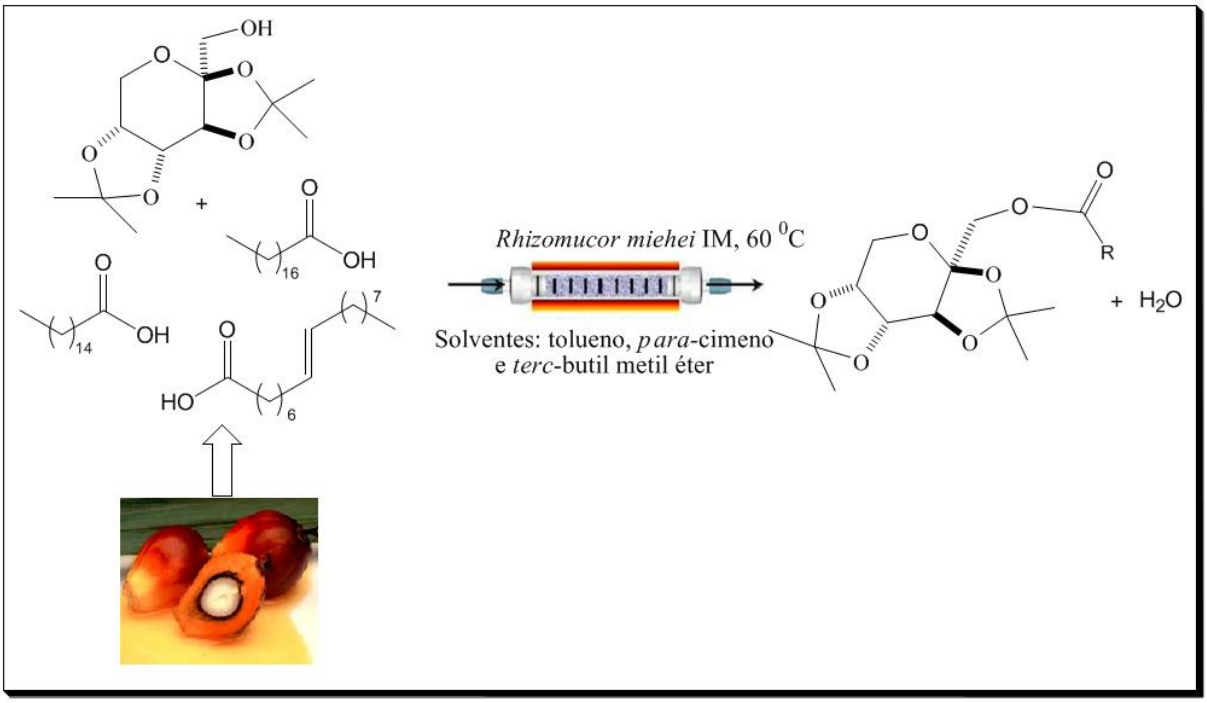


Figura 4. 26: Esterificação do DAF com um resíduo de ácidos graxos oriundo da indústria de refino de óleo de palma em condições de fluxo contínuo.

Objetivando a maximização da produtividade da esterificação por intermédio do fluxo contínuo, reações com solventes que apresentaram uma maior facilidade de solubilização do DAF foram aqui realizadas. Além de solventes orgânicos como o tolueno e éter metil *terc*-butílico (TBME), para-cimeno também foi usado para dissolver os substratos em concentrações de 100, 300 e 500 mM. O *para*-cimeno é considerado um solvente promissor em substituição aos solventes convencionais derivados da indústria do petróleo por contemplar alguns princípios da química verde, sendo ambientalmente seguro (TANZI et al, 2012).

Primeiramente, através da metodologia já descrita, o resíduo de ácidos graxos (RAG) foi submetido a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), a fim de estabelecer a sua composição (Figura 4.27).

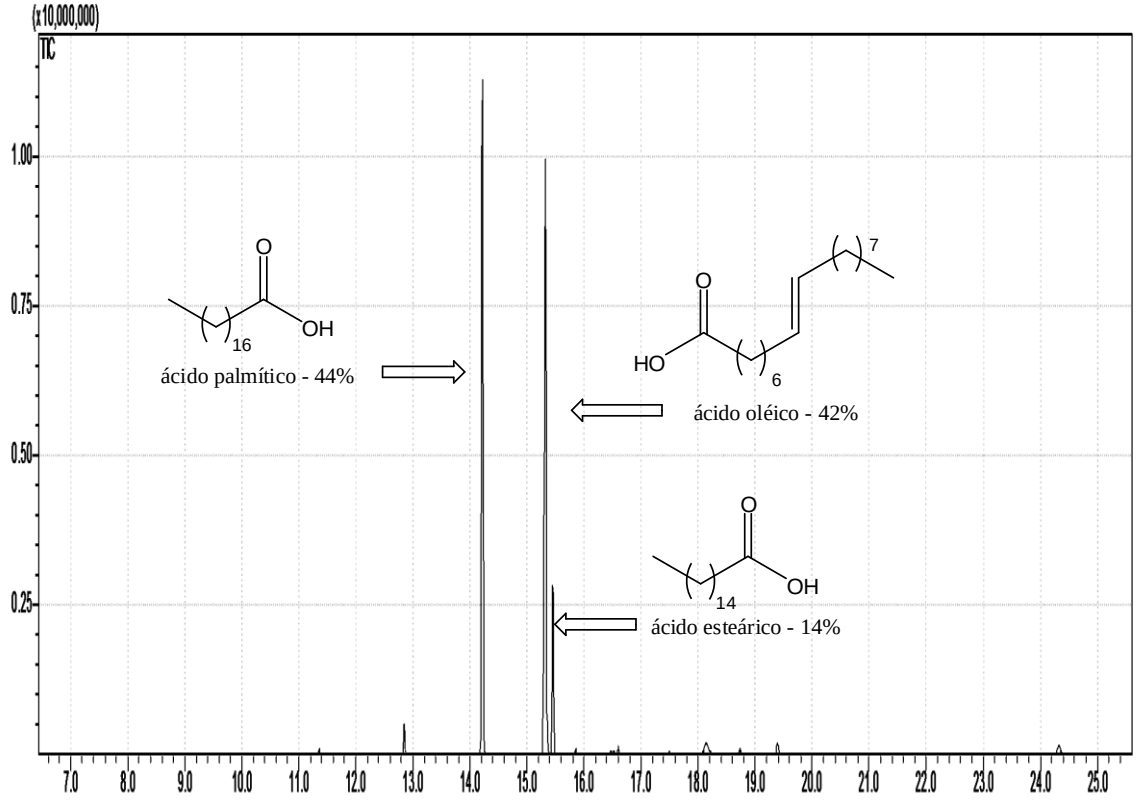


Figura 4. 27: Espectro obtido da análise por CG-EM do resíduo de ácidos graxos oriundo do refino de óleo de palma (RAG).

O espectro da Figura 4.27 revela a composição definida na amostra de 44% de ácido palmítico, 42% de ácido oléico e 14% de ácido esteárico como constituintes do RAG. Dessa maneira, torna-se claro que o residuo é um excelente doador acila para a esterificação do DAF, visto que é composto majoritariamente por ácido palmítico, o substrato estudado até então. A lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei* foi escolhida para catalisar a esterificação nesta etapa, pois além de ser reconhecida na literatura por ter especificidade relativa contra um grande número de substratos e apresentar atividade de esterificação notável (RODRIGUES, FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010), este biocatalisador apresentou o melhor desempenho entre as enzimas avaliadas nas etapas anteriores.

O reator de leito fixo foi preenchido com a lipase e as reações foram realizadas em diferentes fluxos como pode ser visualizado nos resultados da Tabela 4.18 para os testes com 100 mM de DAF e RAG (1:1).

Tabela 4. 18: Conversão da esterificação entre 100 mM de DAF e RAG (1:1) catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* IM em condição de fluxo contínuo.

Fluxo ($mL.min^{-1}$)	Tempo de residência (min)	Conversão (%)[a]		
		Tolueno	TBME	Cimeno
0,1	24	98,21 ± 1,07	98,64 ± 0,48	87,03 ± 3,5
0,3	8	87,62 ± 3,04	98,04 ± 0,49	25,55 ± 6,6
0,5	4,8	13,54 ± 2,82	95,74 ± 2,79	18,51 ± 2,2
0,7	3,4	7,024 ± 3,55	31,97 ± 2,14	11,48 ± 5,1
1,0	2,4	2,62 ± 1,71	14,67 ± 0,67	11,11 ± 5,8
1,5	1,6	n.d.[b]	6,70 ± 1,17	2,59 ± 4,3

[a]Medida pelo método Lowry–Tinsley.
[b]não dectada

Podemos observar na Tabela 4.18, que os melhores resultados foram obtidos no tempo de residência de 24 min, para todos os solventes. Contudo, o resultado para as reações realizadas com cimeno foi menor no mesmo tempo de residência (87,03 ± 3,5%) quando comparado com os outros solventes. Isso talvez possa ter ocorrido, pois ele apresenta uma viscosidade mais elevada do que os demais solventes (0,760 cP para o cimeno, 0,300 cP para o TBME e 0,560 cP para o tolueno) o que pode gerar problemas eletrostáticos no microambiente do sítio ativo prejudicando a atividade catalítica (k_{cat}) da enzima (SITNITSKY, 2008; GAVISH, WERBER, 1979).

Tabela 4. 19: Conversão da esterificação entre 300 mM de DAF e RAG (1:1) catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* IM em condição de fluxo contínuo.

Fluxo ($mL.min^{-1}$)	Tempo de residência (min)	Conversão (%)[a]		
		Tolueno	TBME	Cimeno
0,1	24	99,91 ± 0,08	93,89 ± 3,84	57,74 ± 5,1
0,3	8	99,69 ± 0,12	21,55 ± 2,50	33,3 ± 2,5
0,5	4,8	93,03 ± 2,60	11,33 ± 3,66	30,88 ± 3,7
0,7	3,4	10,39 ± 1,33	9,54 ± 0,71	28,79 ± 3,3
1,0	2,4	8,55 ± 0,93	8,91 ± 1,35	25,48 ± 4,4
1,5	1,6	5,04 ± 2,11	8,09 ± 2,70	23,95 ± 3,2

[a]Medida pelo método Lowry–Tinsley.

Nos testes realizados com 300 mM de substrato, como pode ser observado na Tabela 4.19, denota-se o efeito da polaridade dos solventes na atividade enzimática. Boas conversões foram obtidas para as reações realizadas com tolueno em tempos de residência de 24 até 5,4 minutos. Enquanto que para o TBME, um decréscimo significativo na conversão foi observado quando o tempo de residência diminuiu de 24 para 8 minutos (93,89 % ± 3,84 – 21,55 % ± 2,50). Tolueno e TBME possuem diferentes valores de log P, 2,72 e 1,29 respectivamente. Melhores atividades enzimáticas e estabilidade são geralmente observadas em solventes com pobre polaridade (maiores valores de log P). Solventes com altos valores de log P alteram a conformação tridimensional da enzima proporcionando uma melhoria em sua atividade catalítica (AKOH, MUTUA, 1994; LOUGHLIN, 2000).

Embora o p-cimeno tenha um alto valor de log P (4,014) as conversões não são tão boas em comparação aos outros solventes, mesmo em tempos de residência altos (24 minutos - 57,74% ± 5,1). Isto pode ser atribuído à elevada viscosidade do solvente (0,760 cP) como citado anteriormente, minimizando a atividade catalítica da enzima (SITNITSKY, 2008).

Tabela 4. 20: Conversão da esterificação entre 500 mM de DAF e RAG (1:1) catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* IM em condição de fluxo contínuo.

Fluxo ($mL.min^{-1}$)	Tempo de residência (min)	Conversão (%)[a]	
		Tolueno	TBME
0,1	24	99,76 ± 0,24	99,91 ± 0,01
0,3	8	16,74 ± 1,48	22,25 ± 3,07
0,5	4,8	13,84 ± 0,12	9,60 ± 4,66
0,7	3,4	12,71 ± 3,66	7,37 ± 3,11
1,0	2,4	12,75 ± 3,20	6,926 ± 4,04
1,5	1,6	12,94 ± 3,49	6,15 ± 3,9

[a]Medida pelo método Lowry–Tinsley.

A pobre solubilidade de 500 mM do DAF no solvente cimeno impediu a realização dos testes do mesmo em condições de fluxo contínuo. Assim, os testes foram realizados apenas em TBME e tolueno (Figura 4.20). A esta concentração de substrato os melhores resultados foram obtidos com o maior tempo de residência, com ambos os solventes (24 minutos). A diminuição drástica na conversão é observada quando se reduz o tempo de residência de 24 minutos a 8 minutos para ambos os solventes. Provavelmente, devido a

saturação do sítio ativo da enzima devido as altas concentrações de substrato (HUMEAU et al, 1998).

Assim como as reações da etapa anterior em condição de fluxo contínuo em n-heptano com enzima comercial, todas as reações foram realizadas em reator com as mesmas dimensões para evitar a influência deste parâmetro na conversão do produto desejado. No entanto, um reator de diâmetro maior (0,78 cm^2) quando comparado a fase anterior (0,3 cm^2) com o mesmo volume de leito, bem como a mesma massa de biocatalisador (950 mg) foi utilizado gerando bons resultados de conversão em concentrações superiores de substrato. Dessa forma, é interessante ressaltar a influência das dimensões do reator na catálise enzimática em condição de fluxo contínuo.

4.3.2 Catalisada pela enzima Cal B imobilizada em organogel

As reações em fluxo contínuo para o sistema microemulsionado imobilizado em organogel foram realizadas nas melhores condições obtidas anteriormente na otimização em batelada: 5 mM de uma mistura (1:1) de AP e DAF em n-heptano e em tolueno a 50^0C. Com o intuito de melhorar a produtividade de éster, reações com 20 e 40 mM também foram realizadas nas mesmas condições reacionais. Como podem ser observados na Tabela 4.21 os melhores resultados de conversão foram obtidas no maior tempo de residência (47,1 min) para ambas as concentrações testadas. Quando o tempo de residência diminui as conversões decrescem consideravelmente. Resultados de conversão em torno de 90% podem ser observados para as reações realizadas com 5 e 20 mM de substrato em fluxo de 0,1 $mL.min^{-1}$, entretanto, os testes com 40 mM não demostraram o mesmo comportamento nos resultados. A partir de 20 mM os resultados de conversão decresceram. Isso vai ao encontro do efeito negativo da variável substrato observado na otimização em batelada desse sistema, ou seja, um aumento na concentração de substrato gera uma diminuição nos resultados. Entretanto, tal efeito não foi observado até 20 mM, devido talvez à quantidade de enzima aplicada no sistema de fluxo (600 µg) que é superior à trabalhada em sistema batelada (até 180 µg). Tais testes demonstram que existe um ponto de ótimo na relação dessas duas variáveis no sistema devido talvez a algum efeito de saturação da enzima pela maior concentração de substrato nesse sistema.

Em ambos os fluxos testados o mesmo tipo de leito e quantidade de enzima foi usado (comprimento e largura) para minimizar a influência desses parâmetros na conversão para o produto desejado.

Tabela 4. 21: Conversão para as reações realizadas em n-heptano e em fluxo contínuo catalisada pela enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel.

Fluxo (tempo de residência)	Conversão (%)[a]		
	5 mM	20 mM	40 mM
0,1 $mL.min^{-1}$ (47,1 min)	90,2 ± 4,3	90,1 ± 3,5	32 ± 3,7
0,3 $mL.min^{-1}$ (15,7 min)	36,4 ± 3,1	25 ± 2,6	19,8 ± 2,9
0,6 $mL.min^{-1}$ (7,85 min)	25,8 ± 2,9	16,1 ± 2,4	14 ± 3,5

Condições reacionais: ácido palmítico e DAF (1:1) a 50 ˚C (600 µg de Cal B, volume reator = 4,71 mL).
[a] Medido por método Lowry–Tinsley.

Testes em tolueno, nas condições ideais otimizadas em batelada também foram realizados, mas não mostraram resultados de conversão. Quando a mistura reacional em tolueno foi submetida ao fluxo continuo algum efeito deletério ocorreu ao gel, visto a turbidez apresentada na solução de saída. Não está claro como ocorre esse efeito deletério do tolueno ao gel. No entanto, um fenômeno semelhante foi observado por Rees et al (1991) e Soni et al (2001) quando o gel foi usado com outros solventes.

4.4. Eficiência dos sistemas estudados

A fim de comparar os sistemas, bem como a eficiência dos biorreatores estudados, a produtividade (P) foi adotada como forma de avaliação. A produtividade de cada sistema foi calculada através de suas relações entre a quantidade de produto formado, tempo reacional e quantidade de enzima. Dessa forma, os valores encontrados foram expressos em g de produto.h^{-1}.g de enzima^{-1}. Com os valores de dessorção da lipase RM IM que apresentou os melhores resultados entre as enzimas comerciais avaliadas (24,3 mg de enzima/g de suporte) as produtividades puderam ser ajustadas e podem ser visualizadas na Tabela 4.22.

Tabela 4. 22: Comparação dos resultados obtidos em cada sistema estudado.

Sistema	Ácido graxo utilizado	Tempo (minutos)	Quantidade de enzima (mg)	P (g produto.h^{-1}.g de enzima^{-1})
Batelada - RM IM em heptano (até 50 mM de substrato)	AP	1440	5,75	0,7
Fluxo contínuo - RM IM em heptano (até 50 mM de substrato)	AP	3,42	21,85	8,1
Fluxo contínuo em tolueno (até 500 mM de substrato)	RAG	4,8	21,85	362,9
Batelada - Microemulsão AOT/Iso-octano em Organogel	AP	120	0,09	66,8
Fluxo contínuo - Microemulsão AOT/Iso-octano em Organogel	AP	47,1	0,6	88,1

Como descrito no trabalho, as reações em leito fixo demonstraram excelentes resultados em tempos inferiores àquelas realizadas em condições de batelada. O menor tempo necessário para a realização das reações em fluxo se dá devido à alta concentração de enzima nesse tipo de biorreator. Além disso, as reações em fluxo possibilitaram uma maior reciclabilidade do biocatalisador devido a minimização dos efeitos de cisalhamento ocasionados ao suporte.

O menor tempo necessário para realizar as reações em fluxo maximiza a produtividade nesse sistema. Isso é mais evidente quando longos tempos reacionais são necessários em batelada. Foi o caso das reações realizadas com até 50 mM de substrato, como pode ser observado na Tabela 4.22, quando comparamos o sistema batelada com o fluxo contínuo

onde houve um incremento na produtividade, de 0,7 para 8,1 g produto.h^{-1}.g de enzima^{-1} para o sistema em batelada e em fluxo contínuo, respectivamente.

Uma excelente produtividade em fluxo contínuo foi obtida (362,9 g produto.h^{-1}.g de enzima^{-1}) quando tolueno foi utilizado como meio reacional devido a maximização da solubilidade dos substratos. As condições reacionais, tempo (4,8 minutos) e quantidade de enzima (21,85) foram muito similares a reação realizada em fluxo com até 50 mM, porém levando a uma produtividade muito maior. Entretanto, deve ser ressaltado que além de serem realizadas em outro meio reacional as reações dessa fase foram feitas utilizando um resíduo de ácidos graxos como substrato constituído por ácidos graxos de cadeia longas que, como já discutido, são melhores substratos para a lipase RM IM do que ácidos graxos de cadeia curta, corroborando com os bons resultados obtidos nesses ensaios.

Com relação ao sistema de microemulsão AOT/iso-octano imobilizado em organogel podemos observar que melhores resultados de produtividade foram obtidos quando comparados aos sistemas com a enzima imobilizada RM IM. Isso, pois nesse sistema, quantidades muito menores de enzimas se comparados os sistemas com enzimas imobilizadas são utilizados e ótimas conversões puderam ser encontradas, elevando-se os valores de P calculados. No entanto, quando se compara as condições reacionais nesse sistema, ou seja, a batelada com o fluxo contínuo, um incremento é observado na produtividade que passa de 66,8% para 88,1%, respectivamente. Esse aumento da produtividade, de uma condição para outra não foi tão acentuado, pois o tempo reacional necessário em batelada foi pequeno (120 minutos) em comparaçao as reações com a enzima imobilizada RM IM. Cabe ressaltar ainda sobre os sistemas em AOT que a imobilização em organogel possibilitou os testes em condição de fluxo contínuo, visto que as micelas reversas são sistemas líquidos que não poderiam ser utilizadas em tal condição.

Embora sistemas diferenciados de reação estejam sendo comparados, através de seus valores de P obtidos, deve-se ressaltar que cada resultado de conversão foi obtido em diversas condições reacionais, como temperatura, quantidade de enzima, e agitação. No entanto, essas condições foram otimizadas com o intuito de maximizar seus resultados, portanto sistemas em fluxo contínuo foram mais atraentes do que aqueles em batelada.

CAPÍTULO 5
CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a síntese química do 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (DAF) foi plenamente satisfatória por proporcionar a solubilidade do carboidrato em vários solventes orgânicos. A utilização dos grupos protetores (isopropilideno) permitiu uma maior solubilização em temperatura ambiente, ao contrário da frutose que necessita de temperatura e longos tempos de agitação. O DAF demonstrou ser um excelente substrato para as enzimas permitindo a sua esterificação com ácido palmítico em altas conversões e em condições reacionais brandas tanto no sistema de batelada quanto em fluxo contínuo. A esterificação com o DAF garantiu a síntese exclusiva do produto de monoacilação por deixar apenas uma hidroxila reativa.

Através da metodologia de superfície de resposta, as melhores condições reacionais puderam ser encontradas para os sistemas em batelada tanto para as reações realizadas com enzima imobilizada comercial quanto para a enzima em micela reversa imobilizada em organogel.

Os resultados dos delineamentos experimentais com as enzimas imobilizadas comerciais apontaram para uma maior conversão em éster quando utilizado uma maior quantidade de catalisador para a esterificação com a enzima RM IM e uma maior temperatura para a TL IM;

Entre as enzimas imobilizadas comerciais avaliadas em sistema batelada a RM IM apresentou melhores resultados de conversão, bem como aparentou ser mais resistente ao cisalhamento do que a TL IM. Um resíduo de ácidos graxos, proveniente da indústria de refino de óleo de Palma (RAG) pôde ser utilizado como matéria-prima para a esterificação do DAF em sistema de fluxo contínuo, agregando valor ao produto final. As enzimas imobilizadas comerciais apresentaram um bom desempenho em altas concentrações de substrato, até 500 mM, em sistema de fluxo contínuo.

A enzima Cal B em micela reversa imobilizada em organogel demonstrou ser um bom catalisador somente em baixas concentrações de substrato tanto em sistema batelada quanto em fluxo contínuo.

As produtividades dos sistemas foram calculadas e demonstraram que biorreator em leito fixo, bem como as enzimas imobilizadas comerciais apresentaram maiores valores, revelando serem eficientes para a produção de éster de DAF.

CAPÍTULO 6
PERSPECTIVAS FUTURAS

Este é um trabalho inovador no que diz respeito a utilização do 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (DAF) como substrato em esterificação enzimática, maximizando a solubilidade da frutose em solventes orgânicos nesse tipo de reação. Sugere-se como perspectivas futuras os seguintes tópicos:

- Estudo da desproteção dos grupos isopropilidênicos do éster formado para aproveitamento das propriedades emulsionantes do palmitato de frutose;

- Utilização do sistema de fluxo contínuo para a reação de proteção da frutose com acetais (isopropilideno);

- Investigação das reações quimio-enzimáticas em cascata sob condições de fluxo contínuo, proteção da frutose, esterificação enzimática do DAF e desproteçao do éster formado;

- Avaliação das propriedades emulsionantes do éster como balanço lipofílico-hidrofílico, tensão superficial, tensão interfacial, concentração micelar crítica, estabilidade de emulsão e capacidade de formação de espuma.

- Realização de *scale-up* reacional visando a aplicabilidade industrial;

- Teste em formulações alimentícias, bem como cosmetológicas em substituição aos ésteres graxos de sacarose comerciais.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADELHORST K.; FREDRIK B.; GODTFREDSEN S. E.; KIRK O. Enzyme catalysed preparation of 6-O-acylglucopyranosides. ***Synthesis***, v.2, p. 112–115, 1990.

AGUIEIRAS, E. C. G. **Síntese de estólides empregando catálise enzimática.** Dissertação de mestrado, TPQB/UFRJ, Brasil, 2011.

AHMED, J. I., Trans'-fixed, ***Food Sci. Technol. Today***, v. *9*, p. 228, 1995.

AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos, ***Boletim de Biotecnologia***, n. 72, p. 2-13, 2002.

AKOH, C. C.; MUTUA, L. N. Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters: Effect of reaction parameters and the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids. ***Enzyme Microb. Technol.,*** v. 16, p. 115-119, 1994.

AKOH, C. C.; SWANSON , B. G., **Carbohydrate Polyesters as Fat Substitutes**, Ed. Marcel Dekker, New York, 1994, p. 269.

ALOULOU, A.; RODRIGUEZ, J. A; FERNANDEZ, S. et al. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. ***Biochimica et biophysica acta***, v. 1761, n. 9, p. 995–1013, 2006.

AMOS, J. A.; BERNABC, M.; OTERO, C. Quantitative enzymatic production of 1 , 6 = diacyl fructofuranoses. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 22, p. 27–35, 1998.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green chemistry: principles and practice. ***Chemical Society reviews***, v. 39, n. 1, p. 301–12, 2010.

ARCOS, J.A., BERNABÉ, M., OTERO, C., Quantitative enzymatic production of 6-O-acyl glucose Esters, ***Biotechnology and Bioengineering***, v. 57, p. 505-509, 1998.

ASAKURA, J.; MATSUBARA, Y.; YOSHIHARA, M. Clay catalyzed acetonation: A simple method for the preparation of isopropylidene Carboydrates. ***J. Carbohyd. Chem.***, v. 15 (2), p. 231-239, 1996.

BABAYAN, V. K.; ATIKIAN, A. K. **Sugar ester preparation and purification.** United States Patent Office: E. F. Drew & Co., Inc., New York. US 2,948,717, aug. 9, 1960.

BARON, A. M. **Biocatálise em ambientes aquo-restritos:comparação de diferentes sistemas reacionais**, dissertação de mestrado, Universidade federal do Paraná, 2003.

BARON, A. M.; SARQUIS, M. I. M.; BAIGORI, M.; MITCHELL, DAVID A.; KRIEGER, NADIA. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of Penicillum coryophilum in water-restricted environments. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 34, n. 1-6, p. 25–32,2005.

BEBARTA, B.; M, J.; KOTASTHANE, P.; SUNKIREDDY, Y. R. Medium chain and behenic acid incorporated structured lipids from sal, mango and kokum fats by lipase acidolysis. ***Food chemistry***, v. 136, n. 2, p. 889–94, 2013.

BELDER, A. N. Cyclic acetals of the aldoses and aldosides. ***Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.****;* v. 20; p. 219-302, 1965.

BHATTACHARYYA, K. Nature of biological water: a femtosecond study. ***Chemical communications (Cambridge, England)***, n. 25, p. 2848–57, 2008.

BLATTNER, C.; ZOUMPANIOTI, MARIA; KRÖNER, J. et al. Biocatalysis using lipase encapsulated in microemulsion-based organogels in supercritical carbon dioxide. ***The Journal of Supercritical Fluids***, v. 36, n. 3, p. 182–193, 2006.

BORNSCHEUER, U. T. Immobilizing enzymes: how to create more suitable biocatalysts. ***Angewandte Chemie***, v. 42, n. 29, p. 3336–7, 2003.

BORNSCHEUER, U. T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, S. H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. ***Trends in biotechnology***, v. 20, n. 10, p. 433–7, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Analytical Biochemistry***, v. 72, p. 248-554, 1976.

BRADY, R. F. Cyclic acetals of ketoses. ***Adv. Carbohyd. Chem Biochem.***, v. 26; p. 197-278, 1971.

CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 57, p. 171–176, 2009.

CAMPOS, S. K. **Fundamentos econômicos da formação do preço internacional de açúcar e dos preços domésticos de açúcar e etanol.** Tese de Doutorado. Escola Superior da Agricultura "Luís de Queiroz"/USP, Piracicaba, 2010.

CAO L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design.** Ed. Wiley, pp. 563, 2005.

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. 6, p. 279–85, 1999.

CARLSON, A.; NAGARAJAN, R. Release and recovery of porcine pepsin and bovine chymosin from reverse micelles: A new technique based on isopropyl alcohol addition. ***Biotechnol.Prog.***, v. 8, p. 85, 1992.

CARVALHO, C. M.; CABRAL, J. M. Reverse micelles as reaction media for lipases. ***Biochimie***, v. 82, n. 11, p. 1063–85, 2000.

CARVALHO, P. O.; CALAFATI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lípases microbianas. ***Química Nova***, v. 28, 4, p. 614-621, 2005.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A. et al. Economic analysis of lipase production by Penicillium restrictum in solid-state and submerged fermentations. ***Biochemical Engineering Journal***, v. 4, p. 239–247, 2000.

CASTILLO, E.; PEZZOTTI, F.; NAVARRO, A; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: solvent engineering approach. ***Journal of Biotechnology***, v. 102, n. 3, p. 251–259, 2003.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipase. ***Química 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, n. 4-6, p. 949–954, 2001.

CHANG, S. W.; SHAW, J. F. Biocatalysis for the production of carbohydrate esters. ***New Biotechnology***,;26:109–16, 2009.

CHARTRAIN, M.; GREASHAM, R.; MOORE, J. et al. Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 11, n. 4-6, p. 503–512, 2001.

CHITTENDEN, G. J. F.; VERHART, C. G. F.; CARIS, B. M. G.; ZWANENBURG, B. Acetalation Studies. Part IX. Reaction of sucrose and some related sugars with acetone in the presence of iodine: a novel cleavage-isopropylidenation method. ***Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.***, v. 111 (7-8), p. 348-352, 1992.

CHORTYK, O. T.; **Chemically synthesized sugar esters for the control of soft-bodied arthropods.** United Sates Patent: The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture, Washington, DC. US 6,608,039 B1, aug. 19, 2003.

CHRISTENSEN, M. W.; KIRK, O.; PEDERSEN, C. P. **Process for immobilization of enzymes.** United States Patent Application Publication: Novozymes North America, New York. US 2003/0203457 A1, oct, 30, 2003.

COLLINS, S. E.; LASSALLE, V.; FERREIRA M. L. FTIR-ATR characterization of free Rhizomucor meihei lipase (RML), Lipozyme RMIM and chitosan-immobilized RML, ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 72, p. 220– 228, 2011.

CORRÊA, F. D. A.; SUTILI, F. K.; MIRANDA, L. S. M. et al. Epoxidation of oleic acid catalyzed by PSCI-Amano lipase optimized by experimental design. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 81, p. 7–11, 2012.

CORREA, M.A.; SCARPA, M. V.; FRANZINI, M.C.; OLIVEIRA, A.G. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflamatory naproxen into cationic O/W microemulsions. ***Colloids and Surfaces B,.*** v. 43, p. 108-114, 2005.

COSTA, I. C. R.; LEITE, S. G. F.; LEAL, I. C. R.; MIRANDA, L. S. M; DE SOUZA, R. O. M. A. Thermal Effect on the Microwave Assisted Biodiesel Synthesis Catalyzed by Lipases. ***Journal of the Brazilian Chemical Society***, v. 22(10), p. 1993-1998, 2011.

COSTA, V.E.U.; AMORIM, H.L. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. ***Química Nova***, v. 22, nº 6, p. 863-873, 1999.

COULON, A.; ISMAIL, M.; GIRARDIN, B.; ROVEL, M.; GHOUL. Effect of different biochemical parameters on the enzymatic synthesis of fructose oleate, ***J. Biotechnol,*** v. 51, 2, p. 115–123, 1996.

COULON, D.; GIRARDIN, M.; ENGASSER, J.-M.; GHOUL, M. Investigation of keys parameters of fructose oleate enzymatic synthesis catalyzed by an immobilized lipase. ***Industrial Crops and Products***, v. 6, n. 3-4, p. 375–381, 1997.

CSÓKA G.; MARTON S.; GELENCSÉR A. Sugar fatty acid esters, as liberation and penetration enhancer in transdermal therapeutic systems, ***European Journal of Pharmaceutical Sciences***, 25(S1), S72, 2005.

CUNHA A. G., FERNÁNDEZ-LORENTE G., BEVILAQUA J. V., DESTAIN J.,PAIVA L. M. C., FREIRE, D. M. G., FERNÁNDEZ-LAFUENTE R., GUISÁN J. M. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase: a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v.146, p.49 -56, 2008.

D'AMATO, V. **Process for the preparation of pure sucrose esters.** United States Patent Office: Ledoga S. p. A., Milan, Italy. US 3,054,789, sept. 18, 1962.

DANG, H. T.; OBIRI, O.; HAYES, D. G. Feed batch addition of saccharide during saccharide-fatty acid esterification catalyzed by immobilized lipase: Time course, water activity, and kinetic model. ***Journal of the American Oil Chemists Society***, v. 82, n. 7, p. 487–493, 2005.

DE GOEDE A.T.J.W.; OOSTEROM M. V.; DEURZEN M.P.J. V.; SHELDON R. A.; BEKKUM H. V.; RANTWIJK F. V. Selective Lipase-Catalyzed Esterification of Alkyl Glycosides. ***Biocatalysis and Biotransformation***, , Vol. 9, p 145-155, 1994.

DE MARIA P. D., XENAKIS A., STAMATIS H., SINISTERA J.V. Lipase factor (LF) as a characterization parameter to explain the catalytic activity of crude lipases from Candida rugosa, free or immobilized in microemulsion-based organogels. ***Enzyme Microb. Technol.*** v. 35, p. 277–83, 2004,.

DE, T. K.; MAITRA, A. Solution behaviour of Aerosol OT in non-polar solvents. ***Advances in Colloid and Interface Science***, v. 59, p. 95–193, 1995.

DEGN, P; ZIMMERMANN, W. Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from Candida antarctica. ***Biotechnology and bioengineering***, v. 74, n. 6, p. 483–91, 2001.

DELIMITSOU, C.; ZOUMPANIOTI, M.; XENAKIS, A.; STAMATIS, H. Activity and stability studies of Mucor miehei lipase immobilized in novel microemulsion-based organogels. ***Biocatal. Biotransform.***, v. 20, p. 319, 2002.

DEL-VAL M.; OTERO C. Kinetic and spectroscopic behaviour of a lipase-microgel derivative in aqueous and micellar media. ***J. Mol. Catal. B: Enzymatic***, v. *4, p.* 137–147, 1998.

FARONE, W. A.; PALMER, T.; PUTERKA, G. J. **Polyol ester insecticides and method of synthesis.** United States Patent: AVA Chemical Ventures L. L. C., Portsmouth, NH. US 6,419,941 B1.

FARONE, W. A.; SERFASS, R. W. **Sugar-ester manufacturing process.** United Sates Patent: Kimball Chase Tech Ltd., Portsmouth. US 5,756,716, may 26, 1998.

FEITOSA, E.; CATELAM, K. T.; HASMANN, F. A; et al. Phase diagrams of a CTAB/organic solvent/buffer system applied to extraction of enzymes by reverse micelles. ***Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences***, v. 862, n. 1-2, p. 58–63, 2008.

FERNANDES, M. L. .; KRIEGER, N; BARON, A. . et al. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by Thermomyces lanuginosa lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 30, n. 1, p. 43–49, 2004.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A. et al. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 44, n. 1, p. 8–13, 2007.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 62, n. 3-4, p. 197–212, 2010.

FERREIRA V. F. Carboidratos abundantes em química orgânica. ***Química Nova***, 18 (2) 1995.

FERREIRA, V. F.; PERRONE, C. C. Sacarose no laboratório de química orgânica de graduação. ***Química Nova*** , v. 24, n. 6, p. 905–907, 2001.

FERRER, M.; CRUCES, M. A.; BERNABE, M.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J. Acylation of Sucrose in Two-Solvent Mixtures. ***Biotechnology and Bioengineering,*** v. 65, n. 1, p. 10-16 ,1999.

FEUGE, R. O.; ZERINGUE, H. J.; WEISS, T. J. **Process for the production of sucrose esters of fatty acids.** United Sates Patent Office: The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture, New Orleans. US 3,714,144, jan. 30, 1973.

FEUGE, R.O.; ZERINGUE, JR., H. J.; WEISS, T. J.; BROWN, M. Preparation of Sucrose Esters by Interesterification. ***Journal of the American Oil Chemists Society***, v. 47 (2), p. 56-60, 1970.

FLETCHER, P. D. I.; ROBINSON, B. H.; FREEDMAN, R. B.; OLDFIELD, C. Activity of lipase in water-in-oil microemulsions. ***Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1***, v. 81, n. 11, p. 2667, 1985.

FONSECA, E. V. **Obtenção de Acrilatos de Frutose por Catálise Enzimática,** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2008.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 40, n. 4, p. 769-777, 2007.

FORESTI, M.L.; PEDERNERA, M.; BUCALA, V.; FERREIRA, M.L. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 41, 1-2, p. 62-70, 2007.

FORMARIZ, T.P; URBAN, M.C.C.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M.P.D.; OLIVEIRA, A. G. O. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. ***Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 41 (3), p. 301-313, 2005.

FREGAPANE, G.; SARNEY, D. B; VULFSON, E. N. Enzymic solvent free synthesis of sugar acetal fatty acid esters. ***Enzyme Microb. Technol.***, v. 13, p. 796–800, 1991.

FREIRE D. M. G., CASTILHO, L. R. Lipases em biocatálise. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**, cap. 16, p.369-385, 2008.

FREIRE, D. M. G.; SOUSA, J. S.; OLIVEIRA, E. A. C. **Biotechnological Methods to Produce Biodiesel**, in Ashok Pandey, Christian Larroche, Steven C Ricke, Claude-Gilles Dussap, Edgard Gnansounou, editores, *Biofuels*, Academic Press, Burlington, p. 315-337, 2011.

GAMA, M., AIRES-BARROS, M. R., CABRAL, J. **Engenharia Enzimática**, Editora Lidel, 2003.

GAO, C.; WHITCOMBE, M. J.; VULFSON, EVGENY N. Enzymatic synthesis of dimeric and trimeric sugar-fatty acid esters. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 25, p. 264–270, 1999.

GARCÍA-JUNCEDA, E.; GARCÍA-GARCÍA, J. F.; BASTIDA, A.; FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A. Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry***, v. 12, n. 8, p. 1817–34, 2004.

GAVISH, B.; WERBER, M. M. Viscosity-Dependent Structural Fluctuations in Enzyme Catalysis. ***Biochemistry***, v. 18, p. 1269–1275, 1979.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry. ***Biotechnology advances***, v. 23, n. 7-8, p. 471–99, 2005.

GIBBONS, J. P. **Direct esterification of glycosides with fatty acids.** United States Patent Office: Corn Products Refining Company, New York. US 2,759,922, aug. 21, 1956.

GLEN, W. L.; D'URFE, B.; MYERS, G.; BARBER, R. J. **Alkyl sugars derivatives and their preparation.** United States Patent Office: American Home Products Corporation, New York. US 2,715,121, aug., 1955.

GONÇALVES, K. M.; SUTILI, F. K.; JÚNIOR, I. I. et al. A comprehensive study on the activity and deactivation of immobilized Lecitase Ultra in esterifications of food waste streams to monoacylglycerols. ***ChemSusChem***, v. 6, n. 5, p. 872–9, 2013.

GONÇALVES, K. M.; SUTILI, F. K.; LEITE, SELMA G F; SOUZA, R. O. M. A DE; LEAL, IVANA CORREA RAMOS. Palm oil hydrolysis catalyzed by lipases under ultrasound irradiation--the use of experimental design as a tool for variables evaluation. ***Ultrasonics sonochemistry***, v. 19, n. 2, p. 232–6, 2012.

GONÇALVES, L. A. G. ***Óleos & Grãos***, v. *5*, p. 27, 1996.

GOUVEIA, E. R.; LIMA D. P. A.; DUARTE M. do S.; LIMA G. M. de S.; ARAÚJO J. M. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes. ***Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento***, Ed. 30, p. 39-45, 2003.

GUISÁN, J.M., SABUQUILLO, P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., FERNANDEZ-LORENTE, G. Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylemine, ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 11, p. 817-824, 2001.

GUNAWAN, E. R.; BASRI, M.; RAHMAN, M. B. A.; SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. Study on response surface methodology (RSM) of lipase-catalyzed synthesis of palm based wax ester. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 37, p. 739–744, 2005.

GUNSTONE, F. D. Review Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. ***Journal of the Science of Food and Agrilculture***, v. 79, p. 1549, 1999.

GUPTE, A.; NAGARAJAN, R.; KILARA, A. **Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence.** Ed. Elsevier Science, p 74, 1995.

HA, S. H.; HIEP, N. M.; KOO, Y.-M. Enhanced production of fructose palmitate by lipase-catalyzed esterification in ionic liquids. ***Biotechnology and Bioprocess Engineering***, v. 15, n. 1, p. 126–130, 2010.

HABULIN, M.; ŠABEDER, S.; KNEZ, Ž. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity. ***The Journal of Supercritical Fluids***, v. 45, n. 3, p. 338–345, 2008.

HAERING, G.; LUISI, P. L. Hydrocarbon Gels from Water-in-Oil Microemulsions. **The *Journal of Physical Chemistry***, v. 90, p. 5892–5895, 1986.

HARTMANN, M.; JUNG, D. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. ***Journal of Materials Chemistry***, v. 20, p. 844, 2010.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 39, p. 235–251, 2006.

HASS, H. B.; SUMMIT, N. J.; FOSTER, D. **Process for producing sugar esters.** United States Patent Office: Sugar Research Foundation, New York. US 2,893,990, december, 1959.

HILL, K.; RHODE, O. Sugar-based surfactants for consumer products and technical applications. ***Fett/Lipid***, v. 101, n. 1, p. 25–33, 1999.

HOYDONCKX, H.E.; VOS, DE E. D.; CHAVAN, S. A.; JACOBS, P. A. Esterification and transesterification of renewable chemicals. ***Topics in Catalysis***, v. 27 (1-4), p. 83-96, 2004.

HUMEAU, C.; GIRARDIN, M.; ROVEL, B.; MICLO, A. Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate. ***Journal of Biotechnology***, v. 63, n. 1, p. 1–8, 1998.

ILLANES, A. **Biotecnologia de enzimas**, Ediciones Universitarias de Valparaíso, Chile, 1994, pp. 256.

ISABELLE, R. F.; GINO, C. R. **Procédé de synthése d'acétonides de monosaccharides et/ou de leurs derives foncotionnalisés, à partir de (mono-, di-, poly-) saccharides.** Institut National de lah Proprieté Industrirlle: Generale Sucriere, Forme jurídique: societé anonyme – Paris, FR. 2 655 347, jun. 7, 1991.

ITABAIANA, I.; MARIZ E MIRANDA, L. S. DE; SOUZA, R. O. M. A. DE. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 85-86, p. 1–9, 2013.

_____; GONÇALVES, K. M.; CORDEIRO, Y.M.L.; ZOUMPANIOTI, M.; LEAL, I. Kinetics and mechanism of lipase catalyzed monoacylglycerols synthesis. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***,v. 96, p. 34-39, 2013.

_____; SUTILI, F. K.; LEITE, S. G. F. et al. Continuous flow valorization of fatty acid waste using silica-immobilized lipases. ***Green Chemistry***, v. 15, n. 2, p. 518, 2013a.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. ***Annual review of microbiology***, v. 53, p. 315–51, 1999.

JAMES, K. **Products of surface active material.** United States Patent: Tate & Lyle Limited, London, England. US 4,032,702, june 28, 1977.

JOHNS, M.L.; HOLLINGSWORTH, K.G. Characterisation of emulsion systems using NMR and MRI, ***Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy***, v.50, p.51-70, 2007.

JUNIOR, I. I.; FLORES, MARCELA C.; SUTILI, F. K.; LEITE, SELMA G.F. et al. Fatty acids residue from palm oil refining process as feedstock for lipase catalyzed monoacylglicerol production under batch and continuous flow conditions. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 77, p. 53–58, 2012.

_____; FLORES, MARCELA C.; SUTILI, F. K.; LEITE, SELMA G. F. et al. Lipase-Catalyzed Monostearin Synthesis under Continuous Flow Conditions. ***Organic Process Research & Development***, v. 16, n. 5, p. 1098–1101, 2012.

_____; SUTILI, F. K.; LEITE, SELMA G.F. et al. DoE oriented reaction optimization on the lipase-catalyzed monostearin synthesis. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 72, n. 3-4, p. 313–318, 2011.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. **A Multi-Volume Comprehensive Treatise Biotechnology.** Rehm, H. J.; Stader, P., eds.; 1998, vol. 8A, 38.

KEA S.; C. E. WALKER. **Separation and purification of sugar esters synthesized from both aqueous and noqueous systems.** United States Patent: Nebraska Departmente of Economic Development. US 4,710,567, december 1, 1987b.

KEA, S,; WALKER, C. E. **Sugar esters and an improved anhydrous method of manufacture.** United States Patent: Nebraska Department of Economic Development, Lincoln, Nebr. US 4,683,299, jul. 28, 1987.

KEA, S.; WALKER, C. E.. **Sugar esters and an improved anhydrous method of manufacture.** United States Patent: Nebraska Departmente of Economic Development. 4,683,299, jul. 28, 1987a.

KENNEDY, J. F.; KUMAR, H.; PANESAR, P. S. et al. Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds. ***Journal of Chemical Technology and Biotechnology***, v. 81, p. 866–876, 2006.

KIRCHNING, A.; SOLODENKO, W.; MENNECKE, K. Combining enabling techniques inorganic synthesis: continuous flow processes with heterogenized catalysts. ***Chem. Eur. J.,*** v. 12, p. 5972-5990, 2006.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. ***NATURE***, v. 409, p. 241, 2001.

KOBAYASHI, T.; EHARA, T.; MIZUOKA, T.; ADACHI, S. Efficient synthesis of 6-O-palmitoyl-1,2-O-isopropylidene-α-D-glucofuranose in an organic solvent system by lipase-catalyzed esterification. ***Biotechnology letters***, v. 32, n. 11, p. 1679–84, 2010.

LAWRENCE, M. J.; RESS, D. G. Microemulsion-based as a novel drug delivery systems. ***Adv. Drug Delivery Rev.*** v.45, p.89-121, 2000.

LEE, S. H.; DANG, D. T.; HA, S. H.; CHANG, W.; KOO, Y. Lipase-Catalyzed Synthesis of Fatty Acid Sugar Ester Using Extremely Supersaturated Sugar Solution in Ionic Liquids. ***Biotechnology and Bioengineering***, v. 99, n. 1, p. 1–8, 2007.

LI, D.; ADHIKARI, P.; SHIN, J. -A. Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero trans shortening fats.***Food Science and Technology***, v. 43, n. 3, p. 458–464, 2010.

LIDE, D. R. **CRC Handbook of chemistry and physics**: A ready-reference book of chemical and physical data. 84º ed. Boca Raton, London, New York and Washington, D.C.: CRC Press, 2004. p. 290.

LIMA, J. R.; NASSU, R. T. Substitutos de Gorduras em Alimentos: Características e Aplicações. ***Quim. Nova***, v. *19*, 127, 1996.

LIU, Q.; JANSSEN, M. H. A.; RANTWIJK, F. VAN; SHELDON, R. A. Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations. ***Green Chemistry***, v. 7, n. 1, p. 39, 2005.

LORAND, E. J. **Fatty acid esters of carbohydrates and method for producing.** United States Patent Office: Hercules Powder Company, Wilmington. US 1,959,590, may 22, 1934.

LORTIE, R. Enzyme catalyzed esterification. ***Biotechnology advances***, v. 15, n. 1, p. 1–15, 1997.

LOUGHLIN, W. A. Biotransformations in organic synthesis. ***Bioresource Technology,*** v. 74, p. 49–62, 2000.

LU, J.; NIE, K.; WANG, F.; TAN, T. Immobilized lipase Candida sp 99-125 catalyzed methanolysis of glycerol trioleate: Solvent effect. ***Bioresource Technology***, v. 99, p. 6070–4, 2008.

LUISI, P. L.; LAANE, C. Solubilization of enzymes in apolar solvents via reverse micelles. ***Tibtech*** , v. june, p. 153-161, 1986.

LUISI, P. L.; WOLF, R. Micelar Solubilization of Enzymes in Hydrocarbon Solvents, Enzymatic Activity and Spectroscopic Properties of Ribonuclease in n-octane. ***Biochem. Biophys. Res. Comm.***, v. 89, p. 209-217, 1979.

MARTINEK, K.; LEVASHOV, A V; KLYACHKO, N.; KHMELNITSKI, Y. L.; BEREZIN, I. V. Micellar enzymology. ***European journal of biochemistry / FEBS***, v. 155, n. 3, p. 453–68, 1986.

MATSUMOTO, S.; HATAKAWA, Y.; NAKAJIMA, A. **Process for purifying sucrose fatty acid esters having high HLB.** United States Patent: Dai-Ichio Kogyo Seiyaku Co., Ltd., Kyoto, Japan. US 5,017,697, may 21, 1991.

MATZKE, S. F.; CREAGH, A. L.; HAYNES, C. A.; PRAUSNITZ, J. M.; BLANCH, H. W.; Mechanisms of protein solubilization in reversed micelles. ***Biotechnol. Bioeng***. v. 40, p. 91–102, 1992.

MAY, O.; VERSECK, S.; BOMMARIUS, A. et al. Development of Dynamic Kinetic Resolution Processes for Biocatalytic Production of Natural and Nonnatural L -Amino Acids Abstract : , v. 6, n. 4, p. 253–257, 2002.

MEIER, M. A. R.; METZGER, J. O.; SCHUBERT, U. S. Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science. ***Chemical Society Reviews***, v. 36, n. 11, p. 1788, 2007.

MENGER, F. M.; YAMADA, K. Enzyme Catalysis in Water Pools. ***Journal of the American Chemical Society***, v. 1, n. 36, p. 6731, 1979.

MIRANDA, I.C.R.; L.S.M.; DE SOUZA, R.O.M. A; XENAKIS, A. Kinetics and mechanism of lipase catalyzed monoacylglycerols synthesis. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, Accepted Manuscript, 2013b.

MIZUTANI, N.; SAZAKI, I.; ITO, T.; UENO, H. **Method for the purification of sucrose esters osf fatty acids.** U. S. Patent: Dai Ichi Kogyo Company, Kyoto, Japan. US 3,748,324, july 24, 1973.

MOULIK, S. P.; PAUL, B. K. Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. ***Advances in Colloid and Interface Science***, v. 78, n. 2, p. 99–195, 1998.

MUTUA, C.; AKOH, C. Synthesis of alkylglycoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida* sp. Lipase. ***J. Am. Oil Chem. Soc.***, v. 70, 1, p. 43–46, 1993.

NAGAYAMA K., M. IMAI, M. SHIMIZU, T. DOI, Kinetic study of lipase-catalyzed hydrolysis in AOT and lecithin microemulsion systems, ***Seibutsu Kogaku***, v 74, p. 255–260, 1996.

NAKAMURA, S.; NAKAHARA, H. **Method of producing sucrose fatty acid ester granules.** United States Patent: Dai-Ichio Kogyo Seiyaku Co., Ltd., Kyoto, Japan. US 4,898,935, feb. 6, 1990.

NEANG, P. M.; SUBILEAU, M.; PERRIER, V.; DUBREUCQ, E. Peculiar features of four enzymes of the CaLA superfamily in aqueous media: Differences in substrate specificities and abilities to catalyze alcoholysis. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 94, p. 36–46, 2013.

NETA, N. D. A. S.; SANTOS, J. C. S. DOS; SANCHO, S. D. O. et al. Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. ***Food Hydrocolloids***, v. 27, n. 2, p. 324–331, 2012.

NETA, N. S.; PERES, A. M.; TEIXEIRA, J. A; RODRIGUES, L. R. Maximization of fructose esters synthesis by response surface methodology. ***New biotechnology***, v. 28, n. 4, p. 349–55, 2011.

NOBILE, L.; NOCE, T. L. **Process for the preparation of purified sucrose esters and products obtained thereby.** United States Patent Office: Ledoga S. p. A., Milan, Italy. US 3,249,600, may 3, 1966.

NOVO NORDISK, Lipozyme® IM, Product sheet, B 347 C-GB 200, 1992 a.

NOVO NORDISK, Lipozyme® RM IM, Product sheet, B 347 D-GB, 1999.

O'BOYLE, C. J. **Purifying esters of polyhydric alcohols.** Patent USA: Noyes Data Corporation, Parke Ridge, New Jersey. US 3,378,543, july, 1986.

OLDFIELD C. Enzymes in Water-in-oil Microemulsions ('Reverse Micelles'): Principles and Aplications. ***Biotechnology and Genetic Engineering Reviews,*** v. 12, p. 256-327, 1994.

OLIVE, G.; TOREZAN, G. A. P.; BLECKER, C. Synthèse enzymatique d'esters de fructose. ***Comptes Rendus Chimie***, v. 15, n. 11-12, p. 1037–1047, 2012.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: Estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. ***Química Nova,*** v. 27, p. 131, 2004.

OOSTEROM, M. W.; RANTWIJK, F. VAN; 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.

OSIPOW, L. I.; ROSENBLATT, W. **Transesterification in the presence of a transparent emulsion.** United States Patent: State of Nebraska. US 3,644,333, february 22, 1972.

OSIPOW, L.I.; ROSENBLATT W., Micro-Emulsion Process for the Preparation of Sucrose Esters. ***J. Am. Oil Chem. Soc.*** v. 44, p 307, 1967.

PAIVA, A.; BALCÃO, V.; MALCATA, F. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. ***Enzyme and microbial technology***, v. 27, n. 3-5, p. 187–204, 2000.

PAPADIMITRIOU, V.; PETIT C, CASSIN, G.; XENAKI, A.; PILENI, M. P. Lipase catalyzed esterification in aot reverse micelles: a structural study. ***Advances in Colloid and Interface Science,*** v. 54, p. 1-16, 1995.

PARADKAR, V.M.; DORDICK, J.S., Mechanism of extraction of chymotrypsin into isooctane at very low concentrations of aerosol OT in the absence of reversed micelles, ***Biotechnol. Bioeng.*** v. *43*, p. 529, 1994,.

PARKER, K. J.; KHAN, R. A.; Mufti, K. S. **Process of making sucrose esters.** United States Patent: Tite & Lyle Limited, London, England. US 3,996,206, December, 7, 1976.

PARKER, K. J.; KHAN, R. A.; MUFTI, K. S. **Process of making sucrose esters.** United States Patent: Tate & Lyle Limited, London, England. US 3,996,206, dec. 7, 1976.

PASTOU, A.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A. Microemulsion-based organogels containing lipase: application in the synthesis of esters. ***Prog. Colloid Polym. Sci***, v. 115, p. 192, 2000.

PAULY, Y G.; ENGASSER, J.; GHOUL, M. **Method for enzymatic synthesis of sucrose esters.** U. S. Patent: Laboratoires Serobiologiques (Societe Anonyme), France. US 6,355,455, march 12, 2002.

PEDERSEN, N. R.; WIMMER, R.; EMMERSEN, J.; DEGN, PETER; PEDERSEN, L. H. Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalysed esterification of disaccharides. ***Carbohydrate research***, v. 337, n. 13, p. 1179–84, 2002.

PENG, L.; XU, X.; MU, H.; HØY, C. E.; ADLER-NISSEN, J. Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology. ***Enzyme and Microbial Technology,*** v. 31, p. 523–532, 2002.

PILENI M.P., T. ZEMB, C. PETIT, Solubilization by reverse micelles: solute localization and structure perturbation, ***Chem. Phys. Lett***. v. 118 , p. 414–420, 1985.

PLOU, F. J.; CRUCES, M. A.; FERRER, M. et al. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. ***Journal of biotechnology***, v. 96, n. 1, p. 55–66, 2002.

POLAT, T.; LINHARDT, R.J. Syntheses and , Rhipplications of sucrose-based esters. ***Journal of Surfactants and Detergents***, v. 4 (4), p. 415-421, 2001.

PYO, S.-H.; HAYES, D. G. Designs of Bioreactor Systems for Solvent-Free Lipase-Catalyzed Synthesis of Fructose–Oleic Acid Esters. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 86, n. 6, p. 521–529, 2009.

PYO, S.-H.; HAYES, D. G. Desorption of Fructose from a Packed Column to an Oleic Acid/Fructose Oleate Mixture for Employment in a Bioreactor System. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 85, n. 11, p. 1033–1040, 2008.

QIAN, Z.; HORTON, J. R.; CHENG, X.; LUTZ S. Structural Redesign of Lipase B from Candida Antarctica by Circular Permutation and Incremental Truncation, ***J. Mol. Biol.*** v. 393, p. 191–201, 2009.

RAHMAN R. A.; HERAWAN T.; OMAR O. Preparation of biodegradable and vegetable based surfactant from sugar and palm fatty acid catalyzed by *Mucor miehei* lipase. ***Elaeis,*** v 9 p. 100– 110, 1997.

RAO, N. N.; LUTZ, S. WURGES, K. MONOIR, D. Continuous Biocatalytic Processes. ***Organic. Process Research and Development***, v. 13 (3), p. 607-616, 2009.

RAUTER, A. P.; RIBEIRO, F. R.; FERNANDES, A. C.; FIGUEIREDO, J. A. A new method of acetonation with the zeolite HY as catalyst. Synthesis of *O*-isopropylidene sugar derivatives, ***Tetrahedron***, v. *23*(51); p. 6529-6540, 1995.

REBOCHO, S. F. **Síntese de acetato de decilo por catálise enzimática em meio supercrítico**, Dissertação Universidade Nova Lisboa, p. 79, 2008.

REES, G. D.; NASCIMENTO, M.G.; JENTA, T. R-J; ROBINSON, B.H. Reverse enzyme synthesis in microemulsion-based organogels. ***Biochim Biophys Acta.,*** v. 1073, p. 493–501, 1991.

REES, G. D.; ROBINSON, B. H.; STEPHENSON, G. R. Macrocyclic lactone synthesis by lipases in water-in-oil microemulsions. ***Biochim. Biophys. Acta***, v. 1257, p. 239–248, 1995.

REICHARDT, C. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry**; VCH: New York,1990.

RIANELLI, R. de S. **Desenvolvimento de métodos sintéticos utilizando argilas naturais e diazo-1,3-dicarbonílicos.** Tese de doutorado, UFF, Niterói, 2006.

RIBEIRO, E. J. **Estudo Cinético da Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre e Imobilizada.**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1989.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**, second ed., Cárita Publishing House, 2005, p. 342.

RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,*** v. 64, p. 1–22, 2010.

ROTTICCI, D. **Understanding and Engineering the Enantioselectivity of Candida antarctica Lipase B towards sec-Alcohols**. University dissertation from Stockholm, 61 p., 2000.

RUCKENSTEIN, E.; KARPE, P. Enzymatic Super- and Subactivlty in Nonionlc Reverse Micelles. ***The Journal of Physical Chemistry,*** v. 95, p. 4869–4882, 1991.

RUELA, H. S.; SUTILI, F. K.; LEAL, IVANA C. R. et al. Lipase-catalyzed synthesis of secondary glucose esters under continuous flow conditions. ***European Journal of Lipid Science and Technology***, v. 115, n. 4, p. 464–467, 2013.

ŠABEDER, S.; HABULIN, M.; KNEZ, Z. Comparison of the Esterification of Fructose and Palmitic Acid in Organic Solvent and in Supercritical Carbon Dioxide. ***Ind. Eng. Chem. Res***., 44, 9631-9635, 2005.

_____. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. ***Journal of Food Engineering***, v. 77, n. 4, p. 880–886, 2006.

SAKAKI, K.; AOYAMA, A.; NAKANE, T.; IKEGAMI, T.; NEGISHI H.; WATANABE, K.; YANAGISHITA, H. Enzymatic synthesis of sugar esters in organic solvent coupled with pervaporation. ***Desalination***, v. 193, n. 1-3, p. 260–266, 2006.

SALES, A.L.C. **Síntese, caracterização e análise térmica dos sais de Lítio, Sódio e Potássio do Ácido palmítico e do seu éster etílico**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2006.

SARDA, L., DESNUELE, P., Action de la lipase pancréatique sur les esters en Emulsion. ***Biochimica et Biophysica Acta***, v. 58, pp. 513-521, 1958.

SARNEY, D. B.; BARNARD, M. J.; MACMANUS, D. A.; VULFSON, E. N. Application of lipases to the regioselective synthesis of sucrose fatty acid monoesters. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 73, n. 11, p. 1481–1487, 1996.

SARNEY, D. B.; KAPELLER, H.; FREGAPANE, G.; VULFSON, E. N. Chemo-Enzymatic Synthesis of Disaccharide Fatty Acid Esters. ***Journal of the American Oil Chemists' Society,*** v. 7, n. 7, p. 711–714, 1994.

SARNEY, D. B.; VULFSON, E. N.. Application of enzymes to the synthesis of surfactants. ***Trends in biotechnology***, v. 13, n. 5, p. 164–72, 1995..

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. ***Journal of microbiological methods***, v. 52, n. 1, p. 1–18, 2003.

SCHECKERMANN, C.; SCHLOTTERBECK, A.; SCHMIDT, M.; WRAY, V.; LANG, S. Enzymatic monoacylation of fructose by two procedures. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 17, n. 2, p. 157–162, 1995.

SCHIMIDELL, W.; LIMA U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial.** Ed. Edgard Blücher, p. 541, 2001.

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

SEINO, H.; UCHIBORI, T.; INAMASU, S.; NISHITANI, T. **Synthesis of sugar or sugar-alcohol fatty acid esters.** United Sates Patent: Dai-Ichio Kogyo Seiyaku Co., Ltd., Kyoto, Japan. US 4,614,718, sep. 30, 1986.

SHIOMORI, K.; ISHIMURA, M.; BABA, Y. et al. Characteristics and kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in a reverse micellar system. ***Journal of Fermentation and Bioengineering***, v. 81, n. 2, p. 143–147, 1996.

SITNITSKY, A.E. Solvent viscosity dependence for enzymatic reactions. ***Physica A***, v. 387, p. 5483–5497, 2008.

SONI, K.; MADAMWAR, D. Ester synthesis by lipase immobilized on silica and microemulsion based organogels (MBGs). ***Process Biochemistry***, v. 36, p. 607–611, 2001.

SOULTANI, S.; ENGASSER, J.; GHOUL, M. Effect of acyl donor chain length and sugarracyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, p. 725–731, 2001.

SOULTANI, S.; OGNIER, S.; ENGASSER, J.-M.; GHOUL, MOHAMED. Comparative study of some surface active properties of fructose esters and commercial sucrose esters. ***Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects***, v. 227, n. 1-3, p. 35–44, 2003.

SOUSA, A.C.C. **Responsabilidade Social e Desenvolvimento Sustentável: A Incorporação dos Conceitos à Estratégia Empresarial.** Dissertação de Mestrado. Programa de Planejamento Energético/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2006, 213 p..

STAMATIS, H; XENAKIS, A; KOLISIS, F. N. Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases. ***Biotechnology advances***, v. 17, n. 4-5, p. 293–318, 1999.

STAVILA, E.; LOOS, K. Synthesis of lactams using enzyme-catalyzed aminolysis. ***Tetrahedron Letters***, v. 54, n. 5, p. 370–372, 2013.

SVENDSEN, A. Review: Lipase protein engineering, ***Biochimica et Biophysica Acta,*** v. 1543, p. 223-238, 2000.

TAI, H. P.; BRUNNER, G. Sugar fatty acid ester synthesis in high-pressure acetone–CO2 system. ***The Journal of Supercritical Fluids***, v. 48, n. 1, p. 36–40, 2009.

TANG, S. L. Y.; SMITH, R. L.; POLIAKOFF, M. Principles of green chemistry: PRODUCTIVELY. ***Green Chemistry***, v. 7, n. 11, p. 761, 2005.

TANZI, C. D.; VIAN, A. M.; GINIES, C.; ELMAATAOUI, M.; CHEMAT, F. Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. ***Molecules***, v. 17, n. 7, p. 8196–205, 2012.

TARAHOMJOO, S; ALEMZADEH, I. Surfactant production by an enzymatic method. ***Enzyme and Microbial Technology,*** v. 33, p. 33–7, 2003.

THEIL, F.; SCHICK, H. An Improved Procedure for the Regioselective Acetylation of Monosaccharide Derivatives by Pancreatin-Catalyzed Transesterification in Organic Solvents, ***Synthesis***, v. 7, 533–535, 1991.

TORRES, C. F.; MUNIR, F.; LESSARD, L. P.; HILL, Jr C. G. Lipase-Mediated Acidolysis of Tristearin with CLA in a Packed-Bed Reactor: A Kinetic Study, ***JAOCS***, v. 79, n. 7, p. 655-661, 2002.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. ***Food and Bioprocess Technology***, v. 3, n. 2, p. 182–196, 2009.

TSUKAMOTO, J.; HAEBEL, S.; VALEN, G. P.; PETER, M. G.; FRANCO, T. T. Enzymatic direct synthesis of acrylic acid esters of mono- and disaccharides. ***Journal of Chemical Technology and Biotechnology***, v. 83, p. 1486–1492, 2008.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE USDA, site: http://usda.mannlib.cornell.edu, acessada em 15 de fevereiro de 2013.

USKOKOVIĆ, V; DROFENIK, M. Reverse micelles: inert nano-reactors or physico-chemically active guides of the capped reactions. ***Adv. Colloid Interface Sci.*** v. 133, p. 23–4, 2007.

VETEC QUÍMICA FINA Site: www.vetecquimica.com.br, acessada em 23 de março de 2012

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 9, n. 4-6, p. 113–148, 2000.

VULFSON, E. N. **Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application.** Woolley, P.; Petersen, S. B., eds.; Cambridge University Press: Great Britain, p. 271, 1994.

WAGNER, F. W.; DEAN, M. A.; MOTTE, R. S.; STRYKER, V. H. **Separation and purification of sugar ersters.** United States Patent: Nebraska Department of Economic Development, Nebr. US 4,983,731, jan. 8, 1991.

WAGNER, F. W.; MOTTE, R. S.; DEAN, M. A. **Sugar ester synthesis.** United States Patent: Nebraska Department of Economic Development, State of Nebraska. US 4,927,920, may 22, 1990.

WAKABAYASHI, H, **Enzyme-catalyzed transformations of sulfur-containing flavor precursors.** Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation, Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmittel technologie der Technischen Universität München, München, 2004.

WANDREY, C.; LIESE, A.; KIHUMBU, D. ReViews Industrial Biocatalysis : Past , Present , and Future. ***Organic Process Research & Development***, v. 4, n. 2, p. 286–290, 2000.

WANG, Y.; LALONDE, J. J.; MOMONGAN M.; BERGBREITER D. E.; WONG, C., Lipase-Catalyzed Irreversible Transesterifications Using Enol Esters as Acylating Reagents: Preparative Enantio- and Regioselective Syntheses of Alcohols, Glycerol Derivatives, Sugars, and Organometallics. ***J. Am. Chem. Soc.***, v. 59, n. 6, p. 7200–7205, 2001.

WARD, O. P.; FANG, J.; LI, Z. Lipase-catalyzed synthesis of a sugar ester containing arachidonic acid. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 20, n. 1, p. 52–56, 1997.

WATANABE, T.; KATAYAMA, S.; MATSUBARA, M.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. Antibacterial Carbohydrate Monoesters Suppressing Cell Growth of Streptococcus mutans in the Presence of Sucrose. ***Current Microbiology***, v. 41, p. 210–213, 2000.

WONG, C. H.; WHITESIDES, G. M. **Enzymes in Synthetic Chemistry.** Ed. Pergamon. p.370, 1994.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M.; SP, C. A. L. Ester synthesis in lipase- catalyzed reactions. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 0229, p. 438–450, 1998.

YAMAMOTO, T,; KINAMI, K. **Production of sucrose fatty acid polyester.** United States Patent: Dai-Ichio Kogyo Seiyaku Co., Ltd., Kyoto, Japan. US 4,611,055, sep. 9, 1986.

YAN, Y.; BORNSCHEUER, U. T.; STADLER, G.; LUTZ-WAHL S.; REUSS M.; SCHMID R. D. Production of Sugar Fatty Acid Esters by Enzymatic Esterification in a Stirred-Tank Membrane Reactor : Optimization of Parameters by Response Surface Methodology. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 78, n. 2, 2001.

YE, R.; HAYES, D. G. Lipase-Catalyzed Synthesis of Saccharide-Fatty Acid Esters Utilizing Solvent-Free Suspensions: Effect of Acyl Donors and Acceptors, and Enzyme Activity Retention. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 89, n. 3, p. 455–463, 2012.

YE, R.; HAYES, D. G. Optimization of the Solvent-Free Lipase-Catalyzed Synthesis of Fructose-Oleic Acid Ester Through Programming of Water Removal. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 88, p. 1351–1359, 2011.

YE, R.; PYO, S.-H.; HAYES, D. G. Lipase-Catalyzed Synthesis of Saccharide–Fatty Acid Esters Using Suspensions of Saccharide Crystals in Solvent-Free Media. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 87, n. 3, p. 281–293, 2010.

YOO, I. S.; PARK, S. J.; YOON, H. H. Enzymatic Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters. **J. *Ind. Eng. Chem.***, v. 13, n. 1, p. 1–6, 2007.

ZANIN G. M. **Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglicosidase Imobilizada**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1989.

ZHANG, X.; HAYES, D. G. Increased rate of lipase-catalyzed saccharide-fatty acid esterification by control of reaction medium. ***Journal of the American Oil Chemists' Society***, v. 76, n. 12, p. 1495–1500, 1999.

ZHENG, J.-Y.; WANG, Z.; ZHU, Q.; ZHANG, Y.-J.; YAN, H.-D. Resolution of biotin intermediate lactone by enzyme-catalyzed stereoselective lactonization in organic solvent. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, v. 56, n. 1, p. 20–23, 2009.

ZOUMPANIOTI, M.; STAMATIS, H.; PAPADIMITRIOU, V.; XENAKIS, A. Spectroscopic and catalytic studies of lipases in ternary hexane-1-propanol-water surfactantless microemulsion systems. ***Colloids and surfaces. B, Biointerfaces***, v. 47, n. 1, p. 1–9, 2006.

ZOUMPANIOTI, M.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A. Microemulsion-based organogels as matrices for lipase immobilization. ***Biotechnology advances***, v. 28, n. 3, p. 395–406, 2010.

ZOUMPANIOTI, M; PARMAKLIS, P.; MARÍA, P. D. DE. Esterification reactions catalyzed by lipases immobilized in organogels: effect of temperature and substrate diffusion. ***Biotechnology letters***, v. 30, n. 9, p. 1627–31, 2008.

APÊNDICE A

Espectros de RMN

Nesta seção serão anexados os espectros de Ressonância Magnética nuclear (13C-RMN e 1H-RMN) e bi-dimensionais (COSY, HMBC e HSQC) realizados para a confirmação estrutural das respectivas moléculas.

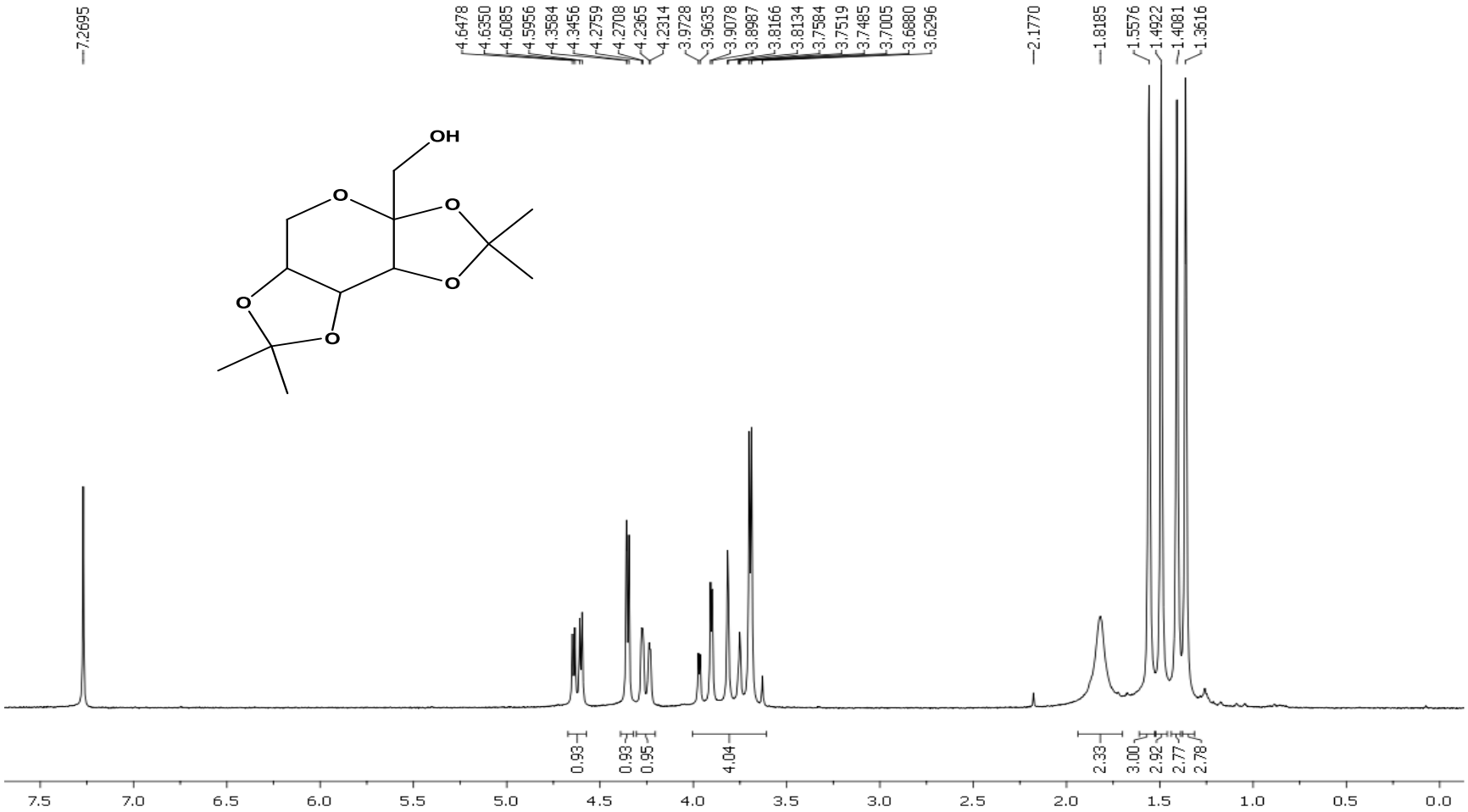


Figura A 1: Espectro de RMN ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) do 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (diacetonídeo da frutose).

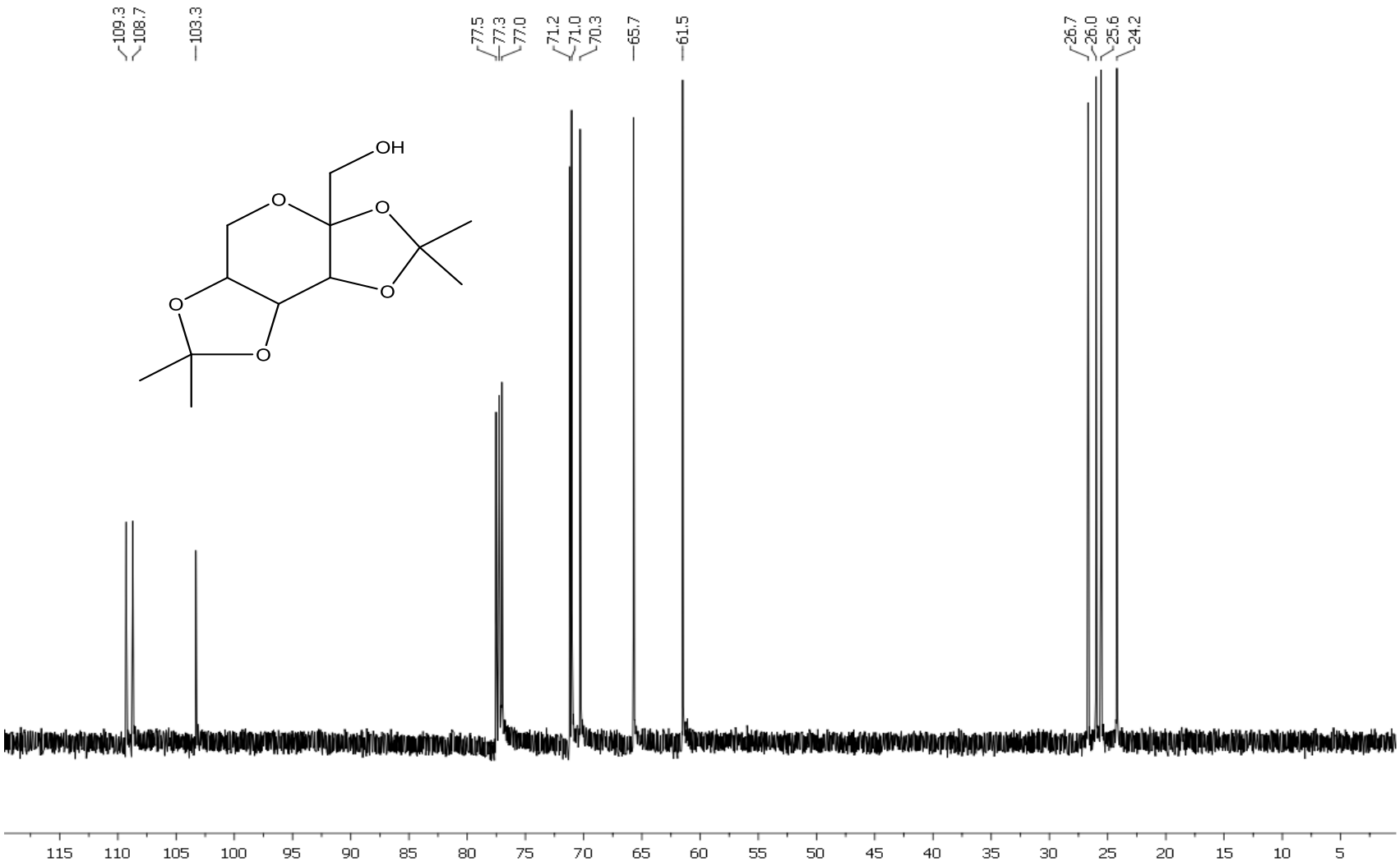

109.3
108.7
103.3
77.5
77.3
77.0
71.2
71.0
70.3
65.7
61.5
26.7
26.0
25.6
24.2
OH
O
O
O
O
O
O
115 110 105 100 95 90 85 80 75 70 65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5

Figura A 2. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) do 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (diacetonídeo da frutose).

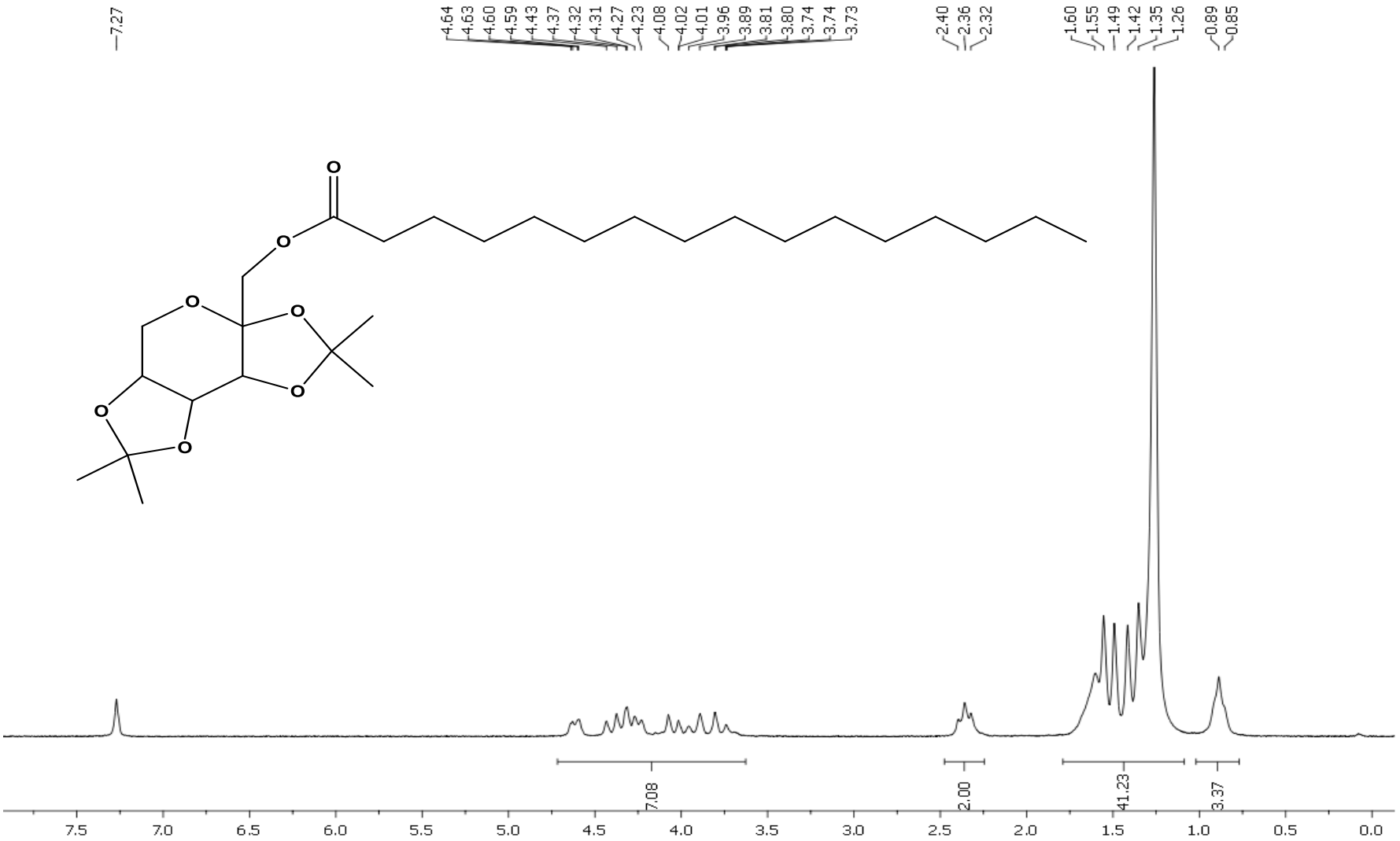


Figura A 3: Espectro RMN ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) do palmitato de 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose.

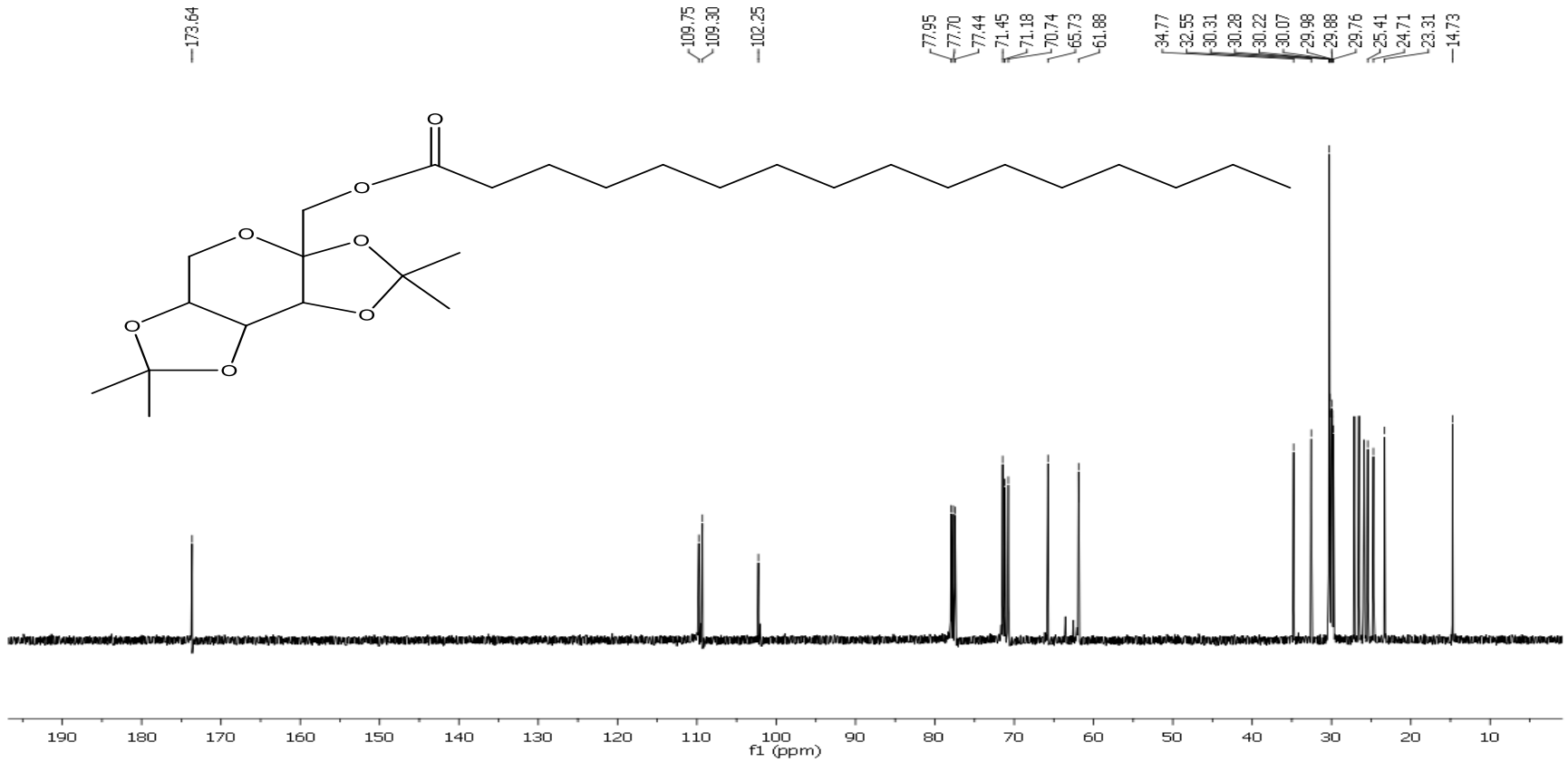


Figura A 4: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz; $CDCl_3$) do palmitato de 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose.

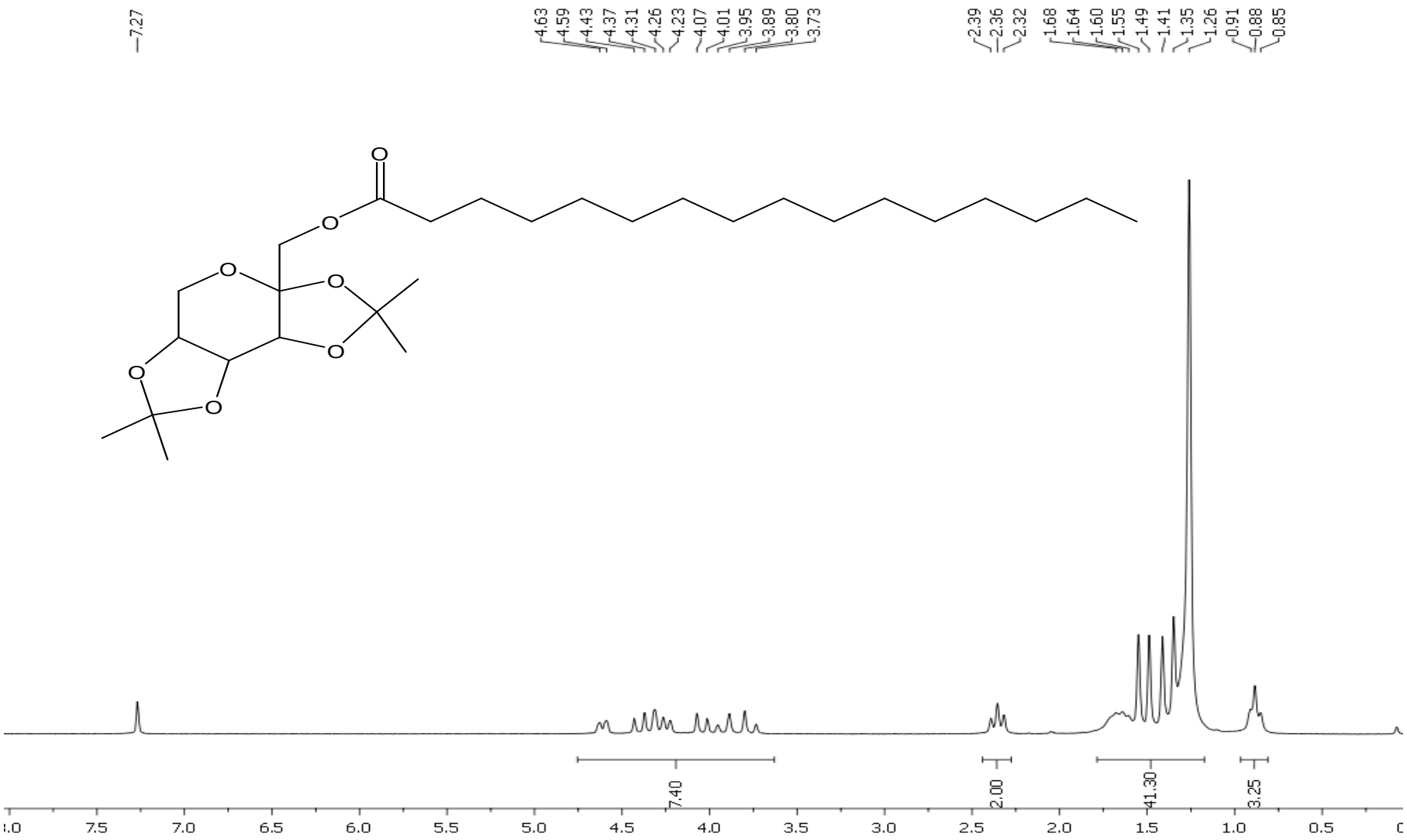


Figura A 5: Espectro RMN ^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) do palmitato de 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose.

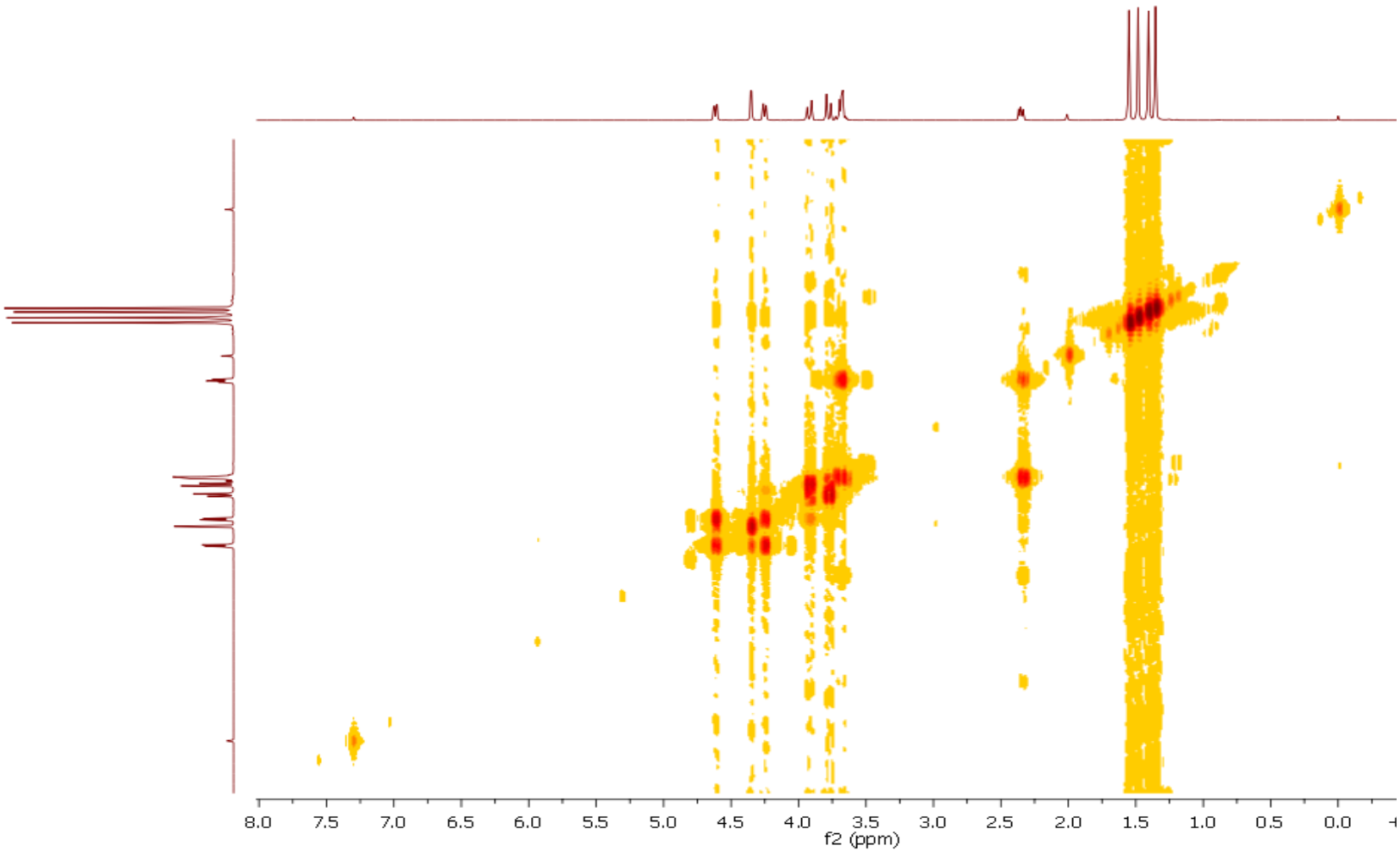


Figura A 6. Espectro de COSY do 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (diacetonídeo da frutose).

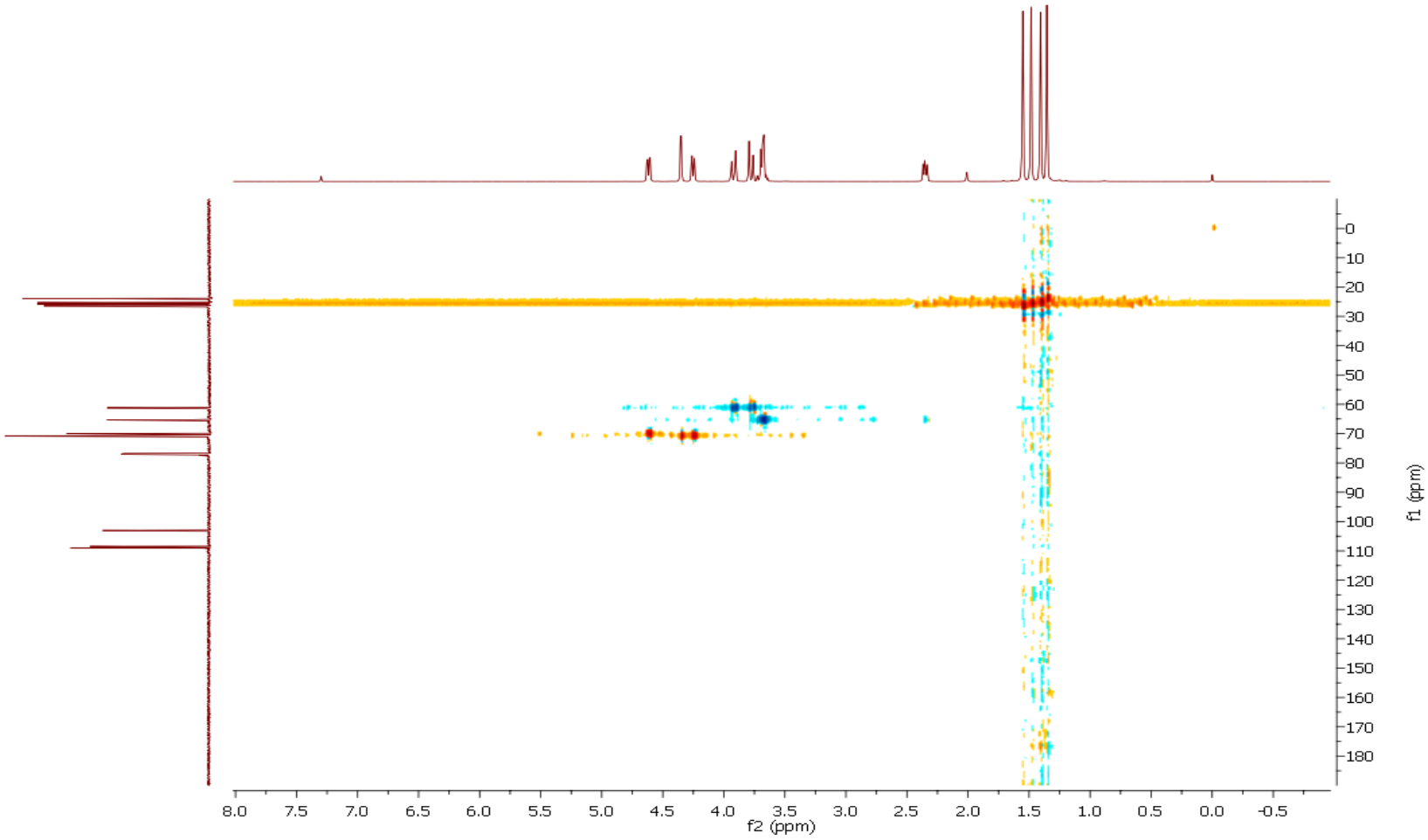


Figura A 7. Espectro de HSQC do 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (diacetonídeo da frutose).

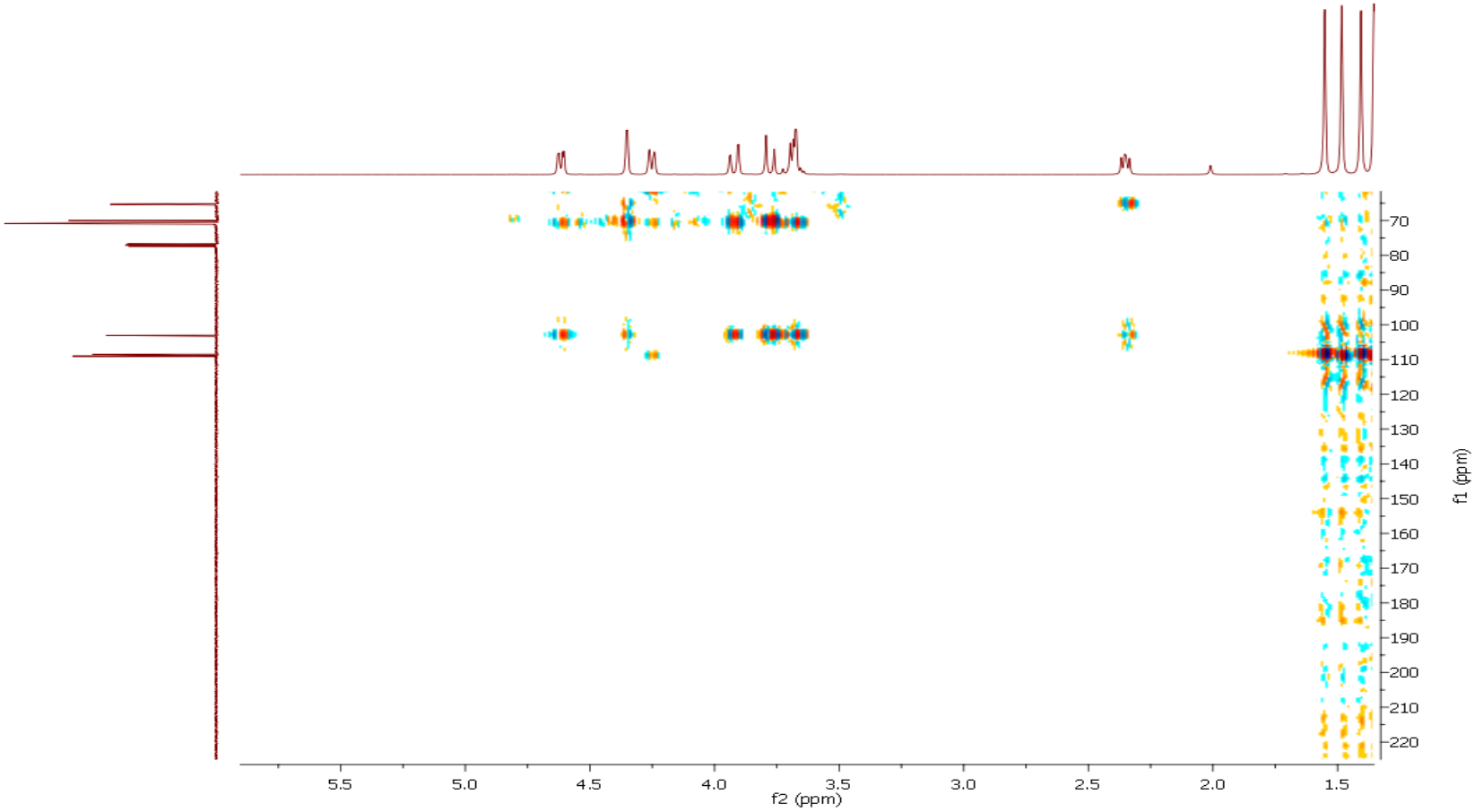


Figura A 8. Espectro de HMBC para o do 2,3:4,5-O-diisopropileideno-β-D-frutopiranose (diacetonídeo da frutose).

APÊNDICE B
PUBLICAÇÕES

Nesta seção, serão anexados todos os trabalhos e publicações resultantes e relacionados com esta tese, além dos realizados em colaboração.

Artigos publicados em periódicos internacionais

1. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 85– 86 (2013) 37– 42.
Felipe K. Sutili, Halliny S. Ruela, Selma G.F. Leite, Leandro S. de M. Miranda, Ivana C.R. Leal, Rodrigo O.M.A. de Souza
Lipase-catalyzed esterification of steric hindered fructose derivative by continuous flow and batch conditions

2. European Journal Lipid Science and Technology 115 (2013) 464–467.
Halliny S. Ruela, Felipe K. Sutili, Ivana C. R. Leal, Nakédia M. F. Carvalho, Leandro S. M. Miranda and Rodrigo O. M. A. de Souza
Lipase-catalyzed synthesis of secondary glucose esters under continuous flow conditions

3. Green Chemistry 15 (2013) 518-524.
Ivaldo Itabaiana Jr., Felipe K. Sutili, Selma G. F. Leite, Karen M. Gonçalves, Yraima Cordeiro, Ivana C. R. Leal, Leandro S.M.Miranda, Manuel Ojeda,Rafael Luqued and Rodrigo O. M. A. de Souza
Continuous flow valorization of fatty acid waste using silica-immobilized lipases

4. ChemSusChem 6 (2013) 872–879.
Karen M. Gonçalves, Felipe K. Sutili, Ivaldo I. Júnior, Marcella C. Flores, Leandro Soter de Mariz e Miranda, Ivana C. R. Leal, Yraima Cordeiro, Rafael Luque, Rodrigo Octavio M. Alves de Souza
A Comprehensive Study on the Activity and Deactivation of Immobilized Lecitase Ultra in Esterifications of Food Waste Streams to Monoacylglycerols

5. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 77 (2012) 53– 58.

Ivaldo I. Junior, Marcela C. Flores, Felipe K. Sutili, Selma G.F. Leite, Leandro S. de M. e Miranda, Ivana C.R. Leal, Rodrigo O.M.A. de Souza

Fatty acids residue from palm oil refining process as feedstock for lipase catalyzed monoacylglicerol production under batch and continuous flow conditions

6. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 72 (2011) 313– 318.

Ivaldo I. Junior, Felipe K. Sutili, Selma G.F. Leite, Leandro S. de M. Miranda, Ivana C.R. Leal, Rodrigo O.M.A. de Souza

DoE oriented reaction optimization on the lipase-catalyzed monostearin
Synthesis

7. Organic Process Research & Development 16 (2012) 1098–1101.

Ivaldo I. Junior, Marcela C. Flores, Felipe K. Sutili, Selma G. F. Leite, Leandro S. de M. Miranda, Ivana C. R. Leal, and Rodrigo O. M. A. de Souza

Lipase-Catalyzed Monostearin Synthesis under Continuous Flow Conditions

8. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 81 (2012) 7– 11.

Flávia de Abreu Corrêa, Felipe K. Sutili, Leandro S.M. Miranda, Selma G.F. Leite, Rodrigo O.M.A. De Souza, Ivana C.R. Leal

Epoxidation of oleic acid catalyzed by PSCI-Amano lipase optimized by experimental design

9. Ultrasonics Sonochemistry 19 (2012) 232–236.

Karen M. Gonçalves, Felipe K. Sutili, Selma G.F. Leite, Rodrigo O.M.A. de Souza, Ivana Correa Ramos Leal

Palm oil hydrolysis catalyzed by lipases under ultrasound irradiation – The use of experimental design as a tool for variables evaluation

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. SUTILI, F. K. ; RUELA, H. S. ; LEAL, ICR ; SOTER, L. ; LEITE, SELMA ; de SOUZA, R. O. M. A. . Lipase-Catalyzed Monoacylatiion of Fructose under Batch and Continuous

Flow Conditions. In: Biocatalysis in Lipid Modification - Euro Fed Lipid, 2012, Greifswald. Biocatalysis in Lipid Modification, 2012.

2. SUTILI, F. K. ; RUELA, H. S. ; LEAL, ICR ; SOTER, L. ; LEITE, SELMA ; /, R. O. M. A. S. . Lipase-catalyzed synthesis of fructose palmitate. In: 4th International IUPAC Conference on Green Chemistry, 2012, Foz do Iguaçu. 4th International IUPAC Conference on Green Chemistry, 2012.

3. RUELA, H. S. ; Felipe K. Sutili ; LEAL, ICR ; Miranda, L. S. M ; LEITE, SELMA ; de SOUZA, R. O. M. A. . Lipase-catalyzed Synthesis of Glucose and Fructose Esters in Continuous Flow Conditions. In: 10th Euro Fed Lipid Congress, 2012, Cracow - Poland. Fats, Oils and Lipids: from Science and Technology to Health, 2012.

4. SUTILI, F. ; Gonçalves, Karen M. ; de Souza, R. O. M. A. ; Ivana . Hidrólise de óleo de palma catalisada por lipase sob irradiação de ultrassom. In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. Química para um mundo melhor, 2011.

5. RUELA, H. S. ; Felipe K. Sutili ; LEAL, ICR ; SOTER, L. ; Leite G. F. S. ; /, R. O. M. A. S. . Lipase-catalyzed synthesis of glucose esters. In: 4th International IUPAC Conference on Green Chemistry, 2012, Foz do Iguaçu. 4th International IUPAC Conference on Green Chemistry, 2012.

6. Gonçalves, Karen M. ; SUTILI, FELIPE K. ; Itabaiana Junior ; LEAL, ICR ; /, R. O. M. A. S. ; CORDEIRO, Y. Y. . Immobilization of Lecitase Ultra on amberlite under Ultrassound Irradiatioin to the production of monoacylglicerol. In: 4th International IUPAC Conference on Green Chemistryf, 2012, Foz do Iguaçu. 4th International IUPAC Conference on Green Chemistry, 2012.

7. Ivana ; CORREA, F. A. ; SUTILI, FELIPE ; Leite G. F. S. ; SOTER, LEANDRO ; Rodrigo coordenador . Lipase-mediated Epoxidation of Fatty Acids under Continuous Flow Conditions. In: 10th Euro Fed Lipid Congress, 2012. Fats, Oils and Lipids: from Science and Technology to Health.

8. RUELA, H. S. ; SUTILI, FELIPE K. ; LEAL, ICR ; Miranda, L. S. M ; LEITE, SELMA ; Leite, Selma G.F. . Lipase-catalyzed Synthesis of Glucose. Esters in Continuous Flow Conditions. In: Biocatalysis in Lipid Modification - Euro Fed Lipid, 2012, Greifswald. Biocatalysis in Lipid Modification, 2012.

9. Itabaiana Junior ; SUTILI, F. ; Ivana ; Miranda, L. S. M ; LEAL, ICR ; de Souza, R. O. M. A. . Lipase Catalysed Esterification of Solketal with Stearic Acid under Continuous Flow Conditions.. In: Biotransformation in Organic synthesis - BIOTRANS, 2011, Sicilia. Biotransformation in Organic synthesis - BIOTRANS, 2011.

10. Itabaiana Junior ; SUTILI, F. ; Ivana ; Miranda, L. S. M ; LEAL, ICR ; de Souza, R. O. M. A. Batch process for lipase catalyzed monoacylglicycerol synthesis. In: Biotransformation in Organic synthesis - BIOTRANS, 2011, Sicilia. Biotransformation in Organic synthesis - BIOTRANS, 2011.

11. Flores, M. C.; Itabaiana Junior ; SUTILI, F. K. ; LEAL, ICR ; SOTER, L. ; de Souza, Rodrigo O.M.A. . Towards Biocatalytic Reactions Under Continuous Flow Conditions.. In: 14th BMOS - Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2011, Brasília. 14th BMOS - Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2011.

12. Junior, Ivaldo I. ; SUTILI, F. ; Leal, Ivana C.R. ; MIRANDA, L. S. M. E. ; de Souza, R. O. M. A. . Aplicação de Lipases na Síntese da Monoestearina.. In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. Química para um mundo melhor, 2011.

13. Flores, M. C. ; Junior, Ivaldo I. ; SUTILI, F. ; SOTER, L. ; de Souza, R. O. M. A. . Biocatálise em Condção de Fluxo Contínuo: Síntese da Monoestearina. In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. Química para um mundo melhor, 2011.

14. CORREA, F. A. ; SUTILI, F. ; Leite, Selma G.F. ; MIRANDA, L. S. M. E. ; de Souza, Rodrigo O.M.A. ; Leal, Ivana C.R. . Epoxidação do ácido oleico catalisada por lipase PS-CI Amano.. In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.

Química para um mundo melhor, 2011.

15. Flores, M. C.; Itabaiana Junior ; SUTILI, F. K. ; LEAL, ICR ; SOTER, L. ; de Souza, Rodrigo O.M.A. . Towards Biocatalytic Reactions Under Continuous Flow Conditions.. In: 14th BMOS - Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2011, Brasília. 14th BMOS - Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2011.

Apresentação oral de trabalho

1. SUTILI, F. K. ; RUELA, H. S. ; LEAL, ICR ; SOTER, L. ; Leite G. F. S. ; de SOUZA, R. O. M. A. . Lipase-Catalyzed Monoacylatiion of Fructose under Batch and Continuous Flow Conditions. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

2. SUTILI, F. ; Gonçalves, Karen M. ; Leite G. F. S. ; de Souza, Rodrigo O.M.A. ; LEAL, ICR . Hidrólise de óleo de palma catalisada por lipase sob irradiação de ultrassom. 2011. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 85–86 (2013) 37–42

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb

Lipase-catalyzed esterification of steric hindered fructose derivative by continuous flow and batch conditions

Felipe K. Sutili[a,b,1], Halliny S. Ruela[a], Selma G.F. Leite[b,1], Leandro S. de M. Miranda[a], Ivana C.R. Leal[a,c,2], Rodrigo O.M.A. de Souza[a,*]

[a] Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, CEP 22941 909, Rio de Janeiro, Brazil
[b] Escola de Química, Federal University of Rio de Janeiro, CEP22941 909, Rio de Janeiro, Brazil
[c] Faculdade de Farmácia, Federal University of Rio de Janeiro, CEP22941 909, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 May 2012
Received in revised form 31 July 2012
Accepted 8 August 2012
Available online xxx

Keywords:
Sugar esters
Lipase
Continuous flow
Packed bed reactor

ABSTRACT

The lipase catalyzed sugar ester synthesis is an interesting strategy for producing biodegradable, non-ionic surfactants. The main disadvantage of this protocol is the long reaction time required for achieving moderated to good yields. Here, we report the esterification of steric hindered fructose derivative where important variables for batch conditions were identified by the use of a RSM protocol and then translated to the continuous flow regime with high conversions and short residence times.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sugar-based fatty acid esters are non-ionic, biodegradable, odorless, non-irritating, non-toxic surfactants that possess important emulsifying properties. These esters have application in innumerous areas including pharmaceuticals, cosmetics, detergents and food industry [1]. The increasing interest in these molecules is due to the possibility of their synthesis from renewable sources [2]. Among these sugar-based surfactants fructose-derived fatty acids esters possess higher interfacial tension values when compared to other sugar-based surfactants and also antibacterial properties with potential use in food additives [3].

These surfactants are synthesized through esterification reaction and as simple as it may seem, this reaction between fatty acids and carbohydrate represent a challenge. The challenge comes from the almost orthogonal solubility properties of these starting materials, which narrows the window for optimization. Chemical methods for the synthesis of sugar esters require the use of high temperatures in the presence of alkaline catalysts and toxic solvents, resulting in high energy consumption, formation of undesirable by-products and low selectivity. In fact, the chemical synthesis is usually carried out in solvents like pyridine, DMF or in a solventless system [4]. These approaches lead to colored products and in some cases a mixture of mono and diester is produced.

The use of enzymes is an attractive approach since enzymatic catalysis in non-aqueous media allows obtaining pure products due to the enzyme specificity. In addition, the reaction is conducted under mild temperature and pH conditions, which minimize side reactions compared to the chemical processes [3k]. However, the solubility problems still persist leading in many cases to low conversion and long reaction times [5].

An example of attempt to overcome the solubility problem is the use of sugar boronates as starting materials. This approach was successfully used in the acylation of fructose with fatty acids [3j]. However, the synthesis of sugar boronates is trick, since many different boronates are possible as a function of pH, concentration and temperature. Additionally, the hydrolysis is not a straightforward step.

Another approach to enhance solubility is the use of ketal protected sugars. The synthesis of these ketals is very robust and products are stable and soluble in organic solvents. This approach was successfully used in the synthesis of glucose, galactose and xylose esters by several authors [6]. Interestingly, to the best of our knowledge, no example of the use of fructose-derived ketal in the synthesis of fructose fatty esters is reported. This fructose ketal is a ketohexose presented in two piranosidic forms (Fig. 1). The two structures presented in Fig. 1 differ only by the position for esterification which is direct related to the free hydroxyl group.

* Corresponding author. Fax: +55 2125627001.
E-mail address: rodrigosouza@iq.ufrj.br (R.O.M.A. de Souza).
[1] Fax: +55 2125627005.
[2] Fax: +55 2125627807.

1381-1177/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.08.004

464 Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2013, *115*, 464–467

Short Communication

Lipase-catalyzed synthesis of secondary glucose esters under continuous flow conditions

Halliny S. Ruela[1], Felipe K. Sutili[1], Ivana C. R. Leal[2], Nakédia M. F. Carvalho[3], Leandro S. M. Miranda[1] and Rodrigo O. M. A. de Souza[1]

[1] Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
[2] Pharmacy School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
[3] Chemistry Institute, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Chemical methods for the synthesis of sugar esters require the use of high temperatures in the presence of alkaline catalysts resulting in undesirable by-products and low regiosselectivity. Sugar-based fatty acid esters are non-ionic, biodegradable, odorless, non-irritating, non-toxic surfactants widely used pharmaceuticals, cosmetics, detergents, and food industry. Here in we report our results on enzymatic esterification of protected glucose (glucose ketal) with several fatty acids using the immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* under batch and continuous flow conditions, to afford new glucose derivatives with potential surfactant properties. The results presented here shows that high conversions can be obtained in short reaction time.

Practical application: The research of new non-toxic, environmentally friendly and biodegradable surfactants to replace chemicals has increased along with the development of green chemistry. Nonionic biosurfactants, such as sugar fatty acid esters, may be obtained by enzymatic synthesis, a simple manufacturing method for application in several areas, including food, cosmetic, detergent, and pharmaceutical industry. In this work we have described the uncommon esterification of a steric hindered secondary hydroxyl group on glucose ketal leading to new glucose derivatives with potential application as surfactants.

Keywords: Continuous flow / Esterification / Lipase / Packed bed / Surfactants

Received: September 11, 2012 / Revised: November 10, 2012 / Accepted: January 4, 2013

DOI: 10.1002/ejlt.201200321

1 Introduction

Sugar-based fatty acid esters are non-ionic, biodegradable, odorless, non-irritating, non-toxic surfactants that possess important emulsifying properties. These esters have application in innumerous areas including pharmaceuticals, cosmetics, detergents, and food industry, having properties that could be explored, such as emulsion forming and stabilization, antiadhesive and antimicrobial activities [1–4].

Chemical methods for the synthesis of sugar esters require the use of high temperatures in the presence of alkaline catalysts and toxic solvents, resulting in high energy consumption, formation of undesirable by-products and low regiosselectivity. Because of this, not all chemically esters produced are allowed for use in food, cosmetics, and pharmaceutical products [3].

An alternative to the synthesis of sugar esters derivatives is the enzymatic synthesis, which avoids the problems generated in chemical synthesis [1]. Enzymatic synthesis in organic media allows one to obtain higher selectivity and pure products because of enzyme specificity [5–7]. When produced by enzymatic process, more mild conditions are required minimizing side reactions when compared to the chemical process. However, one of the major drawbacks of this process is the low solubility of the starting material leading in some cases to low productivity due to long reaction times [8–16]. An example of attempt to overcome the solubility problem is the use of sugar boronates as starting materials. This approach was successfully used in the acylation of fructose with fatty acids. However, the synthesis of sugar boronates is

Correspondence: Professor Rodrigo O. M. A. de Souza, Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro CEP: 22941-909, Brazil
E-mail: rodrigosouza@iq.ufrj.br
Fax: +55 2125627001

Abbreviations: GluK, 1,2:5,6-bis-*O*-(1-methylethylidene)-α-D-glucofuranose; **TBME**, tert-butylmethylether

© 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Green Chemistry RSC Publishing

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Continuous flow valorization of fatty acid waste using silica-immobilized lipases†

Cite this: Green Chem., 2013, 15, 518

Ivaldo Itabaiana Jr.,[a,b] Felipe K. Sutili,[a,c] Selma G. F. Leite,[c] Karen M. Gonçalves,[a,b] Yraima Cordeiro,[b] Ivana C. R. Leal,[b] Leandro S. M. Miranda,[a] Manuel Ojeda,[d] Rafael Luque[d] and Rodrigo O. M. A. de Souza*[a]

Received 22nd October 2012,
Accepted 26th November 2012

DOI: 10.1039/c2gc36674f

www.rsc.org/greenchem

Silica immobilized lipases have been prepared and utilized in the valorization of fatty acid-derived food waste streams under continuous flow conditions. Findings demonstrate that better conversions could be obtained when compared with commercially available immobilized enzymes.

Downloaded by UNIV FEDERAL DO RIO DE JANEIRO on 28 February 2013
Published on 27 November 2012 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C2GC36674F

1. Introduction

Lipases are triacylglycerol hydrolytic enzymes useful for a wide range of reactions including hydrolysis, esterification and transesterification reactions.[1–4] Upon immobilization, supported enzymes can provide an easily separable and reusable system (together with enhanced product recovery) which is often also more resistant to deactivation as compared to the parent free enzyme.[5–10] Immobilization has several implications in the generation of more stable biocatalysts compatible with continuous processing technologies. Several ways have been reported to immobilize enzymes on a range of supports. These range from the more extended and widely employed physical methods (*e.g.* adsorption, entrapping and/or electrostatic immobilization) to chemical protocols (*e.g.* covalent immobilization). Compared to conventional and more explored methodologies, a recent novel approach based on enzyme encapsulation by using biomimetic silica mineralization (the so-called biosilicification) was proved to offer the possibility to render highly active and stable biocatalysts entrapped within a silica support.[8,11–14] This could be carried out in a one-pot reaction by using a silicic acid precursor (*e.g.* tetramethylorthosilicate – TMOS) and a polycationic catalyst under mild conditions (typically room temperature, close to neutral pH).

Particularly, the activities and (enantio)selectivities of esterases encapsulated in such silica nanoparticles were very recently reported to be significantly influenced by encapsulation in enantioselective esterifications. These relevant findings supported previous theories that suggested complex and unexpected (even unpredictable) structural modifications of enzymes upon physical and/or chemical immobilization on various solid supports.[15,16] In any case, the development of biosilicification methodologies will pave the way for the encapsulation of a wide range of enzymes with varying activities and specificities which can have significant implications in industrial biocatalysis.

Palm oil is generally obtained by a refining process that removes free fatty acids, odoriferous matter, water and impurities from crude palm oil to produce high quality edible oil.[17] The remaining free fatty acids are currently valorized for the manufacture of rubber, candles and soaps but apart from these, such acidic residues generally find no alternative uses different from the aforementioned first generation recycling. These acidic food-derived residues will significantly benefit from the development of innovative and advanced valorization practices to convert them into high added value chemicals.

In the light of the potential of lipases for esterification reactions and the wide availability of these refined palm oil derived acidic residues in Brazil,[18–22] we report herein a simple and efficient biosilicification approach to encapsulate lipases which renders highly active and stable biocatalysts in esterification reactions of the aforementioned fatty acid-derived food waste (FAFW) residues under continuous flow as compared to batch conditions. The surface response methodology (RSM) has been employed as a tool to optimize reaction

[a]Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, CEP22941-909 Rio de Janeiro, Brazil. Fax: +552125627001; E-mail: rodrigosouza@iq.ufrj.br
[b]Faculdade de Farmácia, Federal University of Rio de Janeiro, CEP22941-909 Rio de Janeiro, Brazil. Fax: +552125627807
[c]Escola de Química, Federal University of Rio de Janeiro, CEP22941-909, Rio de Janeiro, Brazil. Fax: +552125627005
[d]Departamento de Quimica Organica, Universidad de Cordoba, Edificio Marie Curie (C-3), Ctra Nnal IV-A, Km 396, E14014 Córdoba, Spain
†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2gc36674f

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

CHEMSUSCHEM
FULL PAPERS

ChemPubSoc Europe

DOI: 10.1002/cssc.201300026

A Comprehensive Study on the Activity and Deactivation of Immobilized Lecitase Ultra in Esterifications of Food Waste Streams to Monoacylglycerols

Karen M. Gonçalves,[a, b] Felipe K. Sutili,[b] Ivaldo I. Júnior,[a, b] Marcella C. Flores,[b] Leandro Soter de Mariz e Miranda,[b] Ivana C. R. Leal,[a] Yraima Cordeiro,[a] Rafael Luque,[c] and Rodrigo Octavio M. Alves de Souza*[b]

Lecitase Ultra was immobilized on Amberlites XAD2 and XAD4, through physical entrapping under conventional stirring or ultrasound irradiation, and characterized by standard techniques. The resulting immobilized biocatalysts were utilized in the valorization of an acidic food-derived residue from a palm oil refining process to produce monoacylglycerols from isopropylidene glycerol under batch and continuous flow conditions. Results indicated that the immobilized biocatalysts could moderately convert the food waste residue (max. conversion 50–60%), exhibiting interesting stability under continuous flow conditions.

Introduction

Lipases are triacylglycerol acyl hydrolases able to catalyze various chemistries, including the hydrolysis of esters, esterification, and transesterification reactions.[1] These α-/β-hydrolases comprise of catalytic Ser-His-Asp (Glu) triad residues covered by an α-helical mobile surface loop,[2] which makes them able to efficiently work at aqueous/nonaqueous interfaces. Due to these interesting properties, lipases find widespread applications in biotechnology and in biomedical sciences.

Lecitase Ultra, which is a new enzyme preparation from the fusion of genes from lipase *Thermomyces lanuginosus* and phospholipase *Fusarium oxysporum*, possesses important phospholipase A1 activity.[3] Phospholipases have been described to undergo interfacial activation, similar to lipases. Due to the nature of Lecitase Ultra, some researchers found that this enzyme displayed both lipase and phospholipase properties on a single active site.[4] It can be hyperactivated by some detergents and is able to recognize different esters.[5]

[a] K. M. Gonçalves, I. I. Júnior, Dr. I. C. R. Leal, Dr. Y. Cordeiro
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária
Rio de Janeiro (Brazil)

[b] K. M. Gonçalves, F. K. Sutili, I. I. Júnior, M. C. Flores,
Dr. L. Soter de Mariz e Miranda, Dr. R. O. M. A. de Souza
Biocatalysis and Organic Synthesis Group
Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia, Cidade Universitária
21945-970 Rio de Janeiro (Brazil)

[c] Dr. R. Luque
Departamento de Química Organica, Universidad de Cordoba
Campus de Rabanales, Ctra Nnal IV-A, Km 396
E14014, Cordoba (Spain)

Supporting Information for this article is available on the WWW under http://dx.doi.org/10.1002/cssc.201300026.

Lecitase Ultra, which is comprised of a single protein with a molecular mass of 35 kDa, was initially developed for degumming processes. However, it has been reported to be highly useful as an enantioselective biocatalyst for fine-chemicals production,[5,6] as well as for the preparation of enantiomerically pure, important, commercial intermediates.[4]

Although lipases and phospholipases currently have multiple industrial applications, they are often easily deactivated; thus they are difficult to reuse and/or be separated from the reaction system upon reaction completion. The most widely extended methodology to improve the operational lifetime, stability, recovery, reuse, and continuous operation of lipases involves the immobilization of the enzymes on solid supports. Adsorption has been extensively utilized as an immobilization technique due to its simplicity and reduced costs. However, interactions on hydrophobic supports have been reported to influence the conformation of the enzyme.[5]

Ultrasound is a commonly employed technology in organic chemistry. Its particular chemical and physical effects have inherent advantages over other technologies that are related to extreme localized conditions generated by the cavitational collapse of sonication.[7] A series of chemical species/effects not easily obtained under conventional conditions can be induced under ultrasound.[7a] Ultrasound irradiation can be applied in biocatalysis to obtain smaller average drop sizes, increasing the interfacial area and dispersion of the enzyme at this interface.[8]

Low-intensity-level ultrasound can favor mass transfer effects in the liquid phase as a consequence of enhanced mobility of the medium. However, this phenomenon also promotes a high local increase in temperatures and pressures that can affect the secondary structure of an enzyme.[9]

WILEY ONLINE LIBRARY © 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 77 (2012) 53–58

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb

Fatty acids residue from palm oil refining process as feedstock for lipase catalyzed monoacylglicerol production under batch and continuous flow conditions

Ivaldo I. Junior[a,b,1], Marcela C. Flores[a,2], Felipe K. Sutili[a,c,3], Selma G.F. Leite[c,4], Leandro S. de M. e Miranda[d], Ivana C.R. Leal[b,5], Rodrigo O.M.A. de Souza[a,*]

[a] Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, CEP 22941-909, Rio de Janeiro, Brazil
[b] Faculdade de Farmácia, Campus Macaé, Federal University of Rio de Janeiro, CEP 22941-909, Rio de Janeiro, Brazil
[c] Escola de Química, Federal University of Rio de Janeiro, CEP 20270021, Rio de Janeiro, Brazil
[d] Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Maracanã, CEP 22941-909, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 September 2011
Received in revised form
17 December 2011
Accepted 6 January 2012
Available online 16 January 2012

Keywords:
Flow chemistry
Lipases
1,2-O-isopropylidene glycerol
Packed bed reactor
Fatty acids
Palm oil

ABSTRACT

Free fatty acids are used in many cases for the production of soaps, candles and assist processing of rubber products, but we believe that new process technology should be developed to produce products with higher added value. Monoacylglycerols (MAGs) are nonionic surfactant, highly hydrophobic and has been used as controlled release systems for drugs. The results presented here for the lipase-catalyzed MAG production show that both batch and continuous flow conditions can lead to the desired product in short reaction time and high yield (70–95%) but the use of packed bed reactors (PBR) shows higher efficiency when compared to batch reactors.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Twelve Principles of Green Chemistry reflect the need for definitive action with regard to the development of processes, whether in universities and industry [1]. In this context, the availability of cheap raw material and renewable energy from nature is the basis for industrial sustainability, as well as a better use of industrial waste. In this sense, strategies to develop clean technologies for chemical processes aim to balance economic and environmental aspects [2].

In recent years, the group of four main countries that grow soybeans comprising Brazil, Argentina, Bolivia and Paraguay recorded 92% increase in production and 66% increase in planted area with soybeans and palm oil, which represents several tons fiber and by-products of the refining procedure.

Palm oil has a wide range of applications, about 80% is used for food applications (cooking oil), while the rest is raw material for a series of non-food applications [3]. Among food uses, olein refined, bleached and deodorized is mainly used in cooking and frying oils, fats and margarines. Many mixtures have been developed to produce solid fats with zero content of trans-fatty acids [4].

The refining process removes free fatty acids, phosphatides, odoriferous matter, water and impurities from the crude palm oil to produce high quality edible oil that meets industry standards. To achieve this chemical or physical objective, refining can be used as shown in Scheme 1 and in both cases free fatty acids are obtained as a byproduct of the refining processes.

Free fatty acids are used in many cases for the production of soaps, candles and assist processing of rubber products, but we believe that new process technology should be developed to produce products with higher added value [5]. Monoacylglycerols (MAGs) are important molecules that find applications in different fields. In food industry are widely used in the preparation of bakers, pastry and margarine [6]. They are also used in pharmaceutical [7] and cosmetic industry as drug carriers and to increase the consistency of creams and lotions [8].

Monoacylglycerols (MAGs) are nonionic surfactant, highly hydrophobic and has been used as controlled release systems for

* Corresponding author. Fax: +55 2125627001.
[1] Fax: +55 2125627001/2125627807.
[2] Fax: +55 2125627001.
[3] Fax: +55 2125627001/2125627005.
[4] Fax: +55 2125627005.
[5] Fax: +55 2125627807.

1381-1177/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.molcatb.2012.01.008

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 72 (2011) 313–318

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb

DoE oriented reaction optimization on the lipase-catalyzed monostearin synthesis

Ivaldo I. Junior[a,b], Felipe K. Sutili[a,c], Selma G.F. Leite[c], Leandro S. de M. Miranda[d], Ivana C.R. Leal[b], Rodrigo O.M.A. de Souza[a,*]

[a] Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, CEP22941-909 Rio de Janeiro, Brazil[1]
[b] Faculdade de Farmácia, Federal University of Rio de Janeiro, Campus Macaé, CEP22941 909 Rio de Janeiro, Brazil[2]
[c] Escola de Química, Federal University of Rio de Janeiro, CEP22941-909 Rio de Janeiro, Brazil[3]
[d] Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Maracanã, CEP20270021 Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 May 2011
Received in revised form 8 July 2011
Accepted 12 July 2011
Available online 21 July 2011

Keywords:
Biocatalysis
Lipases
Monostearin
Design of experiments

ABSTRACT

Recognition that *trans* and saturated fats have negative health effects drive researchers to develop alternative systems that can structure liquid oils into semi-solid plastic pastes for food applications. Monoacylglicerols (MAG) can be used as a promising molecule to achieve this structuring so we have optimized a biocatalytic batch process to the esterification reaction between 1,2-O-isopropylidene glycerol and stearic acid, catalyzed by Lipozyme RM IM, using response surface methodology (RSM) in a laboratory setting with 95% of conversion after 4 h.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A better understanding of the role of dietary lipids in the coronary heart disease (CHD) continues to give us insights into metabolic effects of individual fatty acids and their impact on surrogate markers of risk [1]. The recognition that *trans* and saturated fats have negative health effects drive researchers to develop alternative systems that can structure liquid oils into semi-solid plastic pastes for food applications because the traditional processes for manufacturing spreads, margarines, and shortenings uses hydrogenation and/or saturated fats to achieve the desired structuring [2,3].

In this way, monoacylglicerols (MAG) can be used as a promising molecule to achieve this structuring by utilizing the properties of gel phases (alpha gel and coagel) [4,5]. These MAG are commonly produced based on alkaline-catalyzed chemical glycerolysis of natural oil and fats at high temperatures (220–250 °C) and elevated pressure under nitrogen atmosphere leading to products with low yield, poor quality, dark-colored and burned-tasting characteristics [6,7]. To overcame this issues the use of enzymatic process can lead to an environmentally friendly approach, employing enzyme-catalyzed synthesis of MAG by selective hydrolysis or alcoholysis using 1,3-regiospecific lipases [8–10], esterification of glycerol with fatty acids [11,12], and glycerolysis of fats or oils [13].

In this work we have optimized a biocatalytic batch process to the esterification reaction between solketal and stearic acid using response surface methodology (RSM) in a laboratory setting [14]. The lipase-catalyzed esterification [15] has been investigated as a potential substitute to the traditional chemical glycerolysis, since lipases as biocatalysts demand milder reaction conditions which minimize energy costs, allow a better reaction control and consequently provide higher-quality products [16]. RSM is a statistical tool for developing and optimizing processes with one or more responses influenced by several variables. The RSM advantage is that it allows the user to gather large amounts of information from a small number of experiments. The RSM use also enables to observe the effects of individual variables and their combination of interactions on the response.

2. Experimental

Heptane was purchased from Tedia Co. (R,S)-1,2-isopropylidene glycerol from Sigma–Aldrich as well as all chromatofigureic

* Corresponding author. Fax: +55 2125627001.
E-mail addresses: rodrigosouza@iq.ufrj.br, souzarod21@gmail.com (R.O.M.A. de Souza).
[1] Fax: +55 2125627001.
[2] Fax: +55 2125627807.
[3] Fax: +55 2125627005.

1381-1177/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.molcatb.2011.07.007

Organic Process Research & Development

ARTICLE

pubs.acs.org/OPRD

Lipase-Catalyzed Monostearin Synthesis under Continuous Flow Conditions

Ivaldo I. Junior,[†,‡] Marcela C. Flores,[†] Felipe K. Sutili,[†,§] Selma G. F. Leite,[§] Leandro S. de M. Miranda,[⊥] Ivana C. R. Leal,[‡] and Rodrigo O. M. A. de Souza*[,†]

[†]Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

[‡]Faculdade de Farmácia, Campus Macaé, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

[§]Escola de Química, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

[⊥]Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Maracanã, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT: Biodegradable, biocompatible and nontoxic nonionic surfactants are widely used in food, pharmaceutical and industrial applications being commonly produced based on alkaline-catalyzed chemical glycerolysis of natural oil and fats at high temperatures and elevated pressure under nitrogen atmosphere. In this work we have optimized a biocatalytic continuous flow process with packed bed reactor for the esterification reaction between (*R*,*S*)-1,2-isopropylidene glycerol and stearic acid using response surface methodology (RSM) leading to the desired product in excellent conversion (95%) and short reaction time (40 s of residence time).

1. INTRODUCTION

Partial acylglycerols, mono- and diacylglycerols (MAG and DAG) are well-known biodegradable, biocompatible and non-toxic nonionic surfactants[1,2] widely used in food, pharmaceutical and industrial applications.[3,4] The hydrophobic part consists of fatty acid (i.e., lauric, myristic, palmitic, oleic and stearic acid), whereas the hydrophilic part can be formed by of glycerol or one of its ester derivatives from organic acids such as lactic, citric, acetic or tartaric acid.

They are commonly produced on the basis of a batch alkaline-catalyzed chemical glycerolysis of natural oil and fats at high temperatures (220−250 °C) and elevated pressure under nitrogen atmosphere. Besides the high-energy consumption, high temperatures are the responsible for the low yield (<50%) and poor product quality leading to dark-colored and burned-tasting products formation, which requires extensive and costly purification steps.[5,6] In this way, the use of enzymatic process can overcome these issues and lead to an environmentally friendly approach, employing enzyme-catalyzed synthesis of MAG by selective hydrolysis or alcoholysis using 1,3-regiospecific lipases,[7] esterification of glycerol with fatty acids[8] and glycerolysis of fats or oils.[9]

Among the monoacylglycerols, monostearin stands out due to its wide application usually as additive in candy, ice cream, cake and bread, which has functions of emulsifying, dispersing, anti-froth, bulge, antistarch, improving preservation, protecting freshness and controlling lipid to agglutinate in the food. It is also used in chocolate, candy and ice cream to avoid crystallization and prevent separations between oil and water. It can increase shine and exquisite feeling.[10]

For industrial purposes, the continuous flow system is preferred to batch reactors due to its greater process control, high productivity and improvement of quality/purity and yield.[11,12] Several types of reactor can be used in continuous operation, among these reactors, packed bed reactors (PBR) are the most popular due to high efficiency, low cost and ease of construction, operation and maintenance.[13−15]

In this work we have optimized a biocatalytic continuous flow process with a packed bed reactor for the esterification reaction between (*R*,*S*)-1,2-isopropylidene glycerol[16] and stearic acid using response surface methodology (RSM)[17] in a laboratory setting. To the best of our knowledge this is the first report for this reaction under continuous flow conditions. The lipase-catalyzed esterification has been investigated as a potential substitute to the traditional chemical glycerolysis, since lipases as biocatalysts demand milder reaction conditions which minimize energy costs, allow a better reaction control and consequently provide higher-quality products.[4] RSM is a statistical tool for developing and optimizing processes with one or more responses influenced by several variables. The RSM advantage is that it allows the user to gather large amounts of information from a small number of experiments. Using RSM also enables observation of the effects of individual variables and their combination of interactions on the response.

2. RESULTS AND DISCUSSION

We began our study evaluating the esterification reaction between (R,S)-1,2-isopropylidene glycerol and stearic acid catalyzed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* (RM IM) under continuous-flow conditions. The reaction proceeded at 60 °C and different flow rates (0.2, 0.6, and 1.0 mL/min). To this purpose we have used a 35 mM stock solution containing stearic acid and (*R*,*S*)-1,2-isopropylidene glycerol (equimolar proportion)

Special Issue: Continuous Processing 2012

Received: May 17, 2011
Published: June 20, 2011

ACS Publications © 2011 American Chemical Society

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 81 (2012) 7–11

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb

Epoxidation of oleic acid catalyzed by PSCI-Amano lipase optimized by experimental design

Flávia de Abreu Corrêa[a,b], Felipe K. Sutili[a,b], Leandro S.M. Miranda[a], Selma G.F. Leite[b], Rodrigo O.M.A. De Souza[a], Ivana C.R. Leal[a,c,*]

[a] Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Centro de Tecnologia, Bloco A, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP: 21941-909 Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil
[b] Escola de Química, Laboratório de Microbiologia Industrial, Bloco E, Lab-11, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil
[c] Curso de Farmácia, Campus Macaé, Pólo Universitário, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP: 27930-560 Macaé, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 September 2011
Received in revised form 12 March 2012
Accepted 16 March 2012
Available online 28 March 2012

Keywords:
Central composite design (CCD)
Epoxidation
Lipase
Oleic acid

ABSTRACT

The present work focuses on the oleic acid epoxide production by using PSCI Amano Lipase as biocatalyst in the reaction. An experimental design (central composite design – CCD) adopting surface response was applied to this purpose. Reactions were performed in a shaker equipment and different variables were investigated, such as temperature (25–55 °C), enzyme load (10–20 wt% of oleic acid mass), hydrogen peroxide load (0.1–0.2%) and reaction time. PSCI-Amano enzyme showed its best behavior as biocatalyst after 3 h of reaction at 55 °C, 10% enzyme load, 0.2% hydrogen peroxide and, applying 150 rpm as stirring. On these conditions, the epoxide yield was around 88%.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Oleochemicals are hydrocarbons derived from vegetable oils closely related to petrochemicals and well suited for transformations by the chemical industry [1]. Vegetable oils and fatty acids can be used in cosmetics, lubricants, chemical additives, detergents, pharmaceuticals, polymers, and other products [2].

Vegetable oils and their unsaturated fatty acids can be converted into epoxies which are useful intermediates in organic synthesis by participating in many reactions due to the high oxirane ring reactivity [3]. Among their important applications there is the function as plasticizer for polyvinyl chloride (PVC). Plasticizers increase flexibility, workability or distensibility of plastics, hence rendering them suitable for diverse applications [4]. One of the most important plastics additives currently adopted is the epoxidized soybean oil (ESBO) which has a stable market of approximately 100,000 tons/year [5]. Global demand for plasticizers is projected to grow to 7.6 million tons per year until 2018. The main market is the Asia-Pacific region, with China holding on to its dominating position with 65% share [6].

The most used procedure to produce epoxidized fatty acid esters currently consists of two steps involving alcoholysis of triglycerides/fatty acids using KOH as catalyst followed by epoxidation of peroxyacetic acid esters or peroxyformic (Scheme 1) [7].

The formation of byproducts occurs due to the high medium acidity. In addition, corrosion and production of large amounts of salts when acids are neutralized are one of the problems associated with this type of reaction [4].

Chemo-enzymatic epoxidation reaction often provides a more selective and environment-friendly alternative to the Prilezhaev epoxidation process [8,9]. In the chemo-enzymatic epoxidation reaction, the enzyme normally catalyzes the peracid formation from the corresponding fatty acid and hydrogen peroxide [10]. Then the peracid spontaneously transfers oxygen to the double bond forming the epoxide (Scheme 2) [11].

Lipases or triacylglycerol hydrolases are an important group of biotechnologically relevant enzymes with immense applications in food, dairy, detergent and pharmaceutical industries. Lipases are also defined as glycerol ester hydrolases that catalyze the hydrolysis of triglycerides into free fatty acids and glycerol. They can also catalyze esterification, acidolysis, interesterification, alcoholysis and aminolysis in addition to the hydrolytic activity on triglycerides. Lipases are produced from microbes, specifically bacteria and, they play a vital role in commercial ventures [12,13]. They represent a broadly employed renewable biocatalyst in lipids transformation.Therefore, this work aims at performing the epoxidation of oleic acid using lipase as biocatalyst and the Central composite

* Corresponding author. Present address: Rua Aluisio da Silva Gomes no. 50, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, UFRJ, Pólo Universitário, Granja dos Cavaleiros CEP: 27930-560, Macaé, Brazil. Tel.: +55 21 25627807/22 27962563.
E-mail address: ivanafarma@yahoo.com.br (I.C.R. Leal).

1381-1177/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.molcatb.2012.03.011

Ultrasonics Sonochemistry 19 (2012) 232–236

Contents lists available at ScienceDirect

Ultrasonics Sonochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ultsonch

Palm oil hydrolysis catalyzed by lipases under ultrasound irradiation – The use of experimental design as a tool for variables evaluation

Karen M. Gonçalves [a], Felipe K. Sutili [a,b], Selma G.F. Leite [b], Rodrigo O.M.A. de Souza [a], Ivana Correa Ramos Leal [c,*]

[a] Biocatalysis and Organic Synthesis Group, Centro de Tecnologia, Bloco A, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP: 21941-909 Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil
[b] Escola de Química, Laboratório de Microbiologia Industrial, Bloco E, Lab-11, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brazil
[c] Faculdade de Farmácia, Pólo Universitário, Universidade Federal do Rio de Janeiro/Campus Macaé, CEP: 27930-560 Macaé, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 January 2011
Received in revised form 18 June 2011
Accepted 29 June 2011
Available online 2 July 2011

Keywords:
Central composite rotatable design (CCRD)
Diacylglycerol
Hydrolysis reaction
Lipases
Palm oil
Ultrasound irradiation

ABSTRACT

Diacylglycerol oil has been increasingly recognized by its good nutritional properties and therefore, different technologies have been developed for obtaining it. The present work focuses on the diacylglycerol production by hydrolysis reaction of the palm oil using the PS IM and TL IM commercial lipases as biocatalysts under ultrasound irradiation. An experimental design (central composite rotatable design – CCRD) adopting surface response was applied as a tool to evaluate the optimal reaction conditions beyond a restrict number of experiments. Reactions were performed in an ultrasound equipment and different variables were investigated, such as temperature (30–55 °C), enzyme content (1–2 wt.% of oil mass), mechanical stirring (300–700 rpm) and reaction time. Both, PS IM and TL IM enzymes showed the best results after 1 h and 30 min of reaction under 30 °C and, applying 300 rpm as stirring. On these conditions, the diacylglycerol yield was around 34% and 39%, respectively; considering that 1% PS IM was applied for the first one and, 2% TL IM for the second one. Therefore, it was obtained good yield of a diacylglycerol-rich oil in shorter reaction times under sonication and soft conditions. The mathematic model proposed suggested a satisfactorily representation of the process and good correlation among the experimental results and the theoretical values predicted by the model equation were achieved.
© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Essential fatty acids and fat soluble vitamins are important energy sources [1]. However, diets rich in fats and oils are considered relevant risk factors to obesity and heart diseases [2]. According to the World Health Organization (WHO), at least 2 billion people around the world were obese or overweighed in 2005 and it is estimated that about 3 billion adults will be overweight or obese in 2015.

Since it was considered a global epidemic by the WHO, recommendations and guidelines on the good fats consumption and balance of different fat types have been discussed [2].

Thus, palm oil has been receiving more attention as a result of some studies relating its metabolic rate similar to fat catabolism with unsaturated fatty acid diets [3] that are beneficial to the body with respect to the overall heat production. In addition, palm oil keeps the second position in terms of edible oil in world production [4]. Malaysia is the greatest producer and exporter of palm oil and its derivatives [5] and Brazil is the greatest Latin American producer of palm oil obtained from *Elaeis guineensis*.

Based on the importance of oils and fatty acids in nutrition and medicine, functional foods have been developed more recently, such as the diacylglycerol oil. Diacylglycerols (DAGs) are glycerol esters in which two hydroxyl groups are esterified with fatty acids (FAS). They come in two different isomeric forms: 1,2 (2,3) DAG and 1,3 DAG and occur as a natural component of glycerides in various fats and oils at levels up to 10% (w/w) [2]. Moreover, according to toxicology studies, diacylglycerol oil is safe and has different metabolism from triacylglycerols. Therefore, it has good nutritional properties, promoting suppression of serum levels of postprandial triglycerides which are considered as risks for heart disease, hypertension and glucose intolerance while at high levels [6].

DAGs are commonly used as emulsifiers and stabilizers in foods, cosmetics and pharmaceutical industries. The latest application of DAGs is the marketing as cooking oil with at least 80% of 1,3-DAG [7]. In the United States, the diacylglycerol oil is "generally recognized as safe" (GRAS) as food ingredient (FDA, 2000, 2003) and was approved by the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) as "food for specified health use" (MHLW, 1998) [8]. Commercially, the DG-rich oil is produced by esterification of fatty

* Corresponding author. Present Address: Rua Aloisio da Silva Gomes No. 50, Granja dos Cavaleiros, Pólo Universitário, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)/Campus Macaé, CEP: 27930-560 Macaé, Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: +55 21 25627248; fax: +55 21 25626795.
E-mail address: ivanafarma@yahoo.com.br (I.C.R. Leal).

1350-4177/$ - see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ultsonch.2011.06.017