



UNICAMP

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química**

Departamento de Processos Químicos

Obtenção de Acrilatos de Frutose por Biocatálise

Engenheira Bioquímica

Bianca Máira Teixeira Ayres

Orientadora: Prof^a Dr^a Telma Teixeira Franco

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Paim Valença

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

**Campinas – São Paulo
Fevereiro de 2010**

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

Ay74o	Ayres, Bianca Maíra Teixeira Obtenção de acrilatos de frutose por biocatálise / Bianca Maíra Teixeira Ayres. --Campinas, SP: [s.n.], 2010. Orientadores: Telma Maria Teixeira Franco, Gustavo Paim Valença. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. 1. Ácido acrílico. 2. Lipase. 3. Esteres. 4. Água - Teor de elementos traços. 5. Carboidratos. I. Franco, Telma Maria Teixeira. II. Valença, Gustavo Paim. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.
-------	--

Título em Inglês: Production of acrylates of fructose by biocatalysis

Palavras-chave em Inglês: Acrylic acid, Lipase, Esters, Water - Content of trace elements, Carbohydrates

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

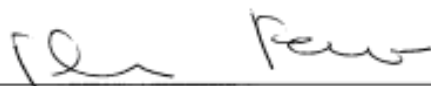
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Maria Isabel Felisberti, Martin George Peter

Data da defesa: 26/02/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Bianca Maíra Teixeira Ayres e aprovada em 26 de fevereiro de 2010 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Telma Teixeira Franco (Orientador)



Profa. Dra. Maria Isabel Felisberti (titular)

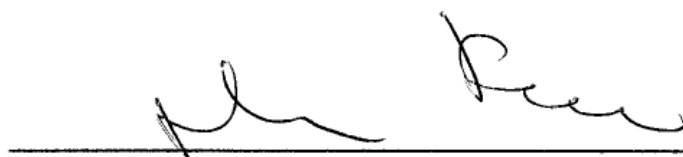


Prof. Dr. Martin Georg Peter (titular)

Juliana de Souza Ferreira (suplente)

Junko Tsukamoto (suplente)

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

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'T' followed by a series of loops and a final flourish, positioned above a horizontal line.

Telma Teixeira Franco (orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha
ilustre avó Ady que me ensinou a
dançar a vida com superação,
alegria e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Telma Franco pelo desígnio do trabalho confiado, assim como todo o apoio e orientação.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Gustavo Paim Valença pela atenção, correções e disponibilidade.

Ao professor Dr. Martin George Peter pelas sugestões analíticas de ressonância magnética nuclear.

A Novozymes® pela disponibilização da lipase imobilizada de *Candida antarctica* utilizada em todo o trabalho.

Aos órgãos de fomento FAPESP e CAPES pela bolsa concedida.

Ao DAAD que me proporcionou o curso de técnicas avançadas de separação em engenharia química em Berlim durante um mês.

Aos meus pais, Luiz e Neiva pelo apoio durante toda a vida que me proporcionou estar neste caminho trabalhando com prazer.

Ao meu namorado Matheus pela paciência, apoio e companhia aos finais de semana de trabalho.

Aos meus irmãos, pela infinita assistência e pelos queridos sobrinhos. A Matilde pela admiração sempre incentivadora.

A minha ilustre e admirável avó Ady, a minha querida avó Ina e toda a família.

Aos meus colegas do laboratório pela graça do dia e do bom convívio. Muitas risadas e gargalhadas com Camilo, Érika, Lívia, Michelle, Vinícius, Talita.

As conversas com Eduardo, Kity, Fernando e Denise sobre os obstáculos do cotidiano laboratório.

As minhas amigas de Casa Branca que mantemos a amizade de infância para descontrair a vida, Bibi, Camila, Giovanna, Paula, Rapha e Vanessa.

A meus amigos e amigas eternos da graduação Charlene, Débora, Fábio, Hélio, Ju, Julio, Marcela e Mari.

EPIÍGRAFE

“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido ficar crianças toda a vida.” (*Albert Einstein*)

“Vai ter uma festa que eu vou dançar até o sapato pedir para parar. Aí eu paro, tiro o sapato e danço o resto da vida.” (*Chacal*)

“Se as coisas são inatingíveis...ora! Não é motivo para não querê-las... que tristes os caminhos, se não fora a presença distante das estrelas!” (*Mário Quintana*)

“Só temos alegrias se as repartirmos: a felicidade nasceu gêmea” (*George Lord Byron*)

RESUMO

O presente trabalho estudou as melhores condições para a produção de monoacrilato de frutose a partir da esterificação de ácido acrílico com D-frutose catalisada pela lipase comercial de *Candida antarctica* (Novozyme 435). O interesse na produção deste éster se dá devido à promissora propriedade absorvente de água do polímero a ser produzido, com diferentes aplicações possíveis.

Esterificações enzimáticas são reações de equilíbrio cujo subproduto é a água. A presença desta tem de ser controlada para possibilitar atividade enzimática e evitar a hidrólise dos ésteres. A adição de peneira molecular 3 Å ao sistema foi investigada para remoção da água produzida e favorecimento do deslocamento do equilíbrio para síntese dos ésteres.

A produção exclusiva de monoéster foi observada quando a razão molar frutose:ácido acrílico de 1:3, 55 °C, agitação de 200 rpm e 20 mg mL⁻¹ de lipase foram empregadas. Quando a razão molar foi aumentada para 1:5 a conversão de frutose aumentou, mas o equilíbrio foi deslocado para a produção de di- e triéster de frutose. A adição de 3 g de peneira molecular em 25 mL de sistema reacional resultou na produção de 49.5 mM de monoacrilato de frutose com 84 % de conversão da frutose inicial e 41 % da conversão de ácido acrílico após 24 h de reação. Devido à inexistência de padrões de acrilatos de frutose no mercado, um método para quantificação destes por fatores de resposta de CLAE foi desenvolvido baseado nos dados cinéticos da reação.

Palavras-chave: esterificação enzimática, ácido acrílico, lipase, ésteres de açúcar, conteúdo de água

ABSTRACT

The optimal conditions for the enzymatic production of fructose acrylates were studied. Fructose to acrylic acid molar ratio, the amount of immobilized lipase *Candida antarctica* and the influence of molecular sieve in the reaction media were studied. The results of these variables in converting sugar were monitored.

Enzymatic esterifications are equilibrium reactions whose subproduct is water. The presence of this must be controlled to allow enzymatic activity of the lipase and to avoid hydrolysis of esters. The addition of molecular sieve 3 Å to the system was investigated to remove of produced water and to shift the equilibrium to the synthesis of ester.

The exclusive production of monoester was observed when the molar ratio of fructose: acrylic acid of 1:3, 55 °C, 200 rpm and 20 mg ml⁻¹ of immobilized lipase was employed. When the molar ratio is increased the conversion of fructose increases, but the equilibrium was shifted to the production of di- and triester. The addition of 3 g of molecular sieve resulted in the production of 49.5 mM of fructose monoacrylates, 84 % conversion of the initial fructose and 41 % conversion of acrylic acid after 24 hours of reaction. Since sugar acrylates are not available, it were obtained the concentrations of esters from the determination of response factors of each ester by HPLC-RI based on linear regression.

Key-words: enzymatic esterification, acrylic acid, lipase, sugar esters and water content

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Reações catalisadas pelas lipases	2
1.2. Frutose.....	4
1.3. Ácido acrílico	5
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo Geral	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. Polímeros biodegradáveis.....	7
3.2. Frutose.....	8
3.3. Ácido Acrílico e acrilatos.....	9
3.4. Esterificações enzimáticas	10
3.5. Razão molar dos substratos.....	13
3.6. Conteúdo de água no sistema	14
3.7. Ésteres de carboidratos.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. MATERIAIS	18
4.2. MÉTODOS.....	18
4.2.1. Solubilização de frutose	18
4.2.2. Esterificação de ácido acrílico com carboidrato	18
4.2.3. Reator tubular de leito empacotado	19
4.2.4. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/ HPLC)	20
4.2.5. Análises do conteúdo de água	21
4.2.6. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. Efeito da concentração de enzima.....	24
5.2. Efeito da razão molar de frutose: ácido acrílico 1:3 e 1:5	25
5.3. Influência da peneira molecular.....	27
5.4. Quantificação de ésteres por CLAE	32

5.5. Reator tubular de leito empacotado	38
5.6. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	40
6. CONCLUSÕES	44
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação geral de esterificação.....	3
Figura 2 - Estrutura da frutose em estruturas Fisher e encontradas em equilíbrio tautomérico	4
Figura 3 - Estrutura química do ácido acrílico	5
Figura 4 - Exemplificação de esterificação do ácido acrílico com o carbono 6 da molécula de frutose.....	11
Figura 5 - Ilustração da esterificação em batelada.....	19
Figura 6 - Ilustração da esterificação em reator tubular de fluxo contínuo	20
Figura 7 – Exemplo de cromatograma com os picos dos compostos presentes na mistura de esterificação da frutose com AA, com exceção do TBA.....	23
Figura 8 - Efeito de diferentes concentrações de Lipasesobre a conversão de frutose por catálise enzimática utilizando razão molar de 1:5 frutose: ácido acrílico em terc-butanol. (◇) 10 mg mL ⁻¹ ; (□) 20 mg mL ⁻¹ ; (▲) 30 mg mL ⁻¹ ; (●) 56 mg mL ⁻¹	25
Figura 9 - Análise da conversão de frutose e ácido acrílico e produção de monoéster com 24 horas de reação, mesma concentração de lipase (20 mg mL ⁻¹) e razões molares frutose: ácido acrílico.....	26
Figura 10 - Conversão da frutose em sistemas contendo 20 mg mL ⁻¹ de lipase, razão molar frutose: ácido acrílico 1:3 durante 8 h de reação na presença e ausência de PM	28
Figura 11 - Produção de ésteres (em percentagem de área) no sistema sob razão molar frutose:ácido acrílico 1:3, concentração de lipase 20 mg mL ⁻¹ e 1g de PM.....	29

Figura 12 - Produção de ésteres (em percentagem de área) no sistema sob razão molar frutose:ácido acrílico 1:3, concentração de lipase 20 mg mL ⁻¹ e 2 g de PM.....	30
Figura 13 - Produção de ésteres (em percentagem de área) no sistema sob razão molar frutose:ácido acrílico 1:3, concentração de lipase 20 mg mL ⁻¹ e 3 g de PM.....	30
Figura 14 - Produção de ésteres (em percentagem de área) no sistema sob razão molar frutose:ácido acrílico 1:3, concentração de lipase 20 mg mL ⁻¹ e 4 g de PM.....	31
Figura 15 - Produção de ésteres (em percentagem de área) no sistema sob razão molar frutose:ácido acrílico 1:3, concentração de lipase 20 mg mL ⁻¹ e 5 g de PM.....	31
Figura 16 – Cromatograma do ensaio com 3 g de PM após 24 horas	36
Figura 17 - Perfil da conversão de frutose em reator tubular contínuo sob taxa de fluxo 0.1 mL min ⁻¹	38
Figura 18 - Perfil do percentual de ésteres produzidos em reator tubular contínuo sob taxa de fluxo 0.1 mL min ⁻¹	40
Figura 19 – ¹ H RMN da solução de frutose 0.1 M em TBA	42
Figura 20 – ¹ H RMN da solução de frutose 0.1 M em TBA com 0.3 M de AA..	42
Figura 21 - ¹ H RMN da solução de 1 h de esterificação.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de solubilidade de frutose em diferentes solventes orgânicos descritos pela literatura	8
Tabela 2 – Condições empregadas para esterificações enzimáticas pela lipase imobilizada de <i>Candida antarctica</i>	24
Tabela 3 - Comparação do número de moles de ésteres calculados pela metodologia de fator de resposta desenvolvida neste trabalho e o número de moles de ésteres calculados por estequiometria do número de moles convertidos de frutose e ácido acrílico	37

NOMENCLATURA

Å	:	angstrom
AA	:	ácido acrílico
a_w	:	atividade de água
CG	:	cromatografia a gás
CLAE	:	Cromatografia líquida de alta performance
d.i.	:	diâmetro interno
HPLC	:	High Performance Liquid Chromatography
PM	:	peneira molecular
PLU	:	unidades de propil laurato
TBA	:	terc-butanol

1. INTRODUÇÃO

Biocatálise pode ser uma alternativa preferível à síntese química em algumas reações específicas quanto a rendimento e especificidade. As temperaturas menores suficientes para ativação dos biocatalisadores (40-70°C) em relação a catálises químicas (140-180 °C) conferem maior segurança ao processo, redução de poluição, redução do consumo de energia e redução de indesejáveis reações laterais entre cadeias. A seletividade proporcionada por reações enzimáticas possibilita a produção de novos compostos.

Uma das áreas exploradas há pouco mais de 20 anos, é a denominada “enzimologia em meio não aquoso” que aumentou a versatilidade da produção de compostos insolúveis ou pouco solúveis, com enzimas ativas sob condições micro aquosas. Sistemas não aquosos investigados em laboratórios acadêmicos ou industriais empregam líquidos iônicos, fluidos supercríticos ou solventes orgânicos. Considerando o elevado custo destes sistemas, o solvente orgânico é o mais utilizado. Biocatalisadores em solventes orgânicos viabilizam catálise de reações pouco viáveis em meio aquoso e apresentam diferente especificidade dependendo do meio em que se encontra.

A obtenção de outros produtos químicos além do etanol a partir de carboidratos, tal como o emprego direto da sacarose, da frutose ou glicose atuando como reagentes (substrato) é bastante atrativa para aplicações industriais e apresenta elevado potencial para indústrias de materiais e produtos químicos (“bulk chemicals” ou química fina). Estima-se que até 50% dos produtos químicos orgânicos possam ser obtidos a partir de recursos renováveis e ou por alguma etapa de biotransformação.

A produção de ésteres de açúcares é um exemplo de biotransformação em meio não aquoso a partir de ácidos carboxílicos de cadeias curtas ou longas com as hidroxilas dos carboidratos empregando lipases ou proteases como catalisadores.

O interesse na produção de ésteres contendo moléculas de açúcar vem crescendo, devido à sua vasta aplicação nas indústrias de alimentos, de fármacos e de detergentes. Poliésteres de derivados de açúcares, álcoois e

ácidos orgânicos naturais estão sendo desenvolvidos pelo setor industrial e acadêmico. Além disso, carboidratos constituem a fonte renovável mais abundante na Terra e, conseqüentemente, uma das mais promissoras substâncias da química sustentável.

Os ésteres de carboidratos e de ácidos graxos podem atuar como blocos construtores (“building blocks”) para síntese de polímeros de parcial biodegradabilidade, com propriedades surfactantes e emulsificantes, ação antimicrobiana, os quais podem ser utilizados como tensoativos e aditivos industriais, dependendo do ácido empregado na esterificação. Diversos estudos descrevem os resultados da formação de ésteres de açúcares com ácidos graxos. O efeito de solventes, hidrofobicidade, teor de água, entre outras variáveis tem sido extensivamente estudada por diversos grupos internacionais, na área de ésteres de carboidratos (JANSSEN *et al.*, 1991; KHALED *et al.*, 1991; PATIL *et al.*, 1991, SCHLOTTERBECK *et al.*, 1993; GBEKELOLUWA *et al.*, 1993; WARD *et al.*, 1997; SOULTANI *et al.*, 2001, POLAT e LINHARDT, 2001, SABEDER *et al.*, 2005; PAULA *et al.*, 2005).

Entretanto, não se encontram informações sobre a obtenção enzimática de acrilatos de frutose disponível no mercado.

1.1. Reações catalisadas pelas lipases

A função biológica das lipases (triglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) é a catálise da hidrólise de ésteres, especialmente os triacilglicerídeos de cadeia longa, para produzir ácidos graxos, di- e mono-acilglicerol, e glicerol. As lipases são também capazes de catalisar a reação reversa, realizando a esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólises, oximólises e tiotransesterificação em solventes orgânicos anidros, sistemas bifásicos e em solução micelar com especificidade quiral (VILLENEUVE *et al.*, 2000). A ação das lipases na interface entre as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas do sistema com as regiões da estrutura enzimática distingue-a das esterases (YAHYA *et al.*, 1998) elevando o potencial

biotecnológico das lipases relacionado com as vantagens por elas apresentadas (TORRES & OTERO, 2001):

- i) alta estabilidade em solventes orgânicos;
- ii) não requerem a presença de co-fatores;
- iii) possuem elevada especificidade pelo substrato e;
- iv) exibem alta enantiosseletividade.

Embora sua função seja a de quebrar as ligações de ésteres de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições micro aquosa, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de alcoóis e ácidos carboxílicos.

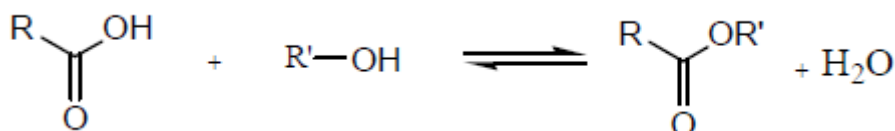


Figura 1 - Reação geral de esterificação

Em esterificações enzimáticas, os fatores que influenciam a produção de ésteres prioritariamente monoacilado são considerados relevantes para posterior processo de purificação que possibilite um sistema rentável e otimizado. A produção de ésteres multiacilados prejudica a propriedade do polímero produzido devido à ausência de linearidade da cadeia. Fatores como concentração de biocatalisador, razão molar dos substratos e quantidade de água disponível para a enzima no sistema deslocam o equilíbrio termodinâmico para favorecer o aumento na produção de ésteres e evitar o alcance do equilíbrio com a hidrólise simultânea dos ésteres formados.

1.2. Frutose

A cadeia de frutose é caracterizada por multifuncionalidade devido a cada carbono estar ligado a um grupo hidroxila. Movimentos moleculares dessas cadeias em solução caracterizam sistemas em equilíbrio tautomérico entre as duas formas piranosídicas (anel de 6 elementos, mais estável) e as duas formas furanosídicas (anel de 5 elementos, menos estável) dependendo do solvente em que se encontram. Em solução aquosa, a temperatura ambiente, aproximadamente 73 % das moléculas se encontra na conformação de β -D-frutopiranosídeos. Reações entre diferentes enantiômeros, conforme disponibilidade no sistema, com outros compostos produzem moléculas que podem ser inéditas. O interesse em investigar as propriedades destes possíveis produtos é crescente.

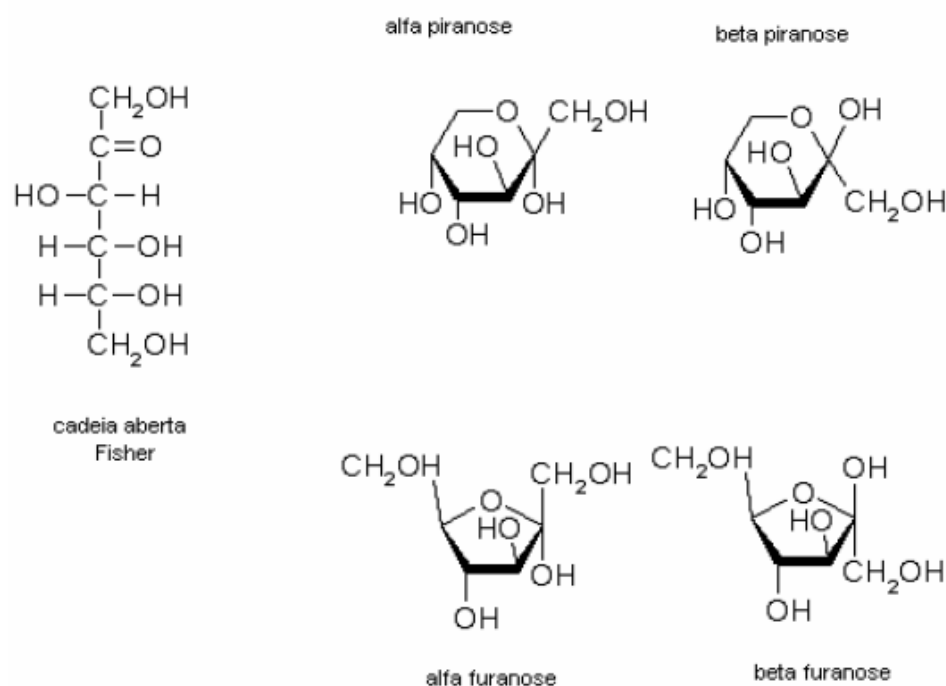


Figura 2 - Estrutura da frutose em estruturas Fisher e encontradas em equilíbrio tautomérico

1.3. Ácido acrílico

O ácido acrílico (CH_2CHCOOH) e seus ésteres são, provavelmente, um dos mais versáteis precursores para diversos polímeros, sendo estes aplicados nos setores de tintas, têxteis, adesivos, papéis e plásticos. Esses compostos podem ser sintetizados tanto por processos químicos como enzimáticos. Devido à alta regioespecificidade das enzimas, a síntese enzimática é caracterizada pela obtenção mais específica de produtos sendo assim uma via potencial para a produção dos mesmos.

O ácido acrílico é hidrofílico e possui um grupamento vinílico que pode ser polimerizado e, conseqüentemente, os ésteres do ácido acrílico são monômeros eficientes para a produção de polímeros de açúcar com alta hidrofiliidade e biocompatibilidade (PARK *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 1995). A incorporação de moléculas de açúcar em polímeros pode aumentar significativamente a aplicação desses compostos nas áreas da síntese orgânica (HODGE, 1988). Os polímeros dos mesmos são altamente valiosos devido à propriedade de absorver elevada quantidade de água em relação ao seu peso, formando hidrogéis. Estes teriam inúmeras aplicações como materiais absorventes, indústria cosmética, médica, cirúrgica (implantes orais e outros) bem como novos produtos poderiam ainda ser desenvolvidos com os mesmos, com a vantagem de possuírem elevada composição de material de origem renovável (patente BASF, STAPLES *et al.*, 2000; PARK e CHANG, 2000).

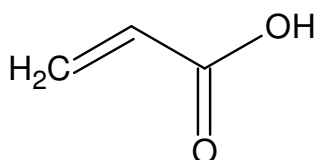


Figura 3 - Estrutura química do ácido acrílico

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar a concentração de lipase comercial, a quantidade de peneira molecular e a razão molar frutose: ácido acrílico para maximização da produção exclusiva de monoacrilato de frutose.

2.2. Objetivos específicos

Determinar a menor concentração de enzima empregada para obter máxima conversão de frutose e produção de maior fração percentual de monoéster;

Estudar a influência da razão molar frutose:ácido acrílico sobre a produção prioritária de monoéster;

Investigar a influência de diferentes quantidades de peneira molecular adicionadas ao sistema em relação a conversão dos substratos e exclusiva produção de monoéster;

Determinar fatores de resposta de cromatografia líquida de alta performance (CLAE) para mono-, di- e triacrilato de frutose, cujos padrões não são disponíveis no mercado;

Avaliar o uso de Ressonância Magnética Nuclear para identificação da hidroxila mais reativa da frutose quando esterificada com ácido acrílico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Polímeros biodegradáveis

A quantidade de materiais poliméricos que é descartada em aterros aguardando o longo tempo de biodegradabilidade é alarmante. Esses materiais são necessários ao dia-a-dia dos diversos setores da economia, então o desvio desse mal causado ao ambiente converge para a necessidade da substituição desses materiais por polímeros parcialmente biodegradáveis com propriedades semelhantes.

Poliacrilatos são exemplos de polímeros utilizados na constituição de fraldas e absorventes, e são consumidos aproximadamente 150 toneladas desse polímero anualmente (MARTIN, 1996). A estimativa de decomposição é de mais de 500 anos. A resistência à degradação por enzimas advém da longa cadeia principal de ligação carbono-carbono, ausente de grupos polares (COLE, 1990). A inserção de grupos polares neste polímero é uma forma de modificação destes polímeros para facilitar a biodegradação. Há certa ênfase em dois tipos de modificações aos polímeros para torná-los biodegradáveis e úteis: inserir grupos funcionais polares em sua cadeia principal, especialmente grupos ésteres, os quais podem ser clivados por hidrólise química, ou inserir grupos funcionais associados a cadeia principal que possam sofrer reações fotoquímicas que clivem a cadeia, tipicamente grupos carbonilas (CHANDRA e RUSTGI, 1998).

Aplicações de ésteres de açúcares estão se ampliando com estudos de diferentes grupos doadores de acil. A formação destes monômeros (ou blocos construtores) pode ser obtida por esterificação de ácidos carboxílicos de cadeia curta, devido à sua baixa hidrofobicidade visando aplicações biomédicas e hidrogéis. Devido à toxicidade e acidez causada por ácidos ao sistema, alguns casos utilizam ésteres derivados.

Ésteres de ácidos graxos são caracterizados pela propriedade de balanço hidrofílico-lipofílico, dependente do tamanho da cadeia do ácido empregado. Enquanto ácidos de cadeia curta são polares caracterizando a constituição de polímeros com propriedades absorventes.

3.2. Frutose

A frutose é um monossacarídeo com o carbono assimétrico na posição 5 o qual caracteriza a região denominada centro quiral e fornece isômero óptico, assim como outros monossacarídeos. No estado cristalino, a frutose encontra-se na forma β -D-frutopiranosose. Quando dissolvida em água a frutose resulta em uma mistura complexa de isômeros em equilíbrio, como α -D-frutopiranosose, β -D-frutopiranosose, α -D-frutofuranose e β -D-frutofuranose. A relação percentual destes isômeros da frutose em solução depende de fatores como temperatura, pH, solvente e relação proporcional volumétrica de solventes constituintes do sistema.

Tabela 1 - Solubilidade de frutose em diferentes solventes orgânicos de acordo com a literatura

Solvente	Temperatura (°C)	Concentração (g L ⁻¹)	Referência Bibliográfica
2-metil 2-butanol	60	13.5	Engasser <i>et al.</i> (2008)
	60	11	Chamouleau <i>et al.</i> (2001)
	55	10	Scheckermann <i>et al.</i> (1995)
Acetona	40	0.82	Arcos <i>et al.</i> (1998)
Terc-butanol	60	11	Zhang e Hayes (1999)
	55	18	Tsukamoto (2006)

Para que ocorram altas taxas de conversões reacionais, é necessário que a frutose esteja dissolvida em máxima concentração possível no TBA. Engasser *et al.* (2008) estudaram a cinética de dissolução de D-glicose e D-frutose em 2-metil 2-butanol entre 20 °C e 80 °C e observaram alta taxa inicial, porém o período de dissolução se estende até 24 horas semelhante ao perfil observado por Tsukamoto. A cinética de tautomerização da frutose em diferentes solventes pode ser a causa desse longo período de dissolução, já que as formas tautoméricas prevaescentes dependem do solvente orgânico que compõe o sistema.

Zhang e Hayes (1999) estudaram a esterificação de ácido oleico com frutose. A solubilidade de frutose em ácido oleico puro é extremamente baixa por isso investigaram a cosolubilização desses reagentes em terc-butanol. Foi observado aumento de 10 vezes na solubilidade de frutose em TBA com relação ao ácido oleico a 60 °C. Porém, a inserção de até 30 % m/m de ácido oleico em TBA não reduziu significativamente a solubilidade da frutose. Uma mistura com 40 % de ésteres oleato de frutose (mono e diéster) e 60 % de ácido oleico solubilizou 66.8 g/L de frutose a 60°C. A solubilidade de frutose aumentou linearmente com o acréscimo de conteúdo de ésteres. Dessa forma, eles incrementavam frutose ao sistema a cada 2 horas. Não foi investigada essa influência na solubilidade da frutose nesta dissertação de mestrado, pois não há acrilatos de frutose disponíveis no mercado.

A modificação de açúcares com acetona, formando acetais de açúcar, eleva a miscibilidade dos reagentes, porém adiciona uma etapa na esterificação, tornando-a indireta e muitas vezes elevando o custo do processo. (FREGAPANE *et al*, 1991; SARNEY *et al.*, 1994)

3.3. Ácido Acrílico e acrilatos

O ácido acrílico é o menor ácido carboxílico vinílico existente e altamente tóxico devido a sua facilidade em formar radicais livres. Encontra-se comercializado com 99 % de pureza na presença de 200 ppm de monometiléter hidroquinona (MEHQ) como inibidor da polimerização. Ao esterificar a carboxila do ácido acrílico com uma hidroxila da frutose, a ligação dupla entre carbonos do ácido permanece no monômero formado favorecendo posterior polimerização dos acrilatos de frutose.

Os ácidos acético, propiônico e butílico foram estudados para esterificações com esta enzima, no entanto muito frequentemente a inibição da atividade enzimática tem sido descrita. O efeito do ácido acrílico para a atividade enzimática desta foi descrito pela literatura em relação ao solvente utilizado e ao efeito para taxas de conversão.

Nordblad e Adlercreutz (2008a) observaram redução catalítica da atividade enzimática da lipase por ácido acrílico, entretanto este efeito pôde ser atenuado pela adição de bases organo-solúveis. A principal razão da redução

da atividade catalítica foi atribuída à protonação da enzima, mas com inibição em menor extensão da mesma pelo ácido. Assim, visando aumentar a taxa da acrilção, as condições foram cuidadosamente escolhidas, tendo sido observado que para baixas concentrações de ácido acrílico, era necessário que o meio reacional fosse constituído por solventes hidrofóbicos, mas para reações com elevadas concentrações deste ácido era necessário meio com solventes hidrofílicos.

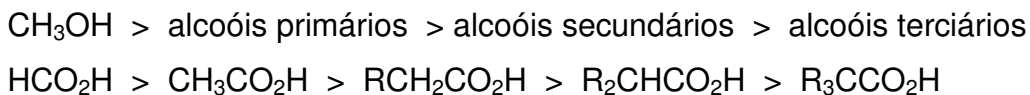
Nordblad e Adlercreutz (2008b) em outro trabalho evidenciaram que a esterificação direta do ácido acrílico é bastante lenta e inibida pelo substrato ácido. Foi observado que a reação enzimática catalisada pela enzima Novozyme 435 entre o álcool 1-octanol era uma ordem de magnitude mais rápida quando o doador ácido era substituído pelo acrilato de etila. Assim, eles encontraram que a atividade de água (a_w) ideal para esta reação era 0.75, mas para esterificação de ácido propiônico e 1-octanol o valor ideal de a_w encontrado foi 0.45 e para a transesterificação envolvendo acrilato de etila foi mais rápida com $a_w = 0.3$.

Hollmann *et al.* (2009) estudaram a influência da força de ácidos fortes na atividade desta lipase para esterificar, em razão equimolar, 1-octanol com ácido tartárico (pKa 3.03), ácido 2-bromo-propionico (pKa 3.86), ácido láctico (pKa 3.86), ácido acrílico (pKa 4.26), ácido 2-metil-propiônico (pKa 4.84) e ácido propiônico (pKa 4.87). Nenhum ácido com pKa inferior a 4.8 apresentou taxas significantes de esterificação, enquanto que com ácido tartárico a inativação enzimática foi observada. A recuperação de 85 % da atividade original da lipase foi contornada com adição de dois equivalentes de trietilamina para neutralizar o ácido.

3.4. Esterificações enzimáticas

Esterificações e transesterificações são reações de equilíbrio que produzem água e éster. Para deslocar o equilíbrio para a síntese de ésteres, é comum utilizar excesso de um dos reagentes ou remover continuamente a água produzida por meio de adsorção, por agentes secantes, por destilação ou por membranas seletivas à água. A reatividade dos álcoois e ácidos

carboxílicos na esterificação depende do impedimento estérico de ambos (Popescu *et al.*, 2010). Desta forma, as esterificações com ácidos ou alcoóis terciários são lentas e a taxa diminui na seguinte ordem:



A relação entre as taxas da reação direta (esterificação) e da reação inversa (hidrólise) é usualmente controlada pela quantidade de água do meio reacional (MORRISON e BOYD, 1981).

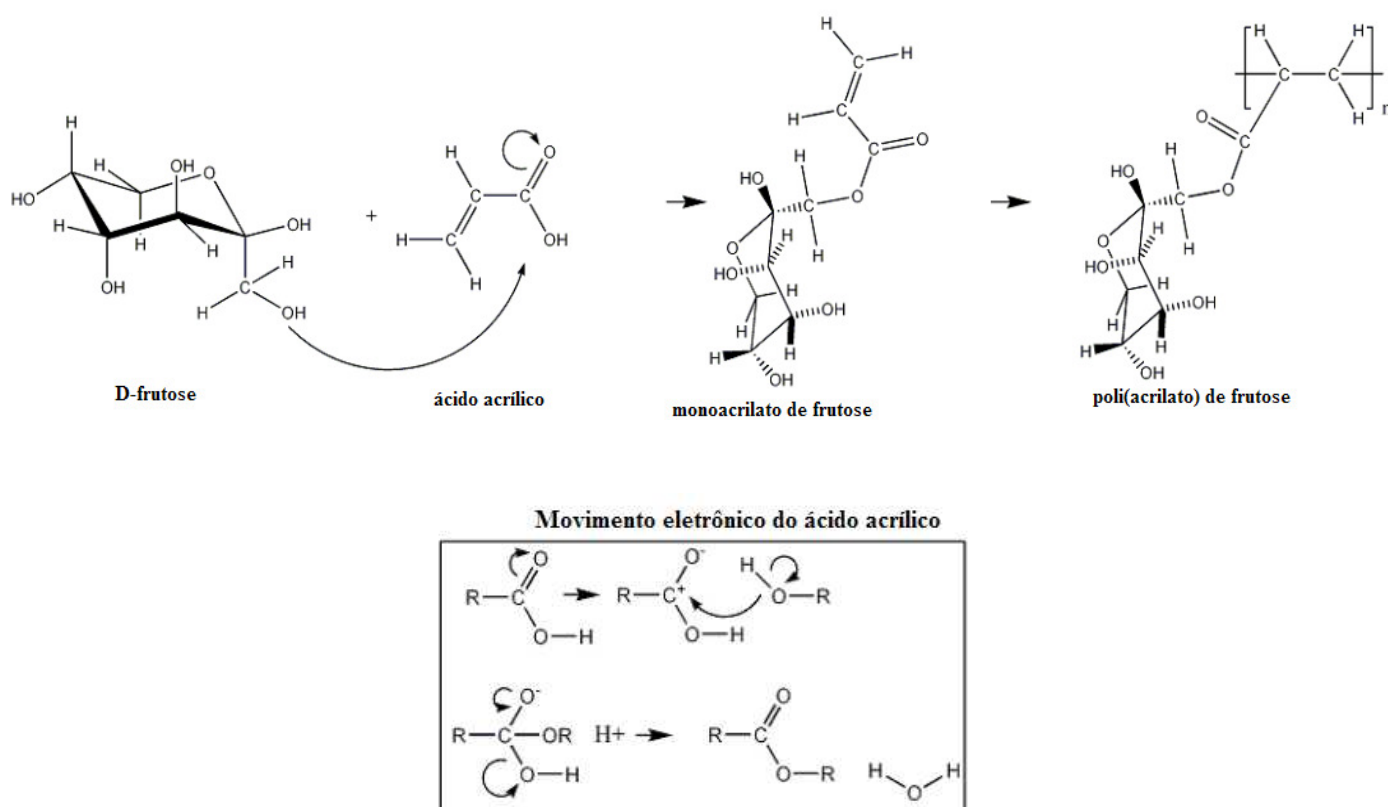


Figura 4 - Exemplificação de esterificação do ácido acrílico com o carbono 1 da molécula de frutose

Esterificações podem ser catalisadas quimicamente (catálise básica ou ácida) ou enzimaticamente. Processos químicos requerem, em geral, altas temperaturas e provocam formação indesejável de cor no produto final. O uso de enzimas oferece vantagens de requerer condições reacionais mais brandas, redução do número de reações paralelas e maior especificidade (LORTIE,

1997), elevando o rendimento das reações e a eficiência. A lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* é a lipase mais descrita pela literatura para diversas esterificações em sistemas reacionais na presença ou ausência de solventes orgânicos. Em nosso laboratório, a mestre Érica Vagetti estudou três lipases e duas proteases para esterificação do ácido acrílico com frutose sob mesmas condições, porém apenas a lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* converteu 52% da concentração inicial de frutose, enquanto as outras enzimas testadas não ultrapassaram 1% de conversão de frutose.

Esta lipase é imobilizada em suporte matricial apresentando vantagens em relação a enzimas solúveis: sua separação de outros compostos em uma mistura reacional é mais simples e a concentração de catalisador imobilizado é alta correspondendo a grandes produtividades volumétricas (BLANCH e CLARK, 1997).

Em nosso laboratório, três diferentes trabalhos foram concluídos sobre o tema esterificação de açúcares: Junko Tsukamoto confirmou a atividade da lipase em acilação de butila, em 2006 e a capacidade de esterificar dois dissacarídeos (sacarose e maltose) e três monossacarídeos (xilose, glicose e frutose) e Érica Vagetti apresentou sua dissertação de mestrado em 2008 sobre a influência da umidade inicial (68.9 mmol L^{-1} e $172.2 \text{ mmol L}^{-1}$) do sistema de obtenção de acrilatos de frutose associado a razão molar dos substratos (1:5 e 1:20), com excesso do ácido acrílico. As conversões de frutose e ácido acrílico variaram entre 40 a 80 % e 4 a 12%, respectivamente, enquanto as percentagens máximas de ésteres produzidos foram de 83 % de monoéster, 13 % de diéster e 26 % para triéster. Com maior razão molar menor a fração percentual de monoéster produzida, e sob maior umidade inicial a conversão de frutose foi prejudicada.

Em 2009, Hagström *et al.* observaram que esta lipase poderia agir ainda mais eficientemente na reação de transacilação de um poliéster com grupo funcional OH quando imobilizada em um suporte diferente daquele empregado pelo produtor Novozymes. Assim, a mesma enzima comercial na forma livre foi obtida da empresa Novozymes e imobilizada no material denominado Accurel MP1000. Foi observada maior taxa de reação quando todo o sistema foi pressurizado a 15 kPa e submetido a fluxo constante de acrilato de etila e destilação contínua para evaporação do etanol (produto da reação). Esta

enzima imobilizada em Accurel revelou ser muito estável, indicando que o rendimento do produto obtido acrilato de poliéster mássico variou entre 3600 a 6200 vezes a massa da enzima necessária evidenciando o potencial da enzima e o impacto marginal do custo da mesma no processo.

Em 2003 a empresa alemã BASF depositou uma patente para obtenção de ésteres metacrílicos de polióis de carboidratos por catálise enzimática utilizando o ácido metacrílico ou ésteres vinílicos como doador do grupo ácido. Diferentes solventes, meios reacionais e tipos de polióis foram descritos e exemplificados.

3.5. Razão molar dos substratos

Devido à toxicidade do ácido acrílico é importante determinar a influência da razão molar de frutose com ácido acrílico na atividade da lipase. O efeito buscado é maximizar a produção de monoéster, minimizar a concentração remanescente de ácido após a esterificação e facilitar etapas de purificação.

Soultani *et al.* (2001) observaram a alteração da atividade catalítica da lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* em 2-metil-2-butanol conforme a hidrofobicidade do meio, já que o estudo investigou o efeito do comprimento da cadeia carbônica de alguns ácidos graxos na esterificação da frutose. Assim como, foi investigado o efeito das razões molares de 1:1 até 1:5. Baixas razões molares apresentaram maior conversão de frutose e concentração dos ésteres, porém reduziu a conversão do ácido. Esta inibição da lipase foi associada à limitação de concentração de frutose no sistema ou a concentração dos doadores de acila.

Kim *et al.* (2004) determinaram a razão molar ótima de 1:3 para a lipase esterificar β -metilglicosídeo com acrilato de vinila e metacrilato de vinila em excesso a 50 °C. O solvente selecionado considerando a maior taxa de reação foi o terc-butanol.

A esterificação de ácido palmítico com frutose utilizando lipase comercial imobilizada *Candida antarctica* foi investigada por Sakaki *et al.* (2006) quanto a influência da razão molar dos substratos e da acoplagem de um sistema de pervaporação na conversão do carboidrato. Após 56 horas de reação a 40 °C, a conversão de frutose alcançou 66% utilizando ácido graxo em excesso, na

razão de 1:2. Foi observada redução da razão de diéster para monoéster produzidos com o decréscimo da razão molar dos substratos.

3.6. Conteúdo de água no sistema

Esterificações enzimáticas são reações de equilíbrio cujo subproduto é a água, portanto a quantidade de água no meio é muito importante, pois pode deslocar o equilíbrio de síntese para hidrólise do éster, bem como alterar a distribuição dos produtos no meio. Entretanto, enzimas precisam de pequena quantidade de água para manter sua conformação tridimensional ativa mesmo quando a enzima está covalentemente ligada a um suporte. A quantidade necessária depende significativamente da origem da enzima. Alguns pesquisadores sugerem uma monocamada de água ao redor das moléculas de enzima, outros sugerem montantes incorporados a molécula de enzima (ZAKS e KLIBANOV, 1988; WINKLER e GUBERNATOR, 1994)

Em geral, dependendo do solvente empregado na reação enzimática, diferentes técnicas de remoção da água produzida podem ser empregadas, como pervaporação, misturas azeotrópicas, sílica gel, peneiras moleculares (PM) ou soluções saturadas de sais. A água age como lubrificante para facilitar o desdobramento e redobramento da enzima, o que muitas vezes conduz a sua desnaturação (TRIANTAFYLLOU *et al.*, 1995), assim, a quantidade de água conveniente no solvente é crítica para garantir alta atividade catalítica. Alterando o solvente afetaria a relação entre atividade de água (a_w) e o conteúdo de água no sistema, mas tem pouco efeito sobre a relação entre a_w e a quantidade de água nas partículas de enzima. A baixa a_w , a quantidade de água ligada a enzima é independente do tipo de solvente, portanto a_w é raramente utilizada em experimentos devido a dificuldade de sua determinação (YAHYA *et al.*, 1998)

A atividade de água em soluções de frutose é menor que a atividade de água em soluções de açúcares de massas molares maiores na mesma concentração (HANOVER e WHITE, 1993).

Degn *et al.* (2001) estudaram o aumento da atividade enzimática para esterificação de glicose com ácido mirístico pela lipase (10 mg mL^{-1}) a 45°C sem adição de (PM) no sistema. Foi constatado um aumento entre 6 e 7 vezes em relação ao estudo de Ljunger *et al.* (1994) e de Degn *et al.* (1999) previamente relatados, com conteúdo de água entre 0.85 % e 2.17% m/m. Decréscimo de atividade da lipase foi observado com conteúdo de água mais baixos. A concentração máxima do éster após 24 h foi 34 mg mL^{-1} . Análises por cromatografia gasosa identificaram 5 % de diésteres.

Charmouveau *et al.* (2001) concluíram que a atividade inicial de água afetou muito a esterificação da mistura equimolar de frutose com ácido palmítico (0.139 M), catalisado por 5 g L^{-1} de lipase em meio de 2-metil-2-butanol (200 mL). Eles observaram que a baixa atividade de água (0.07) promoveu altas taxas de conversão (28.5%) e elevada taxa inicial ($4.9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). O uso de peneira molecular (100 g L^{-1} , 4 Å) aumentou a eficiência da reação, no entanto, a seletividade da enzima foi prejudicada.

Flores *et al.* (2002) utilizaram PM (4 Å) para esterificar α e β -glicose com ácido dodecanóico em 2-metil-2-butanol. Apenas monoéster foi formado, com 70 % de conversão da glicose.

Entretanto, trabalhos específicos sobre ésteres de ácido acrílico e ou vinil acrílico de autoria de Park e colaboradores (2004) sobre esterificação utilizando acrilato de vinila ou acrilato de etila investigaram o efeito da adição de peneira molecular de 0 a 150 mg na reação de esterificação de β -glicosídeo com o ácido acrílico (1:15) à temperatura de 50°C , quando observaram a redução de produto formado por esta adição.

Haar *et al.* (2010) estudaram o efeito da adição de PM na esterificação de laurato de vinila com oligossacarídeos de frutose catalisada pela lipase imobilizada de *Candida antarctica*. Eles observaram que quando a substituição múltipla do carboidrato é desejada, PM podem ser empregadas. Enquanto a

enzima foi utilizada na ausência de PM, oligômeros monosubstituídos foram formados.

Tsukamoto *et al.* (2008) observaram a acrilção enzimática de mono e dissacarídeos com ácido acrílico na presença e na ausência de peneiras moleculares tanto pela metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência bem como por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. Foram detectados desde monoéster até pentaéster.

O avanço para a acrilção enzimática de frutose resultante dessa dissertação foi determinar a influência de diferentes quantidades de peneira molecular adicionadas ao sistema para síntese de maior concentração de monoacrilato de frutose. Foi observada que a conversão da frutose e do ácido acrílico triplicou, e com elevadas quantidades de PM (4 g ou 5 g) o equilíbrio foi deslocado para síntese de di- e triéster. Porém com menores quantidades, a produção foi exclusiva de monoéster.

3.7. Ésteres de carboidratos e métodos analíticos

A indisponibilidade comercial dos acrilatos de frutose conduziu ao desenvolvimento de análise percentual das áreas obtidas pelo método analítico cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), já que a identificação dos compostos por espectrometria de massa foi investigada por Tsukamoto *et al.* (2008).

Popescu *et al.* (2010) apresentaram seus resultados de produção de mono e diéster da mesma forma, porém com cromatografia a gás (CG), ao transesterificar acrilato de metila e metacrilato de metila com diois e triois sob razão molar 2:1. A copolimerização dos monômeros foi investigada sem qualquer etapa de purificação. A fração de monoéster observada entre os produtos estava entre 70 e 80 %.

A análise de carboidratos por CG é possível após derivatização da molécula, pois a molécula de açúcar é caramelizada à altas temperaturas. A temperatura de fusão da frutose é 103 °C.

A frutose apresenta 5 hidroxilas esterificáveis, assim é necessária a caracterização da estrutura molecular dos ésteres formados.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é hoje uma das ferramentas analíticas, não destrutivas, mais poderosas e versáteis para o estudo estrutural de moléculas e imagens. Esta técnica surgiu em 1945 e, desde então, sofreu inúmeros aperfeiçoamentos com a disponibilização de campos magnéticos cada vez mais altos, transformada de Fourier, técnicas para a obtenção de imagens, o estabelecimento de métodos multinucleares e multidimensionais e o surgimento de uma variedade de técnicas espectrais de alta resolução, juntamente com a incorporação de pulsos de gradiente de campo, tudo isso combinado com sofisticado crescimento da instrumentação e dos softwares (GRANT *et al.*, 1996). Além disso, a associação da RMN às técnicas de separação, como CLAE e eletroforese capilar, amplia a aplicação da RMN para as análises de misturas complexas (fluídos biológicos, química combinatorial, etc), com ou sem a necessidade de separação química (PARELLA, 1998).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

A enzima Novozyme 435 (lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina macroporosa de ácido acrílico comercial com atividade específica 10.000 unidades de propil laurato (PLU) g⁻¹) foi gentilmente cedida pela Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca). Os reagentes D-frutose, ácido acrílico 99 % (AA, densidade 1.051mg mL⁻¹) estabilizado com 200 ppm de hidroquinona éter monometílico e a peneira molecular (PM) 3 Å (formato de pérolas com diâmetro 2mm) foram obtidos da Sigma (St.Louis, MO, USA) e o TBA foi adquirido da Tedia (Fairfield, USA).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Solubilização de frutose

Terc-butanol (TBA) foi previamente desidratado com peneira molecular 3Å (PM) durante dois dias. A solução de frutose 0.1 M foi preparada pela adição de 0.4504 g de frutose em 25 mL de TBA em Erlenmeyers com tampa de vidro esmerilhada sob agitação orbital a 200 rpm, 55 °C por 24 h (Tsukamoto, 2006). A umidade deste sistema era 30.1 mmol L⁻¹.

4.2.2. Esterificação de ácido acrílico com carboidrato

Após a solubilização da frutose, lipase foi adicionada (10 mg mL⁻¹, 20 mg mL⁻¹, 30 mg mL⁻¹ e 56 mg mL⁻¹). As reações foram iniciadas com adição de ácido acrílico. Oitocentos e sessenta e seis µL de ácido acrílico foram adicionados a 25 mL da solução de frutose utilizando um Erlenmeyer de 50 mL para se obter uma mistura com razão molar inicial de frutose: ácido acrílico 1:5. Para razão molar de 1:3 foram utilizados 519 µL de ácido acrílico. Os Erlenmeyers foram fechados com tampa de vidro esmerilhada e a seguir colocados sob agitador orbital mantido a 55 °C e agitação de 200 rpm durante

24 h. Alíquotas de 600 µl foram coletadas periodicamente. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Também foram realizados experimentos com diferentes massas de PM adicionadas (1 g, 2 g, 3 g, 4 g ou 5 g). A PM foi previamente aquecida em mufla (Quimis, Brasil) a 500 °C por 5 h.

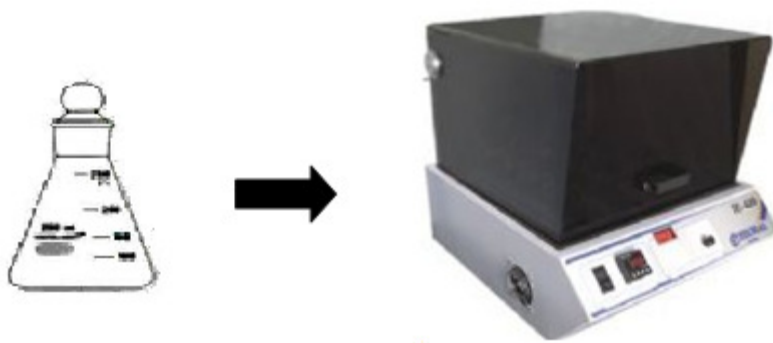


Figura 5 - Ilustração da esterificação em batelada

4.2.3. Reator tubular de leito empacotado

Um reator tubular encamisado (0.6 cm de diâmetro interno; 7.0 cm de comprimento) foi empacotado alternadamente com PM e lipase imobilizada. O sistema foi alimentado com solução de frutose e ácido acrílico (razão molar 1:3) em TBA e PM em concentração 80 mg mL⁻¹ mantida a 55 °C em banho termostaticado. As taxas de fluxo de alimentação foram 0.1 mL min⁻¹, 0.25 mL min⁻¹ e 0.5 mL min⁻¹ com auxílio de bomba Gilson (modelo Minipuls 3). Foram coletadas frações de 1mL.

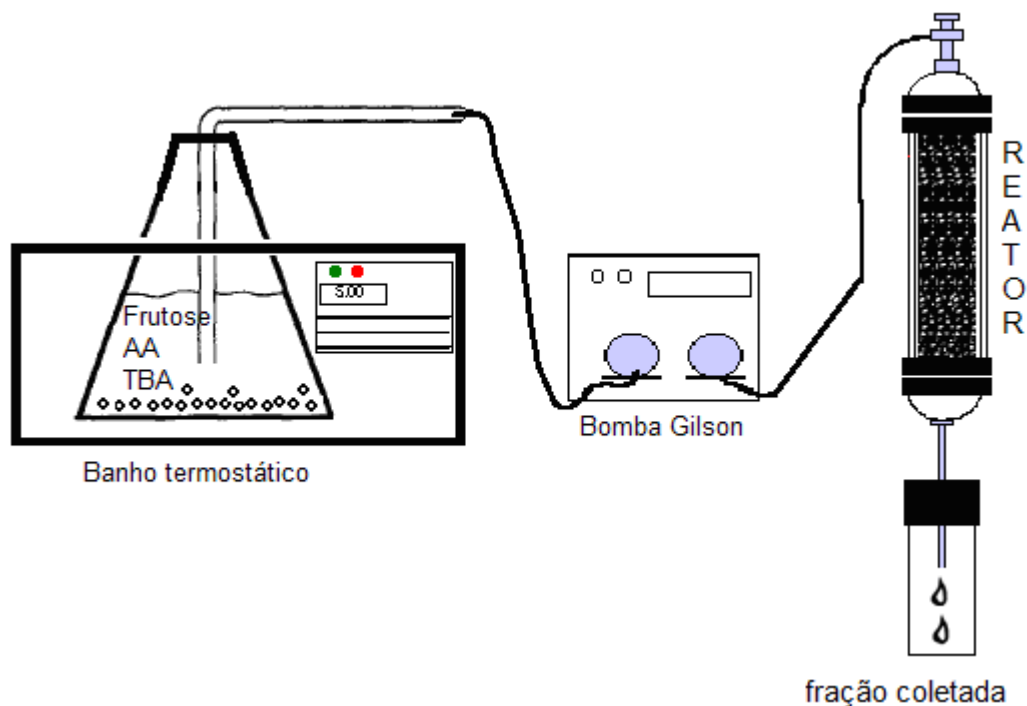


Figura 6 - Ilustração da esterificação em reator tubular de fluxo contínuo

4.2.4. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/ HPLC)

Para a quantificação dos acrilatos de frutose, da frutose e do ácido acrílico, utilizou-se um sistema de cromatografia líquida consistindo de bomba WATERS 515, injetor automático WATERS 717 e um detector índice de refração WATERS 410. A coluna utilizada no sistema foi de troca iônica, denominada SHODEX SH 1011 (8 mm d.i. × 300 mm, tamanho de partícula 6 µm) conectada a uma pré-coluna SHODEX SH-G (6 x 50 mm, tamanho da partícula: 10 µm) (Tóquio, Japão). As condições de análise foram as seguintes:

- Temperatura de 50 °C;
- Fase móvel isocrática de H₂SO₄ aquoso 5 mM;
- Fluxo laminar de 0.6 mL/min.

O volume injetado de cada amostra analisada foi 2 µL. Os dados foram processados pelo software Empower versão 2.0. As conversões dos substratos

foram calculadas a partir da redução das concentrações iniciais e foram expressas em termos de porcentagem de acordo com a Equação 1:

$$X = \frac{A_{s0} - A_{st}}{A_{s0}} \quad (1)$$

Onde: X = conversão; A_{s0} = área do pico do substrato; A_{st} = área do pico do substrato após t horas de reação. Curvas de calibração dos substratos foram construídas e utilizadas para calcular as concentrações nas amostras.

4.2.5. Análise do conteúdo de água

Os teores de água do sistema reacional foram determinados pelo método de Karl Fischer utilizando um titulador coulométrico (Metrohm 831) imediatamente após a coleta da amostra. O volume de injeção foi aproximadamente 100 μL e as medições foram realizadas em duplicata .

4.2.6. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Um espectro de RMN ^1H da solução 0.1 M de frutose solubilizada em TBA foi registrado. Após adição de 0.3 M de ácido acrílico a esta solução e agitação, foi registrado outro espectro para investigação da influência do ácido acrílico no deslocamento químico dos hidrogênios da frutose em TBA.

A partir desta solução, adicionou-se 20 mg mL^{-1} de lipase para início da esterificação a 55 $^{\circ}\text{C}$ e agitação constante durante 3 h. Foi coletada alíquota de 1 mL da esterificação após 1 h. As amostras foram transferidas para tubos de análise do equipamento Bruker 250 MHz com inserção de capilar preenchido com água deuterada. Dessa forma, a hidrólise do éster foi evitada. Os espectros foram obtidos a 55 $^{\circ}\text{C}$ em equipamento pertencente ao Instituto de Química da UNICAMP.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Introdução

As condições para esterificação de açúcares com lipase foram estudadas anteriormente pelo nosso grupo (Laboratório de Engenharia Bioquímica, Biorrefino e Produtos de Origem Renovável – LEBBPOR). A escolha do TBA como solvente reacional foi decorrente de ensaios realizados por Tsukamoto (2006) em estudo da catálise enzimática com a lipase comercial de *Candida antarctica* para a esterificação de carboidratos com ácido acrílico a 55 °C e tempo de reação de 48 h. Estas mesmas condições foram utilizadas na transacilação de acrilato de vinila com metil β -D-glucosídeo (KIM *et al.*, 2004). Outros trabalhos também observaram alta estabilidade das lipases neste solvente polar bem como solubilidade diversa dos carboidratos (KU e HANG, 1995; WOUTENBERG-VAN OOSTEROM *et al.*, 1996; SERETI *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 1999; DEGN *et al.*, 1999).

A correspondência dos picos identificados em cromatograma de CLAE aos compostos da mistura da reação foi confirmada após análise em espectrômetro de massa MALDI-TOF por Tsukamoto *et al.* (2008) dos acrilatos de glicose, frutose, xilose, maltose e sacarose.

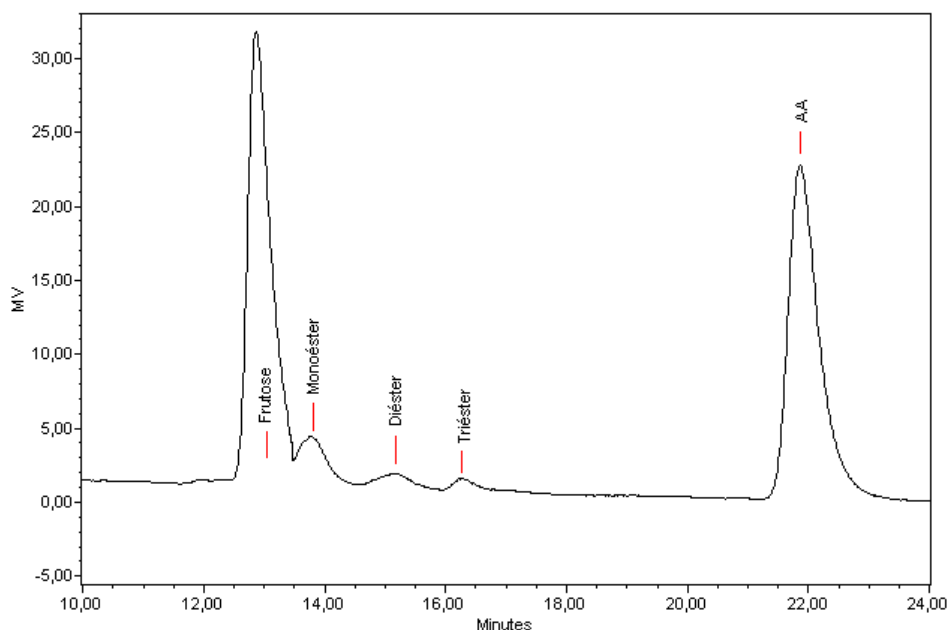


Figura 7 – Exemplo de cromatograma com os picos dos compostos presentes na mistura de esterificação da frutose com AA, com exceção do TBA

Vagetti (2008) e Tsukamoto (2006) estudaram a esterificação de ácido acrílico com carboidratos pela lipase sob concentração de 56 mg mL^{-1} . Na literatura, estudos de esterificações catalisadas por lipase apresentam diferentes concentrações aplicadas (Tabela 2). Poucos estudos sobre este efeito são encontrados. Sabeder *et al.* (2006) estudaram uma faixa de concentração entre 8 e 20 % (m/m de substratos) para esterificação de ácido palmítico com frutose por lipase. Eles observaram a maior conversão do ácido palmítico com 12 % m/m.

A lipase imobilizada apresenta uma quantidade fixa de água junto ao seu suporte (DEGN *et al.* 2001). O decréscimo da conversão do ácido com altas concentrações de lipase pode ser explicado pelo aumento do conteúdo de água ligado à carga total de enzima e também pela acelerada produção da água, uma vez que é o subproduto da esterificação.

Devido ao alto custo desta lipase, experimentos foram realizados para determinar a concentração mínima de lipase que maximizasse a produção percentual de monoéster e aumentasse a conversão de frutose máxima

observada por Vagetti (49 % de conversão de frutose e 80 % de monoéster após 24 h de reação).

Tabela 2 – Condições empregadas para esterificações enzimáticas pela lipase imobilizada *Candida antarctica*

Esterificação		Concentração de lipase (mg mL ⁻¹)	Solvente orgânico	Tempo de reação (h)	Autor
Álcool	Ácido				
Frutose anidra	ácido oleico e láurico	50	Acetona	9	Arcos <i>et al.</i> (1998)
Ácido láctico	ácido caprílico	50	Hexano	144	Torres e Otero (2001)
Octanol	ácido acrílico	50	TBA		Nordblad <i>et al.</i> (2008b)
Mono e dissacarídeos	ácido mirístico	7	TBA	24	Degn <i>et al.</i> (2001)
D-frutose, glicose, xilose, maltose e sacarose	ácido acrílico	56	TBA	48	Tsukamoto <i>et al.</i> (2008)
D-frutose	ácido acrílico	10, 20, 30 e 56	TBA	24	Ayres, B. (2010)
α-glicose	ácido dodecanóico	10	2-metil 2-butanol	50	Flores <i>et al.</i> (2001)
Frutose	ácido palmítico	5	2-metil 2-butanol	25	Chamouleau <i>et al.</i> (2001)
Frutose	ácido oleico	5	2-metil 2-butanol	25	Coulon <i>et al.</i> (1996)
Frutose ou Glicose	ácido palmítico	10	2-metil 2-butanol	50	Sakaki <i>et al.</i> (2006)
Frutose	ácidos graxos	10	2-metil 2-butanol	variável	Soultani <i>et al.</i> (2001)
D-glicose	ácido palmítico	10	Etil metilcetona	55	Yan <i>et al.</i> (2002)

5.1. Efeito da concentração de enzima

Assim nesta presente dissertação, foi estudado o efeito de quatro diferentes concentrações de lipase na reação: 10 mg mL⁻¹, 20 mg mL⁻¹, 30 mg mL⁻¹ e 56 mg mL⁻¹ em um sistema de razão molar frutose : ácido acrílico 1:5. Após 8 h de reação, as conversões de frutose foram 30, 39, 37 e 49 % respectivamente (Figura 8). A conversão de ácido acrílico variou entre 5 a 9 % de acordo com acréscimo de concentração de enzima empregada. A relação de conversão dos dois reagentes é relativamente desproporcional devido ao ácido acrílico apresentar-se em excesso no sistema. As frações de monoéster entre os produtos variaram entre 85 e 88 %, logo se conclui que o intervalo de concentrações de lipase (10 a 56 mg mL⁻¹) não influenciou a especificidade

enzimática. Torres e Otero (2001) observaram que acima da concentração de 50 mg mL^{-1} houve redução de aproximadamente 5 % no rendimento do éster.

Foi verificado que o conteúdo de água depois da adição da enzima ao sistema aumentou com o aumento das concentrações de lipase.

Os experimentos prosseguiram com concentração de lipase fixa em 20 mg mL^{-1} , para análise posterior da relação custo/ benefício em relação aos outros parâmetros da reação. Devido ao alto custo deste biocatalisador e a diferença não significativa sobre a conversão de frutose com acréscimo de lipase (de 20 mg mL^{-1} para 30 mg mL^{-1}), a concentração de lipase mais baixa foi fixada.

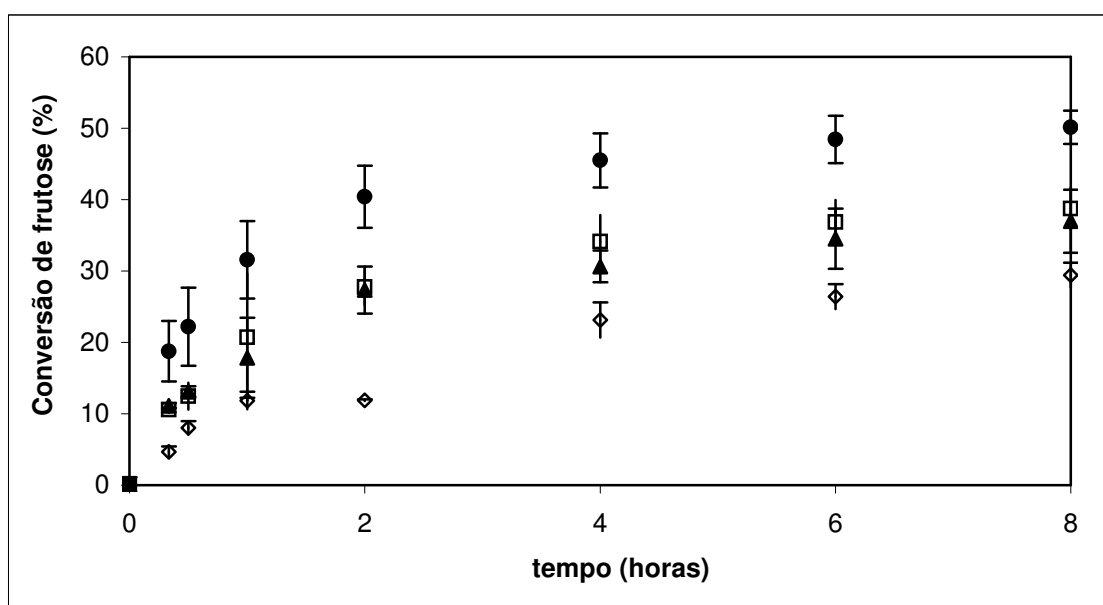


Figura 8 - Efeito de diferentes concentrações de lipase sobre a conversão de frutose por catálise enzimática utilizando razão molar de 1:5 frutose: ácido acrílico em TBA. (◇) 10 mg mL^{-1} ; (□) 20 mg mL^{-1} ; (▲) 30 mg mL^{-1} ; (●) 56 mg mL^{-1}

5.2. Efeito da razão molar de frutose: ácido acrílico 1:3 e 1:5

Visando a maximização da fração de monoéster produzida foi analisado o efeito da redução da relação molar de frutose: ácido acrílico para 1:3, empregando as mesmas concentrações de frutose e de lipase pré-selecionadas na seção 5.1, bem como mesmas temperatura e agitação. Assim,

as conversões dos reagentes e a formação dos produtos foram comparadas (Figura 9).

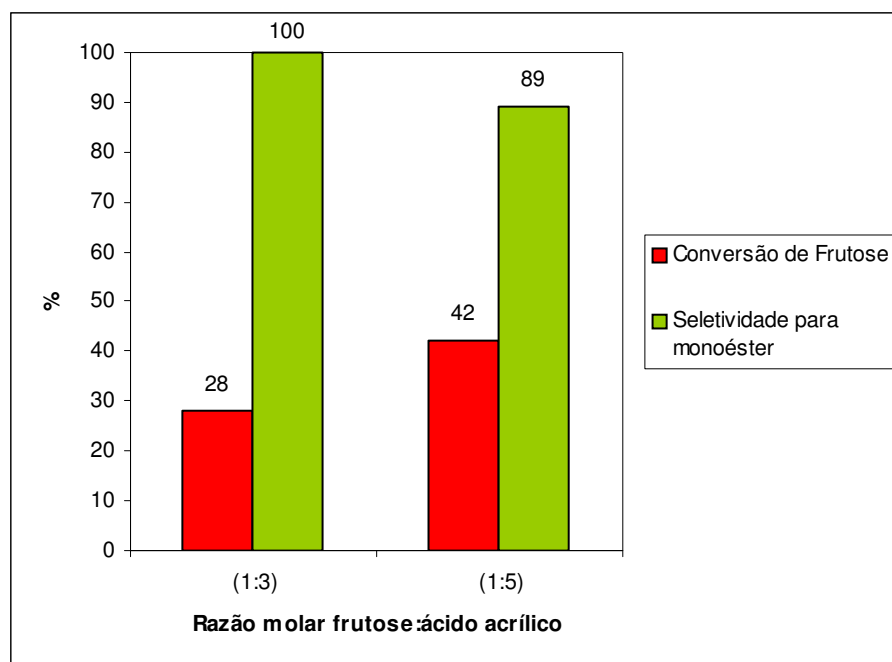


Figura 9 - Análise da conversão de frutose e ácido acrílico e seletividade para monoéster com 24 h de reação, mesma concentração de lipase (20 mg mL⁻¹) e razões molares frutose: ácido acrílico

Foi observada que a conversão final da frutose no sistema com razão molar frutose: ácido acrílico 1:5 foi 50 % maior do que no sistema com razão molar 1:3, porém foi observada a produção de di- e triéster além do monoéster. A mesma influência foi observada por Sakaki *et al.* (2006) na esterificação de ácido palmítico com frutose.

A produção de ésteres múltiplos na mistura de reação interfere em passos posteriores de purificação e polimerização, uma vez que estes conduzem a formação de polímeros não lineares. Assim, como o acréscimo de ácido acrílico não melhorou a seletividade para produção de monoéster, decidiu-se fixar a razão molar frutose: ácido acrílico em 1:3 para prosseguir o estudo de otimização da síntese de monoéster.

5.3. Influência da peneira molecular

Para obter máximo rendimento em uma reação de esterificação, é preciso deslocar o equilíbrio para a síntese, portanto, é importante que produtos de reação sejam removidos. Por este motivo, a adição de um dissecante ao sistema da reação foi estudada empregando massas crescentes de peneira molecular 3 Å na esterificação. A produção de ésteres ao longo da reação foi calculada em percentagem das áreas determinadas por CLAE conforme a Equação 2:

$$\text{Produção(\%)} = \left[\frac{A_E}{(A_M + A_D + A_T)} \right] \cdot 100 \quad (2)$$

onde: A_E é a área do éster considerado

A_M é a área do monoéster

A_D é a área do diéster

A_T é a área do triéster

A Figura 10 apresenta o perfil da conversão da frutose na presença e na ausência de PM. Os sistemas na presença de 1 g, 2 g, 3 g, 4 g ou 5 g de PM apresentaram conversão final da frutose 46 %, 59 %, 68 %, 64% e 62 %, respectivamente, enquanto apenas 25 % de conversão da frutose do sistema foi observada na ausência de PM após 8 horas de reação. A conversão da frutose foi crescente em sistemas com presença de 1 g a 3 g de PM, enquanto os dois sistemas contendo 4 g ou 5 g de PM apresentaram conversões de frutose bem próximas. No entanto, a conversão do ácido acrílico foi crescente com maiores quantidades de PM presente na reação: 15 %, 19 %, 25 %, 32 % e 30 %, mas na ausência de PM apenas 4 % do ácido foi convertido. A produção paralela de ésteres multisubstituídos foi observada apenas nos sistemas em que estavam presentes 4 g e 5 g de PM, justificando os máximos valores de conversão do ácido acrílico, e menor concentração do monoéster. Monoéster foi convertido em di- e triésteres. As reações foram conduzidas até

24 horas e as conversões finais foram 63 %, 77 %, 85 %, 85 % e 85 % respectivamente as quantidades crescentes de PM adicionadas.

Foi verificada a inexistência de transferência de massa do AA e da frutose para o interior da PM ou da lipase imobilizada. No período de 6 h, não houve variação da concentração de ambos reagentes em TBA em nenhum dos casos sob ausência de condições para ocorrer a reação.

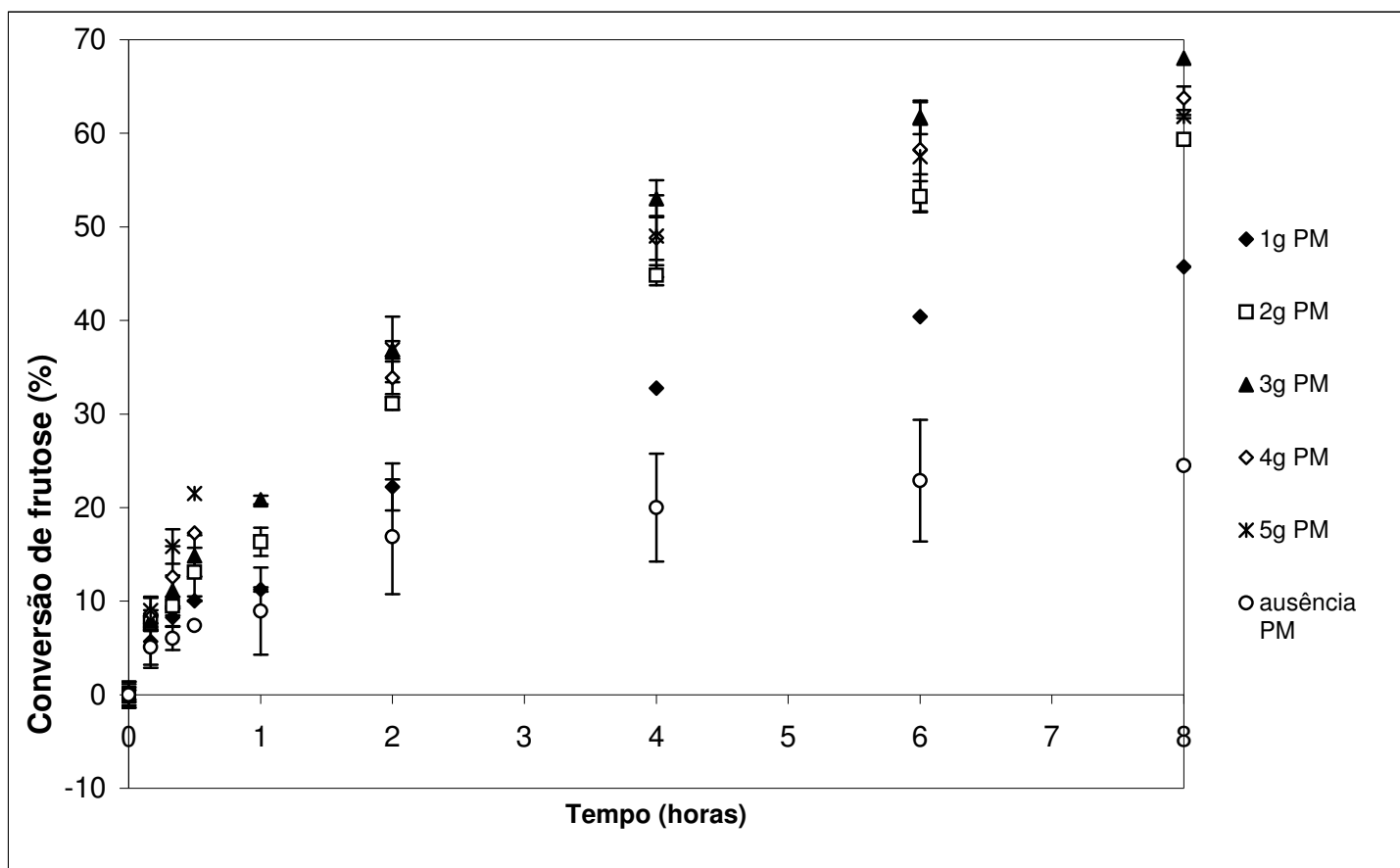
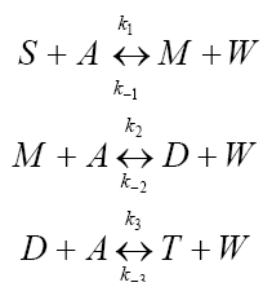


Figura 10 - Conversão da frutose em sistemas contendo 20 mg mL^{-1} de lipase , razão molar frutose: ácido acrílico 1:3 durante 8 h de reação na presença e ausência de PM.

O balanço de massa para a esterificação estudada segue o esquema 1:



onde: S representa a frutose; A representa o ácido acrílico; M representa o monoéster; D representa o diéster; T representa o triéster e; W representa a água.

A produção do triéster foi mais lenta do que as de monoéster e diéster, pois estes são produzidos primeiramente (Figuras 11 a 15). Arcos *et al.* (1998) estudaram a produção enzimática de 1,6-diácil frutofuranoses e confirmaram que a formação de di- e triésteres depende do consumo de mono- e diésteres, respectivamente. Em sistemas contendo de 1 a 3 g de PM, não foi observado nenhum pico referente ao diéster, sugerindo que a taxa de consumo é maior que a taxa de formação do diéster. No entanto, o diéster deve estar presente durante toda a esterificação. Nos cromatogramas dos sistemas sob presença de 4 g ou 5 g de PM foi identificada pequena área de diéster a partir de 2 horas (4 g de PM) e 4 h (5 g de PM). Isto explica os maiores valores de conversão do ácido acrílico para estes sistemas.

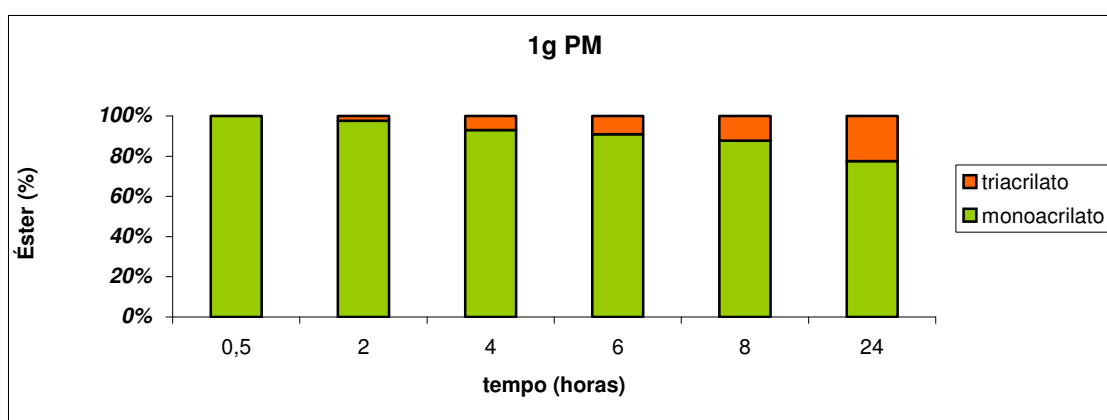


Figura 11 - Produção de ésteres (em percentagem de área) no sistema sob razão molar frutose:AA 1:3, concentração de lipase 20 mg mL⁻¹ e 1g de PM

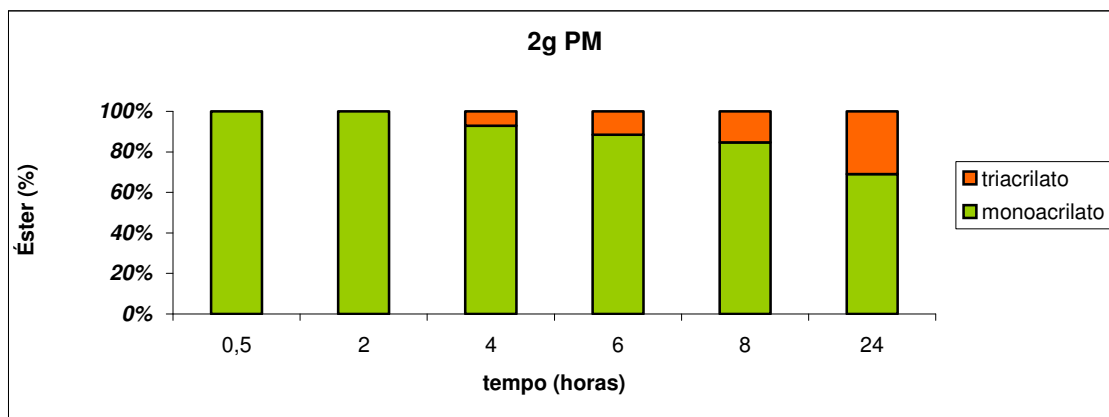


Figura 12 - Produção de ésteres (em percentagem de área) no sistema sob razão molar frutose:AA 1:3, concentração de lipase 20 mg mL⁻¹ e 2 g de PM

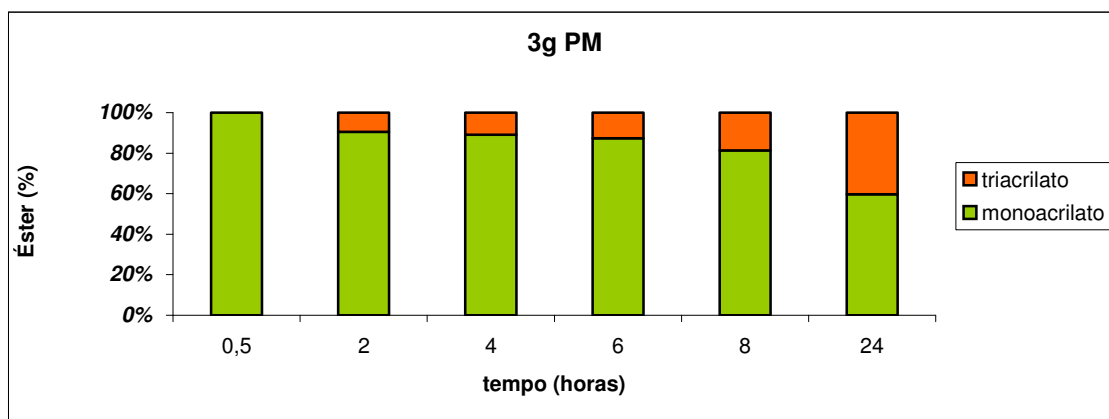


Figura 13 - Produção de ésteres (em percentagem de área) no sistema sob razão molar frutose:AA 1:3, concentração de lipase 20 mg mL⁻¹ e 3 g de PM

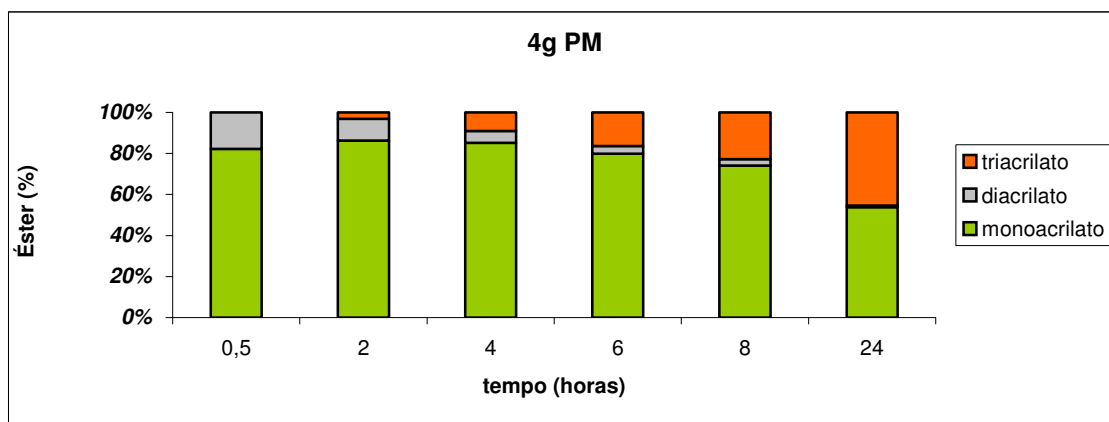


Figura 14 - Produção de ésteres (em percentagem de área) no sistema sob razão molar frutose:AA 1:3, concentração de lipase 20 mg mL⁻¹ e 4 g de PM

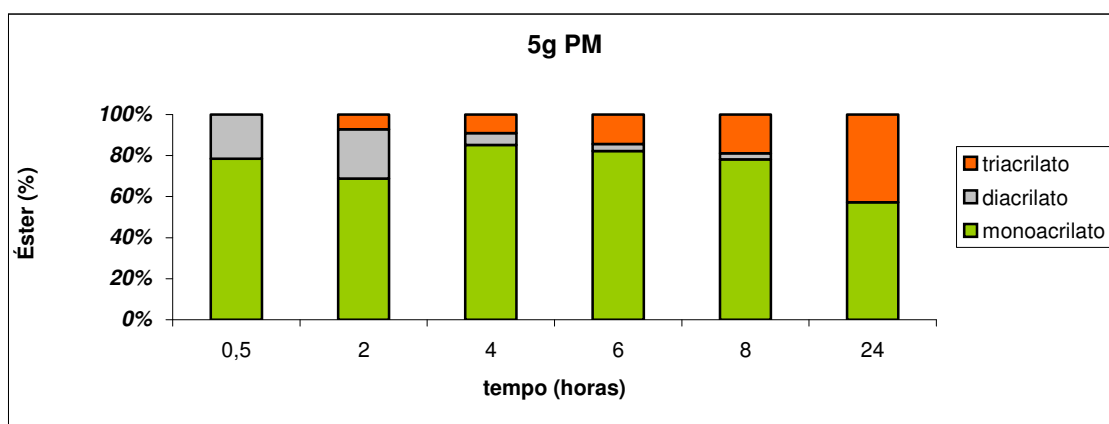


Figura 15 - Produção de ésteres (em percentagem de área) no sistema sob razão molar frutose:AA 1:3, concentração de lipase 20 mg mL⁻¹ e 5 g de PM

Os valores de umidade inicial dos sistemas de frutose solubilizada em TBA era 30 mmol L⁻¹, após a adição da lipase essa umidade subiu para aproximadamente 52 mmol L⁻¹, sugerindo que parte da água proveniente da lipase imobilizada migrou para o solvente. No entanto, durante a esterificação,

a concentração de água reduziu ainda mais (25.8 mmol L⁻¹ ou 0.06 % m/m) nos sistemas contendo PM, e assim permaneceu durante a reação. Para maiores quantidades de PM, a concentração de água reduziu mais rapidamente.

Sakaki *et al.* (2006) observaram o conteúdo de água mínimo de 0.03 % m/m durante a esterificação estudada, Chamouleau *et al.* (2001) também observaram deslocamento do equilíbrio para produção de outros produtos com utilização de PM. Foi observada que uma concentração mínima de água foi mantida no sistema, isso significa que a PM não remove a água do suporte do biocatalisador, mas apenas remove a água produzida na reação.

Na literatura, a maioria dos estudos sobre esterificação enzimática com lipases correlaciona o uso de PM com redução de seletividade. Essa associação conduz ao desinteresse por esse mecanismo de desidratação em alguns casos. Dessa forma, é válido ressaltar que neste trabalho foi demonstrado que a falta de seletividade pode ser contornada através da investigação da quantidade ótima de PM utilizada.

5.4. Quantificação de ésteres por CLAE

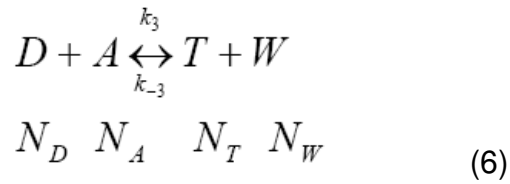
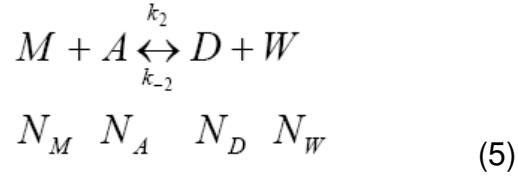
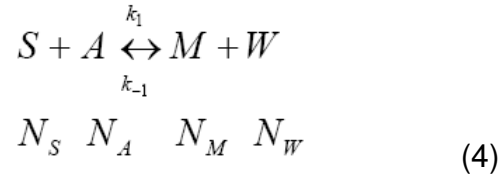
A determinação das concentrações de substratos foi obtida diretamente através de fatores de respostas definidos por curvas de calibração. Assim, o fator de resposta foi obtido a partir das curvas de concentração em função da área do pico para soluções padrões de frutose e AA. A curva de calibração é uma reta que intercepta o zero de acordo com a Equação 3:

$$C = F_r \cdot A \quad (3)$$

onde: C é a concentração de frutose ou ácido acrílico; F_r é o fator de resposta do detector e; A é a área do pico.

A quantificação da concentração dos produtos de reação (mono-, di- e triéster) não pode ser determinada pelo método analítico com curvas de calibração, devido à inexistência de acrilatos de açúcares puros no mercado.

Desta forma, os fatores de resposta foram calculados pelo balanço de massa do esquema 1, considerando o número de moles deles (N_i):



Para um sistema fechado e homogêneo, o balanço de massa é dado por:

$$N_S = N_{S_0} - \xi_1 \quad (7)$$

$$N_A = N_{A_0} - \xi_1 - \xi_2 - \xi_3 \quad (8)$$

$$N_M = \xi_1 - \xi_2 \quad (9)$$

$$N_D = \xi_2 - \xi_3 \quad (10)$$

$$N_T = \xi_3 \quad (11)$$

$$N_W = N_{W_0} + \xi_1 + \xi_2 + \xi_3 \quad (12)$$

onde: ξ_1 é o grau de avanço da reação (4), ξ_2 é o grau de avanço da reação (5), ξ_3 é o grau de avanço da reação (6) e, N_{i_0} é o número de moles inicial do componente i.

As reações foram realizadas a volumes constantes, portanto as Equações de (7) a (12) podem ser escritas em termos de concentração:

$$C_S = C_{S_0} - \xi_1 \quad (13)$$

$$C_A = C_{A_0} - \xi_1 - \xi_2 - \xi_3 \quad (14)$$

$$C_M = \xi_1 - \xi_2 \quad (15)$$

$$C_D = \xi_2 - \xi_3 \quad (16)$$

$$C_T = \xi_3 \quad (17)$$

$$C_W = C_{W_0} + \xi_1 + \xi_2 + \xi_3 \quad (18)$$

Somando as Equações (13), (15), (16) e (17), nós obtemos:

$$C_S + C_M + C_D + C_T = C_{S_0} \quad (19)$$

$$C_M + C_D + C_T = C_{S_0} - C_S \quad (20)$$

A conversão da frutose (ξ) é calculada conforme a Equação (21):

$$C_{S_0} - C_S = C_{S_0} \cdot X \quad (21)$$

Utilizando a Equação (3), (20) e (21) é possível correlacionar os fatores de resposta dos ésteres com áreas dos picos de cada cromatograma (Equação 22) conforme:

$$F_{r_M} \cdot A_M + F_{r_D} \cdot A_D + F_{r_T} \cdot A_T = F_{r_S} \cdot A_{S_0} \cdot \xi \quad (22)$$

Fazendo a divisão do lado esquerdo da Equação (22) pelo produto do fator de resposta da frutose e área da frutose nós obtemos:

$$\left[\left(\frac{F_{r_M}}{F_{r_S}} \right) \left(\frac{A_M}{A_{S_0}} \right) \right] + \left[\left(\frac{F_{r_D}}{F_{r_S}} \right) \left(\frac{A_D}{A_{S_0}} \right) \right] + \left[\left(\frac{F_{r_T}}{F_{r_S}} \right) \left(\frac{A_T}{A_{S_0}} \right) \right] = \xi \quad (23)$$

A curva de calibração da frutose foi (área do pico)=19418.(concentração)+ 5674.1, cujo coeficiente de correlação foi 0.9998. A Equação (23) foi resolvida pelo método de regressão linear múltipla utilizando dados de 238 cromatogramas e o software Statistica 8.0. Os coeficientes das razões dos fatores de resposta foram determinados com nível de confiança de 95 % e coeficiente de correlação de 0,90996.

$$\frac{F_{r_M}}{F_{r_S}} = 0,876663$$

$$\frac{F_{r_D}}{F_{r_S}} = 0,712248$$

$$\frac{F_{r_T}}{F_{r_S}} = 0,742568$$

Vagetti (2008) estudou a obtenção dos mesmos acrilatos de frutose e determinou estas razões (0.5137; 5.4536; 1.5911, respectivamente) sob algumas condições diferentes no cromatógrafo Waters, também na coluna Shodex SH1011, porém sob maior fluxo (1.0 mL min^{-1}), maior volume de injeção (20 μL), fase móvel 50 mM, mesmas temperaturas da câmara de aquecimento e do refratômetro. Portanto, ela utilizou uma fase móvel 10 vezes mais concentrada e volume de injeção 10 vezes maior. Estas condições de utilização do cromatógrafo podem ter influenciado e provavelmente justificam os diferentes valores determinados para estas razões.

Baseado no número de moles convertidos da frutose e ácido acrílico durante 24 h de reação foi possível estimar o número de moles de ésteres produzidos. Utilizando o número de moles determinados pelos fatores de resposta calculados para os ésteres, os quais foram somados e foram comparados com os números de moles dos reagentes convertidos. Esta comparação destes dois resultados conduziu a determinação do erro sobre o método de quantificação dos ésteres. O erro calculado variou entre 2 a 17 % para sistemas contendo PM e o valor máximo de 22 % foi observado apenas para o sistema na ausência de PM (Tabela 3).

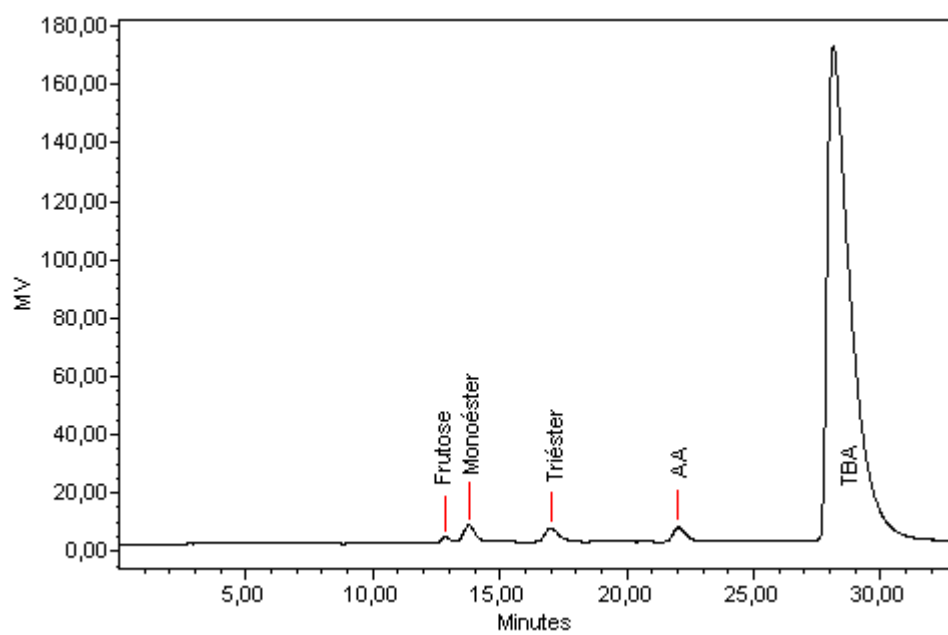


Figura 16 – Cromatograma do ensaio com 3 g de PM após 24 horas

Tabela 3 - Comparação do número de moles de ésteres calculados pela metodologia de fator de resposta desenvolvida neste trabalho e o número de moles de ésteres calculados por estequiometria do número de moles convertidos de frutose e ácido acrílico

PM Ensaio	Monoéster (mmol L ⁻¹)	Diéster (mmol L ⁻¹)	Triéster (mmol L ⁻¹)	$N_M + N_D + N_T$ (mmol L ⁻¹)	Frutose convertida após 24h (mmol L ⁻¹)	Erro calculado (%)	$N_M + 2N_D + 3N_T$ (mmol L ⁻¹)	Ácido acrílico convertido após 24h (mmol L ⁻¹)	Erro calculado (%)
1g PM	51.7	0	12.1	63.8	65.0	1.86	88.1	99.3	11.29
2g PM	51.2	0	18.6	69.8	80.2	12.98	107.0	127.4	16.04
3g PM	49.5	0	27.0	76.6	87.6	12.63	130.6	151.9	14.05
4g PM	47.3	0.75	32.3	80.4	78.1	2.91	145.7	133.4	9.15
5g PM	44.8	0	27.1	71.8	82.3	12.70	126.0	152.8	17.51
Ausência de PM	28.6	0	0	28.6	23.4	22.20	28.6	26.7	6.86

5.5. Reator tubular de leito empacotado

Para obter elevadas conversões em reações químicas, é de conhecimento geral que reatores tubulares “plug-flow” é substancialmente melhor que reatores de tanque agitado sob fluxo contínuo. Foram adicionadas 80 mg mL⁻¹ de PM a solução de reagentes do frasco alimentador (razão molar 1:3) mantidos por 3 h. Dessa forma, o conteúdo de água foi reduzido de 94.7 mmol L⁻¹ para 30.1 mmol L⁻¹. Esta solução, mantida em banho termostatzado a 55 °C, foi bombeada através do reator tubular encamisado preenchido com PM e lipase. Frações de amostras foram coletadas a cada 10 minutos. O conteúdo de água observado em todas as frações foi aproximadamente 67.2 mmol L⁻¹ ($\sigma=10.05$).

As duas primeiras frações coletadas, sob fluxo 0.1 mL min⁻¹, apresentaram maior conversão de frutose (20 %), o que posteriormente reduziu para aproximadamente 10 %, permanecendo-se constante. Este comportamento indica que a atividade enzimática foi cineticamente controlada (Figura 17), ou seja, a taxa de ligação do substrato ao sítio ativo da enzima e a taxa de liberação do produto encontram-se em equilíbrio.

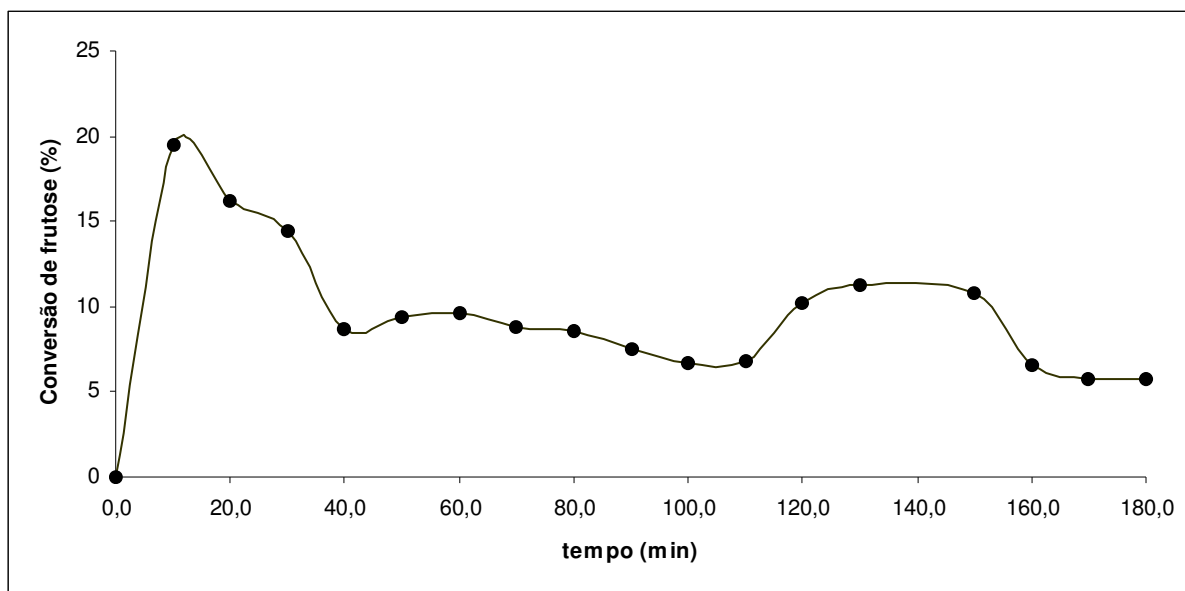


Figura 17 - Perfil da conversão de frutose em reator tubular contínuo sob taxa de fluxo 0.1 mL min⁻¹

Inicialmente os reagentes preencheram o volume do reator acilando a enzima de acordo com o mecanismo “Ping Pong Bi-Bi” descrito para esterificações catalisadas por lipases (Janssen *et al.*, 1999; Ghanem, 2007). Conforme os produtos foram gradativamente liberados do sítio ativo algumas moléculas de substratos se ligaram a enzima e outras não, dependendo do fluxo empregado. Fluxo de 0.25 mL min^{-1} e 0.5 mL min^{-1} não permitiram a conversão da frutose, não sendo detectado éster de frutose.

Wehtje *et al.* (1997) estudaram a influência do fluxo sobre a taxa de reação catalisada pela mesma lipase para a esterificação de ácido decanóico e álcool lauril em reator tubular de fluxo contínuo. Sob baixos fluxos (0.01 e 0.02 mL min^{-1}) o rendimento de éster foi de 72 %. Com taxas mais altas, por exemplo, 0.2 mL min^{-1} , 1.0 mL min^{-1} e 2.0 mL min^{-1} os rendimentos reduziram respectivamente para 68 %, 51 % e 34 %. Os rendimentos obtidos em processos contínuos tanto em reator tubular quanto em reator de tanque agitado não diferiram significativamente.

Para a esterificação estudada nessa dissertação a conversão de frutose neste reator apresentou-se próxima a 10 %, percentual encontrado para 10 minutos de esterificação em processo batelada. Dessa forma, é interessante posteriormente estudar o acoplamento de uma etapa de separação dos produtos, reciclo dos reagentes e alimentação sob taxas de fluxo menores.

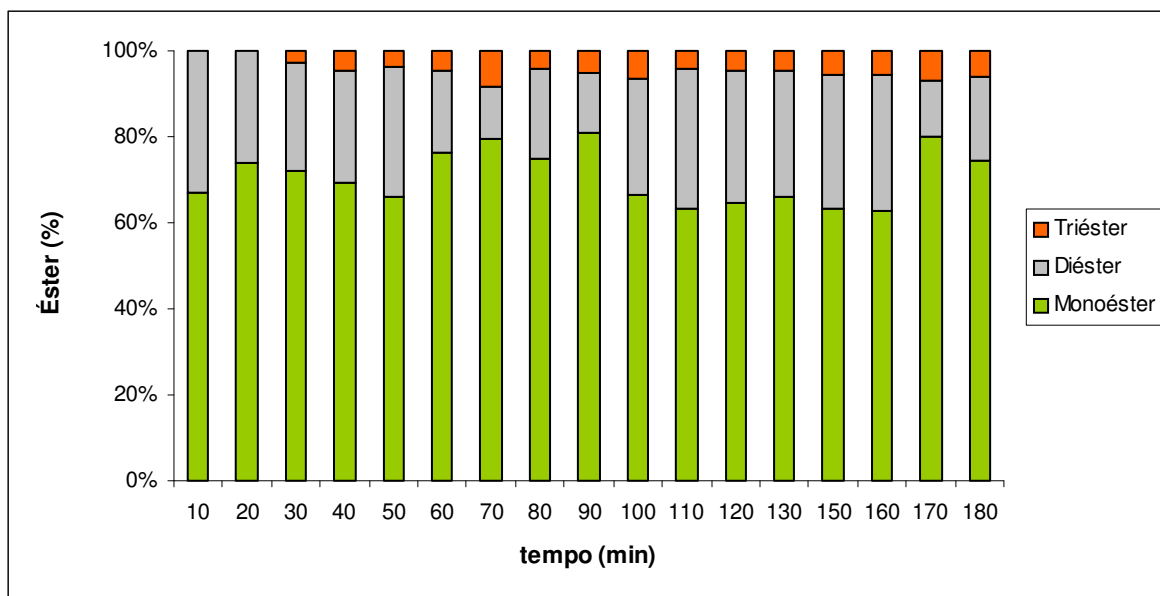


Figura 18 - Perfil do percentual de ésteres produzidos em reator tubular contínuo sob taxa de fluxo 0.1 mL min^{-1}

5.6. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

A frutose em solução aquosa apresenta-se em equilíbrio tautomérico entre duas conformações furanosídicas e duas piranosídicas, α e β para cada variação. No entanto, a conformação β -piranosídica prevalece independente da concentração ou temperatura em que se encontra (HYVÖNEN *et al.*, 1977).

Espectros de ^1H RMN de frutose em solventes orgânicos são pouco encontrados na literatura. Amarasekara *et al.* (2008) estudaram o comportamento da D-frutose em DMSO (dimetilsulfoxido) sob aquecimento durante 30 min por ^1H RMN. Jaseja *et al.* (1990) observaram a prevalência de β -frutofuranose, apenas traços de α -frutopirranose e quantidades próximas dos outros dois tautômeros em DMSO. Porém estes espectros foram obtidos de amostras puras de frutose no solvente.

A determinação das estruturas de compostos em misturas com utilização da técnica de RMN é analisada quanto à intensidade e posição dos sinais nos espectros.

Nesta parte do trabalho, foram registrados os espectros dos reagentes em TBA. Em seguida, foram comparados o espectro da amostra de frutose com ácido acrílico em TBA e o espectro da amostra de esterificação após 1 h.

Devido à mistura analisada conter éster e o método requerer o uso de um solvente deuterado para calibração do campo, foi utilizada água deuterada em um capilar no tubo de ressonância ou sonda, assim evitando a hidrólise do produto e evitando solventes deuterados com muitos prótons que produziram muitos sinais no espectro.

O espectro de frutose em TBA apresentou ampla faixa de deslocamento químico (4 a 6.2 ppm). O sinal das hidroxilas do terc-butanol e da frutose sob efeito da troca química, cujo deslocamento químico foi 4.8 ppm sobrepôs-se aos sinais da frutose (4.8 ppm). Dessa forma, a visualização e associação dos picos a todos os prótons da mistura tautomérica da frutose em TBA foi prejudicada (Figura 19).

A Figura 20 ilustra o espectro da solução de frutose com AA sob razão molar 1:3 em TBA. A alteração dos sinais da frutose pode estar relacionada a protonação das hidroxilas da frutose pelo ácido. Os sinais do AA (entre 6.1 a 6.8 ppm) não sofreram interferência da água deuterada, diferentemente da frutose.

A amostra de 1 h de esterificação apresentou espectro semelhante, inviabilizando a identificação da hidroxila reativa (Figura 21). Será necessário, futuramente, realizar análises de RMN com terc-butanol deuterado para evitar o sinal intenso da hidroxila deste solvente. Ou então, a purificação da amostra será necessária.

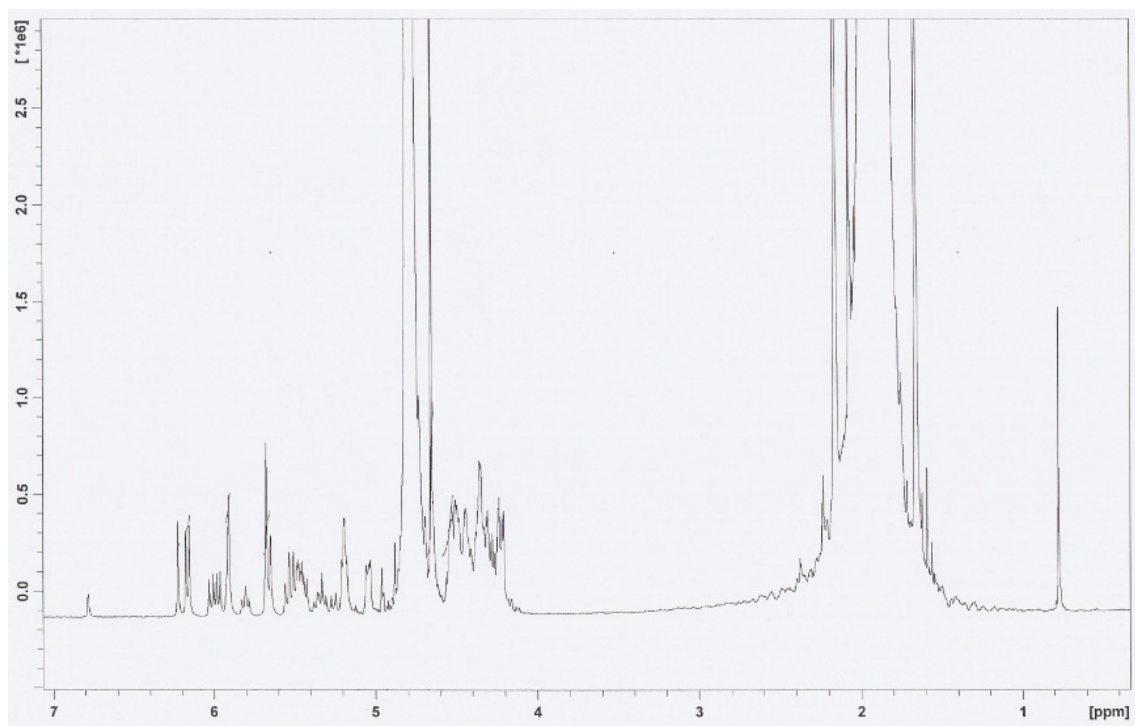


Figura 19 – ^1H RMN da solução de frutose 0.1 M em TBA

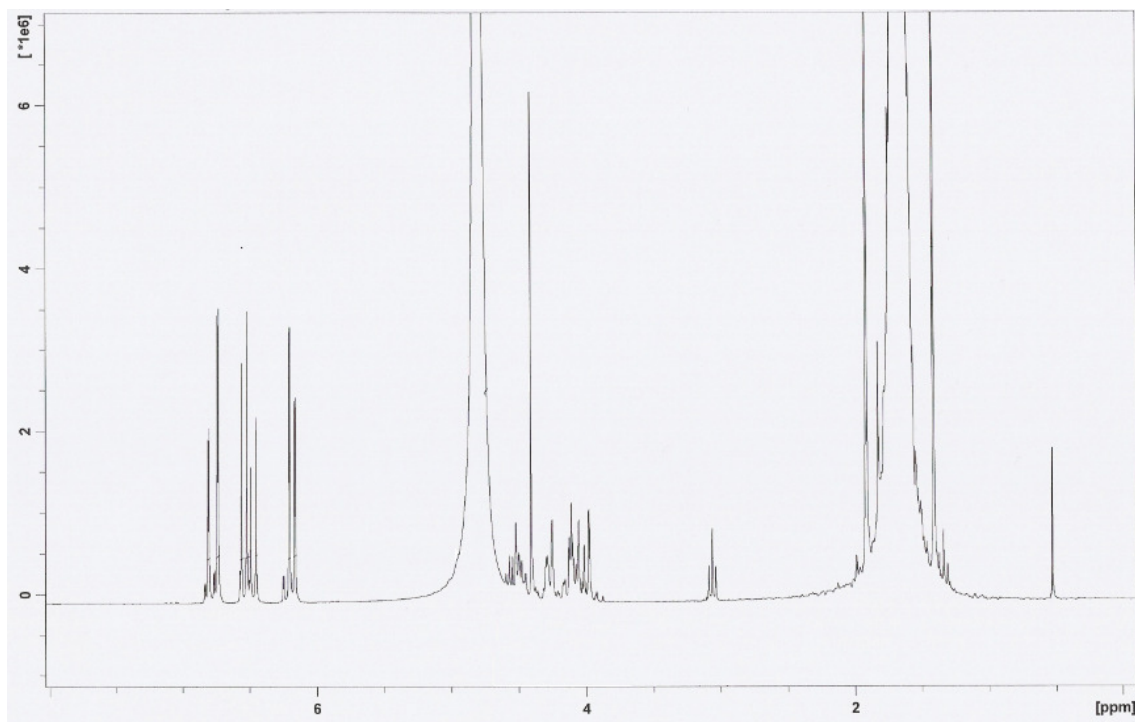


Figura 20 – ^1H RMN da solução de frutose 0.1 M em TBA com 0.3 M de AA

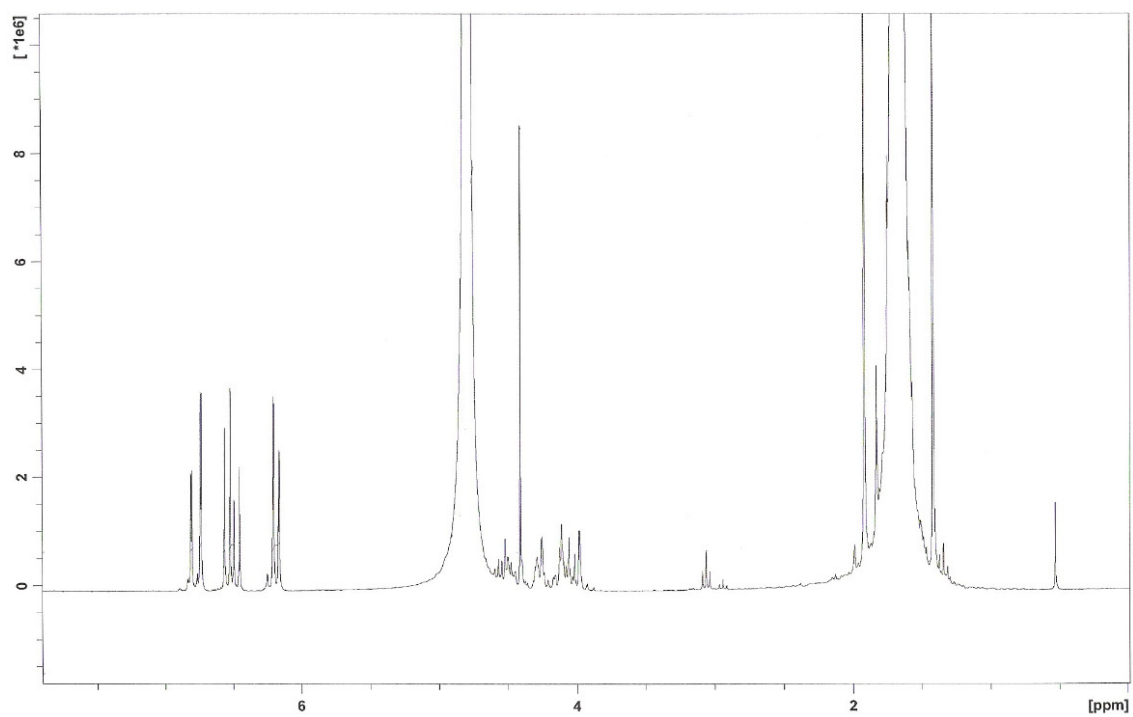


Figura 21 - ^1H RMN da solução de 1 h de esterificação

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de monoacrilatos de frutose a partir da esterificação direta de ácido acrílico com frutose catalisada pela lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica*.

Foi utilizado excesso de ácido acrílico para deslocar o equilíbrio. Para a razão molar menor (1:3) foi observada menor conversão de frutose inicial, porém a produção de monoéster foi exclusiva durante 24 horas de reação.

A adição de PM favoreceu a síntese contínua de ésteres, evitando a hidrólise. Foi observada a síntese exclusiva de monoacrilato na presença de 2 g de PM durante 2 h de reação com 37 % de conversão da frutose inicial. Após este tempo, o monoéster foi consumido para formar ésteres multiacrilados. A adição de maiores quantidades de PM reduziu a produção de monoacrilatos, demonstrando a influência da PM sobre a especificidade da lipase.

As conversões de frutose após 24 h de reação foram 65 %, 79 %, 86 %, 84 % e 85 % com 1 g, 2 g, 3 g, 4 g ou 5 g de PM respectivamente. Enquanto da ausência de PM apenas 24 % da concentração de frutose inicial foi convertida.

Foram determinados fatores de resposta para os acrilatos de frutose produzidos, pois padrões dos mesmos ainda não se encontram disponíveis no mercado. A utilização de balanço de massa e regressão múltipla linear com 238 cromatogramas de CLAE permitiu estimar a quantidade de ésteres produzidos com um intervalo de erro entre 2 e 17 %. Futuramente, caso esses ésteres puros possam ser isolados, poderão ser comparados os valores dos fatores de resposta calculados experimentalmente com os valores dos fatores de resposta obtidos das curvas de calibração dos mesmos.

A utilização de reator contínuo tubular estudada sob fluxo 0.1 mL min^{-1} produziu uma mistura de ésteres. A otimização deste sistema para obtenção exclusiva de monoéster pode ser estudada sob taxas de fluxo menores.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS POSTERIORES

- Estudar a alimentação de frutose durante a reação;
- Estudar o equilíbrio tautomérico da frutose em terc-butanol;
- Identificar a hidroxila reativa da molécula de frutose na produção de monoacrilatos com técnicas de RMN utilizando solvente deuterado com deslocamento químico distante dos compostos presentes no sistema;
- Estudar a produção exclusiva de monoéster em reator tubular contínuo a baixas taxas de fluxo contínuo.
- Desenvolver metodologia para purificação dos acrilatos de frutose;
- Desenvolver metodologia de polimerização dos acrilatos e estudar propriedades dos polímeros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARESKA, A.S., WILLIAMS, L.D., EBEDE, C.C. Mechanism of the dehydration of D-fructose to 5-hydroxymethylfurfural in dimethyl sulfoxide at 150 °C: an NMR study. *Carbohydrate Research*, v.343, p.3021-3024, 2008.

ARCOS, J. A., BERNABÉ, M., OTERO, C. Quantitative enzymatic production of 1,6-diacyl fructofuranoses. *Enzyme and Microbial Technology*, v.22, p.27-35, 1998.

BASF, Boeckh, D., B. Hauer and D. Haering (2003). Enzymatic synthesis of sugar acrylates. WO 03/042227. (BASF Aktiengesellschaft, Germany).

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

CHANDRA, R., RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. *Progress in Polymer Science*, v.23, p.1273-1335, 1998.

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

CHEN, X., MARTIN, B.D., NEUBAUER, T.K., LINHARDT, R.J., DORDICK, R.J., RETHWISCH, D.G. Enzymatic and chemoenzymatic approaches to synthesis of sugar-based polymer and hydrogels. *Carbohydrates Polymers*, v.28, p.15-21, 1995.

COLE, M.A. *preprints of Proc.acs Division of Polymeric materials science and engineering*, v.63, p. 877, 1990.

COULON, D., ISMAIL, A., GIRARDIN, M., ROVEL, B., GHOUL, M. Effect of different biochemical parameters on the enzymatic synthesis of fructose oleate. *Journal of Biotechnology*, v.51, p.115-121, 1996.

DEGN, P, PEDERSEN, L.H., DUUS, J., ZIMMERMANN, W. Lipase-catalysed synthesis of glucose fatty acid esters in *tert*-butanol. *Biotechnology Letters*, 1999.

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, p.483-491, 2001.

ENGASSER, J.M., CHAMOULEAU, F., CHEBIL, L., GHOUL, M. Kinetic modeling of glucose and fructose in 2-methyl 2-butanol, *Biochemical Engineering Journal*, v.42, p.159-165, 2008.

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

FREGAPANE, G., SARNEY, D.B., VULFSON, E.N. Enzymic solvent-free synthesis of sugar acetal fatty acid esters. *Enzyme and Microbial Technology*, v.13, p.796-800, 1991.

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

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron*, v.63, p.1742, 2007.

GRANT, D.M., HARRIS, R.K. Encyclopedia of NMR, ed. John Wiley & Sons: New York, v.1, 1996.

HAAR, R., SCHOLS, H.A., BROEK, L.A.M., SAGLAM, D., FRISSEN, A.E., BOERIU, C.G., GRUPPEN, H., Molecular sieves provoke multiple substitutions in enzymatic synthesis of fructose oliggosaccharide-lauryl esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.62, p.183-189, 2010.

HANOVER, L.M., WHITE, J.S. Manufacturing, composition, and applications of fructose. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.58, p.724S-732S, 1993.

HAGSTRÖM, A.E.V., NORDBLAD, M., ADLERCREUTZ, P., Biocatalytic Polyester Acrylation – Process Optimization and Enzyme Stability. *Biotechnology and Bioengineering*, v.102, n.3, p.693-699, 2009.

HODGE, P. Syntheses and separation using functional polymers. *Chich-ester*, p. 43-122, 1988.

HOLLMANN, F., GRZEBYK, P., HEINRICHS, V., DODERER, K., THUM, O. On the inactivity of *Candida antarctica* lipase B towards strong acids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.57, p.257-261, 2009.

HYVÖNEN, L., VARO, P. KOIVISTOINEN, P. Tautomeric equilibria of D-glucose and D-fructose: NMR spectrometric easurements. *Journal of Food Science*, v. 42, p.657-659, 1977.

KHALED, N.; MORTET, D.; PINA, M.; GRAILLE, J. Fructose oleate synthesis in a fixed bed reactor. *Biotechnology Letters*, v. 13, n° 03, p. 167-172, 1991.

KU, M.A., HANG, Y.D. Enzymatic synthesis of esters in organic medium with lipase from *Byssoschlamys fulva*. *Biotechnology Letters*, v.17, p.1081-1084, 1995.

JANSSEN, A. E. M.; KLABBERS, C.; FRANSSEN, M. C. R.; VAN'T RIET, K. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters in 2-pyrrolidone. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 13, p. 565-571, 1991.

JANSSEN, A.E.M., SJURNES, B.J., VAKUROV, A.V., HALLING, P.J. Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: correct model and solvent effects on parameters, *Enzyme and Microbial Technology*, v.24, p.463-470, 1999.

JASEJA, M., PERLIN, A.S. Two-Dimensional NMR spectral study of the tautomeric equilibria of D-fructose and related compounds. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v.28, p.283-289, 1990.

LJUNGER, G., ADLERCREUTZ, P., MATIASSEN, B. Lipase catalyzed acylation of glucose. *Biotechnology Letters*, v.16, p.1167-1172, 1994.

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

MARTIN, J.E. Environmental impact studies of the disposal of polyacrylate polymers used in consumer products. *The Science of the Total Environment*, v.191, p.225-234, 1996.

MORRISON, R., BOYD, R. *Química Orgânica*. Trad. de M. Alves da Silva, 7^a Ed. Lisboa, fundação Calouste Gulbekian., 1981.

NORDBLAD, M.; ADLERCREUTZ, P. Effects of acid concentration and solvent choice on enzymatic acrylation by *Candida Antarctica* lipase B. *Journal of Bioechnology* 133, p.127-133, 2008a.

NORDBLAD, M.; ADLERCREUTZ, P. Efficient Enzymatic Acrylation Through Transesterification at Controled Water Activity, *Biotechnology and Bioengineering*, v.99, n.6, p.1518-1524, 2008b.

PARELLA, T. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 36, p.467, 1998.

PARK, D.W.; HAAM, S.; AHN, I. S.; LEE, T. G.; KIM, H.S.; KIM, W.S. Enzymatic esterification of β -methylglucoside with acrylic/methacrylic acid in organic solvents. *Journal of Biotechnology*, v. 107, p. 151-160, 2004.

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

PATIL, D.R.; RETHWISCH, D.G.; DORDICK, J.S. Chemoenzymatic synthesis of novel sucrose-containing polymers. *Macromolecules*, v.24, p.3462-3463.

PAULA, A.V., BARBOZA, J.C.S., de CASTRO, H.F. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. *Química Nova*, v.28, n.5, p.792-796, 2005.

POLAT,T., LINHARDT, R. Syntheses and Applications of Sucrose-Based Esters. *Journal of Surfactants and Detergents*, v.4, n.4, p.415-421, 2001.

POPESCU, D., HOOGENBOOM,R., KEUL, H., MOELLER, M. Hydroxy functional acrylate and methacrylate monomers prepared via lipase-catalyzed transacylation reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.62, p.81-90, 2010.

SABEDER, S., HABULIN, M., KNEZ, Z. Comparison of the esterification of fructose and palmitic acid in organic solvent and in supercritical carbon dioxide, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.44, p.9631-9635, 2005.

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

SARNEY, D.B., KAPELLER, H. FREGAPANE, G., VULFSON, E.N. Chemoenzymatic synthesis of disaccharide fatty acid esters. *Journal of American Oil Chemical Society*, v.71, p.711-714, 1994.

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

SERETI, V., STAMATIS, H., KOLISIS, F.N. Studies on the regioselective acylation of sugars catalyzed by lipase in tert-butanol. *Progress in Biotechnology*, v.15, p.725-730, 1998.

SOULTANI, S.; ENGASSER, JEAN-MARC; GHOUL, M. Effect of acyl chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 725-731, 2001.

STAPLES, C. A.; MURPHY, S. R.; MCLAUGHIN, J. E.; LEUNG, I. W.; CASCIERI, T. C.; FARR, C. H. Determination of selected fate and aquatic toxicity characteristics of acrylic acid and a series of acrylic esters. *Chemosphere*, v. 40, p. 29-38, 2000.

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

TRIANAFYLLOU, A. O., WEHTJE, E., ADLERCREUTZ, P., MATTIASSEN, B. Effects of sorbitol addition on the action of free and immobilized hydrolytic enzymes in organic media. *Biotechnology and Bioengineering*, v.45, p.187-195, 1995.

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

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

VAGETTI, E., Obtenção de Acrilatos de Frutose por Catálise Enzimática. Tese de mestrado, Unicamp, Campinas, Brasil, 2008.

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

WARD, O.P.; FANG, J.; LI, Z. Lipase –catalysed synthesis of sugar éster containing arachidonic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, p. 52-56, 1997.

WEHTJE, E., KAUR, J., ADLERCREUTZ, P., CHAND, S., MATTIASSEN, B. Water activity in enzymatic esterification processes. *Enzyme and Microbial Technology*, v.21, p.502-510, 1997.

WINKLER, F. K., GUBERNATOR, K. Structure and mechanism of human pancreatic lipase. In: *Lipases, Their Structure, Biochemistry and Application*

(Eds. Wooley and Petersen). Cambridge University Press, Cambridge, p.139-157, 1994.

WOUDENBERG-VAN OOSTEROM, M.; RANTWIJK, F.; SHELDON, R.A. Regioselective Acylation of Disaccharides in ter-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* Lipase, *Biotechnology and Bioengineering*, v.49, p.328-333, 1996.

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

YAN, Y., BORNSCHEUER, U.T., SCHMID, R.D. Efficient water removal in lipase-catalyzed esterifications using a low-boiling-point azeotrope. *Biotechnology and Bioengineering*, v.78, p. 31-34, 2002.

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

ZHANG, X., HAYES, G.D. Increased Rate of Lipase-Catalyzed Saccharide-Fatty Acid Esterification by Control of Reaction Medium. *JAOCS* , v.76, n.12, p.1495-1500, 1999;