

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

**Esterificação enzimática direta de carboidratos com ácido
acrílico em meio orgânico.**

Eng^a. Junko Tsukamoto MSc.

Campinas
JULHO de 2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
Área de Concentração
Desenvolvimento de Processos Químicos**

**Esterificação enzimática direta de carboidratos com ácido
acrílico em meio orgânico.**

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química
para a obtenção do título de Doutor
em Engenharia Química.

Eng^a. Junko Tsukamoto MSc.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco.

Campinas – São Paulo
JULHO DE 2006

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

T789e Tsukamoto, Junko
Esterificação enzimática direta de carboidratos com
ácido acrílico em meio orgânico / Junko Tsukamoto.--
Campinas, SP: [s.n.], 2006.

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

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

Titulo em Inglês: Direct enzymatic esterification of carbohydrates with
acrylic acid in organic media

Palavras-chave em Inglês: Acrylic acid, esterification, Carbohydrate,
Candida antarctica lipase B

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

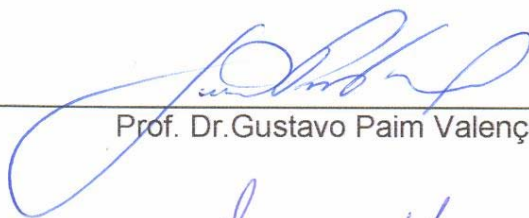
Banca examinadora: Gustavo Paim Valença, Martin Georg Peter, Juliana
de Souza Ferreira, Eliana Setsuko Kamimura

Data da defesa: 31/07/2006

Tese de Doutorado defendida por Junko Tsukamoto e aprovada em 31 de julho de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Telma Teixeira Franco - Orientadora



Prof. Dr. Gustavo Paim Valença



Prof. Dr. Martin Georg Peter



Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura

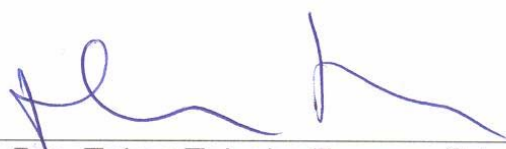


Dra. Juliana de Souza Ferreira

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo - Suplente

Dr. Lúcio Flávio Costa Melo - Suplente

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

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'T' followed by a series of loops and a final flourish.

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco - Orientadora

“Investir conhecimentos rende sempre melhores juros.”

Benjamin Franklin.

“Para estarmos aptos a enfrentar novos públicos, devemos começar por ser capazes de enfrentar cadeiras vazias.”

Peter Brook

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt.

“A glória é tanto mais tardia quanto mais duradoura há de ser, por que todo fruto delicioso amadurece lentamente.”

Arthur Schopenhauer

Dedico este trabalho às pessoas
ilustres e essenciais da minha vida: o
meu pai, a minha mãe e as minhas
irmãs.

AGRADECIMENTOS

A vida e a minha saúde pelas oportunidades profissionais, pelas pessoas que me cercam e por ter sempre ajudado o meu caminho.

Aos meus ilustríssimos PAIS por terem sempre compreensivos e me apoiando às minhas buscas de novas conquistas.

As minhas valiosas irmãs, Tomiko e Alexandre, Nobuko, Akiko e aos sobrinhos maravilhosos Willian Takao, Luane Tiyeko, Satomy e o novo integrante irmão de Takao, Seiji.

À minha orientadora, Telma Teixeira Franco, pela orientação, correções e por ter viabilizado a oportunidade do Doutorado na Alemanha na Universidade de Potsdam durante três meses. Obrigada pela sua paciência e compreensão durante as reuniões junto com o Prof. Gustavo.

Ao Prof. Gustavo Paim pela paciência e compreensão durante as reuniões e nas correções.

Prof. Dr. Martin G. Peter, pelas correções e sugestões deste projeto.

A Dr. Sophie Haebel, pela realização de parte dos experimentos de MALDI-TOF MS.

Ao Viorel Rusu, pela ajuda e amizade durante a minha estadia na Alemanha.

Àqueles, que conheci durante parte de Doutorado em Potsdam (Alemanha) por compartilharem momentos inesquecíveis: o Alexander, Balakumar, Luca, Pedro e Ronald.

Ao técnico, Lúcio Melo (UNICAMP-FEQ) pelas informações necessárias sobre o equipamento utilizado. Além de sua amizade e de sua esposa, Joely.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB – DPQ).

À amiga Mara Elga, companheira desde mestrado e de todas as situações.

A Ana Lygia, além da amizade, se prontificou a me ajudar.

Ao Enio e o Eden pelas amizades e bons momentos de “happy hours”.

À Paula Delgado e Érica V., além da amizade, por me acompanhado o dia inteiro no HC. (Vejam os por um lado bom.... “tricotamos” até...rs).

A Kity, Paula e Arlete pelas amizades e bons momentos de descontração.

A Sueli Ohata e o Bernardo da FEA /DEA, pela amizade desde mestrado.

Aos órgãos de fomento, CNPq pela concessão da Bolsa de Doutorado no período em que o trabalho foi desenvolvido na UNICAMP, Projeto Alfa pela concessão da Bolsa de pesquisa na Universidade de Potsdam e FAPESP.

A Novozymes[®] pela doação da lipase CalB (Novozym 435) utilizado para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para este trabalho e para meu aprendizado profissional e pessoal. Obrigada.

ACKNOWLEDGMENTS

The life and my health, for the professionals opportunities, for the people surround me and for helping to walk my way.

To my most illustrious parents for having always comprehensive and supporting me to my searches of new conquests.

My valuable sisters, Tomiko and Alexander, Nobuko, Akiko and to the wonderful nephews Willian Takao, Luane Tiyeko, Satomy and new the integrant brother of Takao, Seiji.

To my supervisor, Telma Teixeira Franco, for the orientation, corrections and for having made possible the chance of the Doctorate in Germany in the Potsdam University during three months. Thanks for its patience and understanding during the meetings together with Prof. Gustavo.

To Prof. Gustavo Paim, for patience and comprehension during the meetings and corrections.

To Prof. Dr. Martin G. Peter, for the corrections and suggestions of this project.

To Dr. Sophie Haebel, for the accomplishment of part of the MALDI-TOF MS experiments.

To Viorel Rusu, for the aid and friendship during my stay in Germany.

To those, that I knew during part of Doctorate in Potsdam (Germany) for sharing unforgettable moments: Alexander, Balakumar, Luca, Peter, Philipp and Ronald.

To technician, Lúcio F. C. Melo (UNICAMP-FEQ) for the necessary information on the used equipment. HPLC, Beyond its friendship and its wife, Joely.

To all fellow workers of the Laboratory of Engineering Biochemist (LEB - DPQ).

To my friend Mara Elga, a friend since master course and of all the situations.

To Ana Lygia, to whom offered to help me some corrections.

To Éden C. and Enio, for the friendships and good moments of "happy hours".

To Paula Delgado and Érica V., beyond of friendship, for me followed all day in the HC. (Lets see a good point of this... "we shared many thought"...rs).

The Kity, Paula and Arlete for the friendships and good moments of fun.

To Sueli Ohata and Bernardo of FEA /DEA, for the friendship since master degree.

To the financial agencies CNPq for the concession of the scholarship of the doctorate when the work was developed at UNICAMP and Alfa Project for the concession of the “Doctorate Sandwisch” scholarship at Potsdam University and FAPESP.

The Novozymes® for the donation of lipase CalB (Novozym 435) used for the development during the research.

To many people who had contributed, directly or indirectly, for this work and my professional and personal learning. Thank you a lot.

RESUMO

Reações enzimáticas em meio orgânico têm despertado grande interesse industrial devido às vantagens de obtenção de produtos puros pela maior especificidade das enzimas, pela redução de gastos energéticos e pela possibilidade de desenvolvimento de condições menos agressivas de processo. O uso de enzimas em síntese é uma alternativa viável à síntese orgânica e pode ser compreendida como processo relacionado ao novo conceito de “biotecnologia industrial” (white biotechnology), devido às preocupações ambientais e da sustentabilidade dos processos químicos.

Processos biotecnológicos permitem a exploração racional de materiais renováveis (açúcares) para obtenção de produtos industriais, diminuindo a degradação ambiental. Uma rota enzimática é aqui proposta para obtenção de acrilatos de açúcares, monômero para confecção de polímeros biodegradáveis. O uso de enzimas em síntese orgânica oferece vantagens devido a especificidades na formação de produto, onde os custos de separação, purificação e tratamento de resíduos são minimizados. As lipases são responsáveis por 20% das biotransformações realizadas atualmente. Ésteres derivados de carboidratos e de ácidos graxos vêm sendo produzidos para a indústria alimentícia e farmacêutica, entretanto, mas não se encontram ainda ésteres tais como acrilatos de carboidratos no mercado.

Esse projeto visou um estudo da produção de acrilatos de carboidratos pela reação direta via enzimática pela lipase comercial CalB. A esterificação de três monossacarídeos (D-glicose, D-frutose e D-xilose) e dois dissacarídeos (sacarose e maltose) com ácido acrílico pela CalB no solvente *tert*-butanol foi estudada. O efeito dos três seguintes parâmetros foi avaliado: temperatura, razão molar entre os reagentes (açúcar: ácido acrílico) e quantidade de enzima sobre a conversão a ésteres foi avaliada. A conversão da reação foi acompanhada por cromatografia líquida (CLAE-IR) e por MALDI TOF MS.

Palavras-chaves: Ácido acrílico, esterificação, carboidratos, *Candida antarctica* lipase B.

Abstract

Industrial interest in enzymatic reactions in organic media is due to the possibility of obtain pure compounds with the use of highly specific enzyme, the decrease in energy costs and the possibility of using mild process conditions. The development of new enzymatic processes for chemical synthesis as a viable alternative to the organic synthesis is related to the new concept of "industrial biotechnology" (white biotechnology), with higher concerns with the environment and the sustainability of chemical processes.

Biotechnological processes that make a more rational use of renewed resources such as sugars to produce chemicals decrease, in most cases, the environmental impact. In this work an enzymatic route is proposed for the production of sugar acrylates, a biodegradable monomer. The use of enzymes in organic media has the advantage of high specificity to the desired product, lower separation and purification costs, and minimization of residue formation. Currently, lipases are responsible for 20% of all biotransformations. Esters derived from fatty acid and carbohydrates are produced for the food and pharmaceutical industries. However, acrylate esters of carbohydrate are still not found in the market.

This aim of this work was to study the production of acrylates of carbohydrates by the direct enzymatic reaction of sugars with acrylic acid on the commercial lipase CalB. The esterification of three monosaccharide (D-glucose, D-fructose and xylose) and two disaccharides (sucrose and maltose) with acrylic acid on CalB in tert-butanol was studied. The effects of temperature, molar ratio of the reactants (sugar to acrylic acid) and amount of enzyme on the conversion to esters were studied. The esterification reaction was monitored by HPLC and MALDI TOF MS.

Keywords: Acrylic acid, esterification, carbohydrate, *Candida antarctica*, lipase.

SUMÁRIO

Epígrafe	iii
Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Acknowledgments	vii
Resumo	ix
Abstract	x
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Nomenclatura	xvii
Capítulo I: Introdução	1
Objetivo Geral	5
Objetivos Específicos	5
Capítulo II: Revisão da Literatura	6
1. Química sustentável	6
1.1 Presença brasileira	8
2. Ácido acrílico e acrilatos	8
3. Carboidratos e classificação de mono-e dissacarídeos.	11
3.1 Solubilidade de açúcares em solventes orgânicos	14
4. Esterificação	20
5. Lipases	21
5.1 Lipase de <i>Candida antarctica</i>	22
5.1.1 <i>Estrutura e origem</i>	22

5.1.2	Mecanismo de reação e cinética-----	23
5.2	Reações catalisadas pela lipases-----	24
6.	Catálise enzimática em meio orgânico e seleção de solventes orgânicos adequados-----	25
6.1	Escolha de solventes para reação enzimática-----	28
6.2	Razão molar (açúcar e ácido orgânico)-----	29
6.3	Efeito de peneira molecular sobre esterificação de açúcares.-----	30
6.4	Lipases, ácido acrílico e carboidratos-----	32
6.4.1	Purificação do produto acrilato de açúcares-----	37
6.5	Inibição de lipases por ácidos e demais compostos orgânicos.-----	37
7.	Referências bibliográficas-----	39
Capítulo III: Direct synthesis of carbohydrate esters using lipase B <i>Candida antarctica</i> in tert-butanol -----		
		47
Capítulo IV: Enzymatic synthesis of mono- and dissacharides esters with acrylic acid-----		
		75
Capítulo V: Conclusões-----		
		97
Capítulo VI: Sugestões para trabalho futuros.-----		
		98
Anexos-----		
		99

Lista de Figuras

CAPITULO II

Figura 1. Estrutura química de ácido acrílico-----	9
Figura 2. Diagrama simplificado de processo de escoamento para produção de ácido acrílico -----	10
Figura 3. Estrutura glicose em modelo Fisher e em cíclicos.-----	12
Figura 4. Estrutura de frutose em estrutura Fisher e em cíclicos -----	13
Figura 5. Estrutura de xilose em estrutura Fisher e em cíclicos -----	13
Figura 6. Estruturas dos respectivos dissacarídeos -----	14
Figura 7. Mecanismo catalítico de lipases baseado na “tríade catalítica” de serina (nucleófilo), histidina e apartato ou glutamato.-----	24

CAPITULO III

Figure 1. Effect of amount of enzyme (60mg and 200 mg of CalB) on the esterification of AA and n-butanol in toluene._____	58
Figure 2. Effect of temperature on the solubility of D-glucose (A), D-fructose (B) and D-xylose (C) in TBA. _____	63
Figure 3. Effect of temperature on the solubility of D-maltose (A) and sucrose (B) in TBA. _____	65
Figure 4. Pareto chart of standardized effects for variables in the conversion of acrylic acid (%) for production of D-fructose esters. _____	68
Figure 5. Pareto chart of standardized effects for variables in the conversion of acrylic acid (%) for D-glucose esters. _____	69

CAPITULO IV

Figure 1: HPLC of (A) blank experiment, (B) the reaction mixture of the lipase catalyzed esterification of D-fructose in the absence of molecular sieves, after a	
---	--

reaction time of 48 h. Peak assignment: a: D-fructose, b: monoacrylate, c: diacrylate, d: triacrylate, e: acrylic acid, f: *t*-butanol. _____ 83

Figure 2. MALDI-TOF MS of the reaction mixtures of the lipase catalyzed esterifications of D-fructose in the absence of molecular sieves, recorded after a reaction time of 48h. Asterisks indicate peaks from fructose and acrylates. A: in the absence of molecular sieves; B: in the presence of molecular sieves. _____ 87

Figure 3. MALDI-TOF MS of reaction mixtures of lipase catalyzed esterifications of sugars in the absence of molecular sieves, taken after a reaction time of 48h. Asterisks indicate peaks from sugars and acrylates. A: D-glucose; B: D-xylose; C: sucrose; D: Dmaltose. _____ 89

Figure S1. MALDI-TOF MS of reaction mixtures of lipase catalyzed esterifications of sugars in the presence of molecular sieves, taken after a reaction time of 48h. Asterisks indicate peaks from sugars and acrylates. A: D-glucose; B: D-xylose; C: sucrose; D: D-maltose. _____ 93

Lista de Tabelas

CAPÍTULO II

Tabela 1: Quantidade de rejeitos gerados por quilo de produto final, em diferentes setores da indústria química (a coluna central mostra a variação de produção de em diferentes empresas de cada setor). -----	7
Tabela 2: Valores de solubilidade de açúcares em solventes orgânicos descritos pela literatura-----	17
Tabela 3: Valores de solubilidade de sacarose em misturas binárias e ternárias de acordo com Tsavas et al, 2002 a -----	20
Tabela 4: Exemplos de reações catalisadas pelas lipases -----	25
Tabela 5: Algumas vantagens do uso de enzimas em meio reacional orgânico para a síntese de novos compostos -----	26
Tabela 6: Critérios para seleção do solvente orgânico -----	28
Tabela 7: Reações de esterificação e transesterificação dos açúcares com ácido acrílico e metacrílico -----	35

CAPÍTULO III

Table 1: Real values and coded levels used in the factorial _____	56
Table 2. Comparison of n-butanol conversion to butyl acrylate during the enzymatic reaction calculated by the GC peak integration area and by calculating the estequiometric amounts of produced water. _____	57
Table 3. Comparison of types of catalysts and their respective conversions to butanol acrylate. _____	59
Table 4: Solubility of monosaccharides in TBA in the presence and in the absence of acrylic acid (0.67 M). _____	60
Table 5. Solubility of disaccharides in the TBA with 0.67 M of acrylic acid at different temperatures. _____	64

Table 6. Design: real values and coded levels, and response data correspond to the average of duplicate. The responses were conversion of acrylic acid (%) in the esterification of D-fructose (DF) and of D-glucose (DG) after 96h of reaction in an open system. _____ 67

Table 7. Analysis of variance (ANOVA) calculated from the responses given in this table for conversion of acrylic acid from synthesis of esterification D-fructose and D-glucose. _____ 69

CAPÍTULO IV

Table 1. Conversion of sugars in the presence (A) or the absence (B) of molecular sieves, as calculated from HPLC-chromatograms. _____ 82

Table 2. Calculated and observed masses (m/z) of sodiated resp. potassiated molecular ions generated in MALDI-TOF MS of hexoses, pentoses, and corresponding acrylates (A: reaction in the presence of molecular sieves; B: in the absence of molecular sieves) _____ 85

Table 3. Calculated and observed masses (m/z) of sodiated resp. potassiated molecular ions generated in MALDI-TOF MS of disaccharides, and corresponding acrylates (A: reaction in the presence of molecular sieves; B: in the absence of molecular sieves). _____ 86

NOMENCLATURA

Å:	angstrom
AA:	ácido acrílico ou acrylic acid
A _w :	water activity ou atividade de água
β-MG:	beta-metilglicosídeo ou beta-methyl glucoside
BA:	butyl acrylate
BuOH:	n-butanol
C:	carbono
CalB:	<i>Candida antarctica</i> lipase B
C _B :	Conversion of n-butanol
CD:	Camada delgada
CG:	Cromatografia gasosa
CLAE:	Cromatografia líquida de alta eficiência
C _w :	Conversion of water
DF:	D-fructose ou D-fructose
DG:	D-glicose ou D-glucose
DMF :	dimethyl formamide
DMSO :	dimethylsulfoxide
Et ₃ N-α-CHCA:	Triethylamine/ α-cyano-4-hydroxycinnamic acid
F – test:	teste de F
g:	grama
GPC:	Gel Permeation Chromatography
h:	hour / hora

HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
i:	initial ou inicial
L:	litro
LC:	Liquid Chromatography
log P:	coeficiente de partição
M :	Maltose
min.:	minuto
MALDI-TOF MS:	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
MS:	Molecular Sieves
m/z:	mass to charge ratio
KF:	Karl Fisher
PLU:	propyl laurate units
rpm:	rotação por minuto
SS:	sem solvente
X:	xilose ou xylose
w _i :	fração mássica
w/v:	weight per volume
TBA:	terc-butanol (port.) / tert-butanol (ingles)

CAPÍTULO I

Introdução

Os termos biocatálise ou biotransformação abrangem os processos em que um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas. Assim, para que possa estabelecer um processo e biotransformação eficazes, é necessária a análise detalhada dos fatores que condicionam o desenvolvimento e a otimização de um processo biotecnológico.

A obtenção de novos biocatalisadores por engenharia genética e o melhoramento da enzima permitem modificar e melhorar as características dos mesmos. A bioconversão inclui a seleção do meio reacional, que pode ser convencional (meio aquoso) ou não-convencional (solventes orgânicos, fluídos supercríticos, sistemas em que não são utilizados solventes orgânicos-fases sólidas, líquidas e gasosas, e fluídos iônicos) e o projeto do reator (AIRES-BARROS, 2003).

No meio aquoso, o uso exclusivo de água como solvente de meios de transformação restringia a gama de aplicações da biocatálise, bem como limitava a produtividade de diversos processos, inclusive os que envolviam substratos hidrofóbicos (AIRES-BARROS, 2003). Neste aspecto conduziu-se a utilização de meios não-convencionais que permitem a solubilização de substratos e/ou processos hidrófobos, levando ao desenvolvimento de processos com produtividade volumétrica elevada; redução de possíveis efeitos inibitórios e/ou tóxicos por parte do substrato e/ou produto, em que o solvente orgânico pode ser selecionado de modo a funcionar como diluente, reduzindo a concentração interfacial e na fase aquosa (por partição) de substratos e/ou produtos; e o equilíbrio da reação, deslocado no sentido do favorecimento de reações de síntese, através de controle de atividade de água (AIRES-BARROS, 2003).

A adição de uma quantidade moderada de solvente orgânico é uma forma direta de aumentar a solubilidade de substrato hidrofóbico e de tornar a reação possível (JOÃO e ZANELLO, 1998; TWEDDEL et al., 1998).

As enzimas, na sua forma nativa, têm sido utilizadas durante décadas nas indústrias de alimentos e mais recentemente vem sendo amplamente aplicada nas indústrias farmacêutica e química. Sua estrutura e modo de ação foram gradualmente elucidados pelos métodos experimentais, tais como o método clássico de raios-X, e mais recentemente pela técnica de ressonância magnética nuclear, RMN, (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000).

A utilização de enzimas representa uma alternativa viável em síntese orgânica convencional devido a algumas vantagens: pode substituir catalisadores químicos tradicionais (ácido sulfúrico, ácido fluorídrico etc.); obtenção de produtos mais puros; condições de pH e temperaturas moderadas que minimizam reações indesejadas quando comparadas aos processos químicos; e a especificidade de enzima, um fator decisivo para a sua aplicação analítica ou industrial (SOULTANI et al., 2001).

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases, E.C. 3.1.1.3) são amplamente distribuídas entre animais, plantas e microorganismos. Elas são usadas nas indústrias de detergentes, óleos, gorduras, alimentos, farmacêutica e cosmética, sendo também utilizadas para catalisar a síntese de ésteres em meio orgânicos (GBEKELOLUWA et al., 1993; CARDENAS et al., 2001; FEVRIER et al., 2001).

A lipase de *Candida antarctica* (CalB) é uma enzima comercial com um grande leque de aplicações industriais, devido aos inúmeros processos aos quais pode ser utilizada, como por exemplo, a síntese de triglicerídeos e a esterificação de álcoois terpenos. A CalB é comercializada na forma livre ou imobilizada sobre suportes sólidos. A CalB SP435, já foi empregada com sucesso na preparação de ácidos S(+)-2-aryl propiônico com efeito antiinflamatório (ARROYO et al., 1999; CLAON e AKOH, 1994).

A síntese de ésteres de carboidratos tem estudado extensivamente pelo método químico e enzimático. O método enzimático tem utilizado para transformações regioseletivas de mono e dissacarídeos sem causar qualquer dificuldade e ser preparado a reações simples (PARK et al., 2004). Ao contrário pelo método convencional (químico), que é complexo resultando baixa regioseletividade dos produtos (YAN, 2001).

Ésteres de carboidratos constituem um importante grupo de surfactantes não-iônicos largamente empregado nas indústrias farmacêuticas, cosméticas, petróleo e alimentos (GBEKELOLUWA et al., 1993; CARDENAS et al., 2001; FEVRIER et al., 2001; YAN, 2001).

Esta tese visou investigar a reação de esterificação direta de carboidratos com o ácido acrílico, em meio orgânico, utilizando a lipase CalB (lipase B de *Candida antarctica*). O ácido acrílico é um dos mais importantes intermediários na indústria de polímeros, componentes de alta qualidade, sendo produzidas em milhões de toneladas por ano e em contínua expansão. Como o ácido acrílico e seus derivados compõem um dos grupos de compostos químicos mais comercializados atualmente pelas indústrias químicas, escolhemos estudar a formação de um novo grupo de derivados, os acrilatos de carboidratos, em virtude de serem muito abundantes, terem preço acessível, tal como a sacarose, e se originarem de fontes renováveis de matéria-prima.

Para o desenvolvimento deste projeto fez-se um prévio estudo da capacidade de esterificação pela lipase em meio orgânico, sua tolerância a estes reagentes e ao solvente e a capacidade de esterificação do ácido acrílico. Foram também avaliados métodos analíticos para os reagentes e produtos, por cromatografia gasosa, cromatografia líquida e por espectrometria de massas. As análises foram baseadas na conversão de cinco açúcares, inclusive o de sacarose, como doador acila numa mistura com ácido acrílico em meio orgânico catalisado pela lipase CalB.

Este trabalho permitiu a expansão de uma nova linha de pesquisa de síntese de compostos de química fina catalisada por enzimas em dois laboratórios

da Faculdade de Engenharia Química: o Laboratório para Estudo de Processos de Adsorção e Catálise e no Laboratório de Engenharia Bioquímica. Proporcionou também aprendizado no emprego de síntese enzimática em meio não convencional, atualmente com diversos outros pós-graduandos, e serviu de base para conhecimento de novos materiais obtidos parcialmente de fontes renováveis.

Objetivo Geral

- O objetivo geral do presente trabalho foi uma ampla investigação da reação de esterificação direta de carboidratos com o ácido acrílico, em meio orgânico, utilizando a lipase CalB (lipase B de *Candida antarctica*).

Objetivos específicos

- Investigar a capacidade da enzima CalB na reação de esterificação entre o ácido acrílico e o n-butanol bem como a tolerância da enzima aos reagentes da mistura reacional;
- Estudar a solubilidade dos carboidratos em terc-butanol e o efeito da temperatura na solubilização de: D-glicose, D-frutose, D-xilose, sacarose e D-maltose;
- Investigar as condições de temperatura, massa de enzima e razão molar (açúcar: ácido acrílico) para a reação enzimática direta de esterificação, em meio orgânico, entre os monossacarídeos (D-glicose, D-frutose e D-xilose) e os dissacarídeos (sacarose e maltose) e ácido acrílico, sendo os carboidratos os receptores de grupos acil pela enzima CalB
- Maximizar as condições reacionais para aumento da conversão enzimática dos carboidratos em ésteres de ácido acrílico, utilizando a enzima imobilizada em terc-butanol;
- Avaliar os métodos analíticos cromatografia líquida de alta eficiência e MALDI TOF MS para o acompanhamento da reação direta de esterificação enzimática de carboidratos e ácido acrílico em meio de terc-butanol.

CAPÍTULO II

Revisão da literatura

1. Química sustentável

A química tem uma grande participação nos dias atuais nos inúmeros produtos fundamentais à humanidade e sua presença se destaca desde os diversos combustíveis aos mais complexos medicamentos. Porém, a produção química também gera inúmeros inconvenientes, entre eles a formação de rejeitos. Esses subprodutos são encaminhados a uma unidade de tratamento, encarregada de adequar sua composição aos parâmetros estabelecidos pelas leis de proteção à saúde e ao meio ambiente.

Atualmente, novas terminologias foram incorporadas ao vocabulário químico visando expressar a preocupação ambiental.

O termo “química verde” (Green Chemistry) está mais relacionado a questões da sustentabilidade agrícola e da terra, procura resolver esse problema pelo planejamento e adoção de medidas que reduzam a própria geração de rejeitos, mas sem desconsiderar a importância do tratamento dos efluentes e da destinação adequada aos resíduos químicos ainda tóxicos (incineração, depósito em aterro sanitário, etc.) (SANSEVERINO, 2002).

A Biotecnologia Industrial, também denominada “biotecnologia branca”, trata do desenvolvimento de processos e produtos que possam substituir aqueles convencionais, utilizando vias biológicas, tais como a microbiana enzimática, para a produção de produtos de química fina, materiais ou combustíveis a partir de fontes renováveis e sustentáveis. Buscam também a redução da emissão de

efluentes e redução de gastos energéticos e a sustentabilidade. Dentre as áreas de pesquisa, tem-se destacado nos últimos anos o emprego de catalisadores sólidos com o propósito de maximizar as reações reduzindo a formação de subprodutos indesejáveis durante o processo reacional, facilitar a sua separação do produto final e minimizar a emissão de contaminantes nos efluentes; e a reciclagem dos reagentes e dos catalisadores empregados no processo, promovendo um melhor aproveitamento dos materiais de partida (LAANE, 2005).

Na indústria farmacêutica e agroquímica a preparação de complexas moléculas biologicamente ativas envolve, geralmente, diversas etapas, com rendimentos baixos. Em alguns casos o volume do produto final equivale a apenas 10% do volume das matérias-primas iniciais da reação, o que implica na geração de grande quantidade de rejeitos. Estudos sobre o volume de rejeitos gerados para cada quilo de produto final obtido no processo – como os realizados pelo químico Roger A. Sheldon, da Universidade de Tecnologia de Delft (Holanda), em 1994 – mostram que essa relação varia muito em cada setor da indústria química (Tabela 1) (SANSEVERINO, 2002).

Tabela 1: Quantidade de rejeitos gerados por quilo de produto final, em diferentes setores da indústria química (a coluna central mostra a variação de produção em diferentes empresas de cada setor).

<i>Setor industrial</i>	<i>Toneladas de produto</i>	<i>Kg de rejeito/kg de produto</i>
Refino do petróleo	1 a 100 milhões	Cerca de 0,1
Indústria química de base	10 mil a 1 milhão	Menos de 1 a 5
Química Fina	100 a 10 mil	5 a 50
Farmacêutica	10 a milhares	25 a mais de 100

Fonte: SANSEVERINO, 2002.

1.1 Presença brasileira

O Brasil também apresenta pesquisadores que se aventuram na direção de um desenvolvimento sustentável da química. Na revista científica direcionada a esta linha de pesquisa, *Green Chemistry*, a participação brasileira no desenvolvimento da ciência verde já foi registrada. Pesquisas brasileiras na área de desenvolvimento de catalisadores sólidos (que apresentam a grande vantagem de sua reutilização, com o objetivo de aumentar o rendimento da reação e diminuir a formação de subprodutos), podem ser encontradas na literatura científica corrente. Estratégias de desenvolvimento de sistemas de fluxo seqüencial para a diminuição do uso de reagentes, através do seu tratamento e reciclagem on-line também têm sido desenvolvidas por nossa química nacional. A modificação de produtos comerciais tornando-os substancialmente menos tóxicos também é um dos destaques da ciência brasileira nesta filosofia de pesquisa, sendo reconhecida internacionalmente pelo jornalismo científico. O ancoramento de substâncias quelantes em matrizes sólidas para a remoção de contaminantes de solventes é outra linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida. A modificação de procedimentos sintéticos para o aumento do rendimento das reações, e eliminação de solventes orgânicos usados durante os processos, tem sido um dos caminhos percorridos pela nossa química (PRADO, 2003).

2. Ácido acrílico e acrilatos

O ácido acrílico ou ácido 2-propenóico é um composto químico ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$), ácido carboxílico insaturado simples com dupla ligação e grupo carboxila ligado no seu C3 (Fig.1). Quando em forma pura, o ácido acrílico é límpido, incolor e com odor característico de ácido. É miscível em água, álcoois, éteres e clorofórmio. O ácido acrílico é produzido a partir de propileno, um subproduto de gás de refinaria de petróleo (Fig . 2).

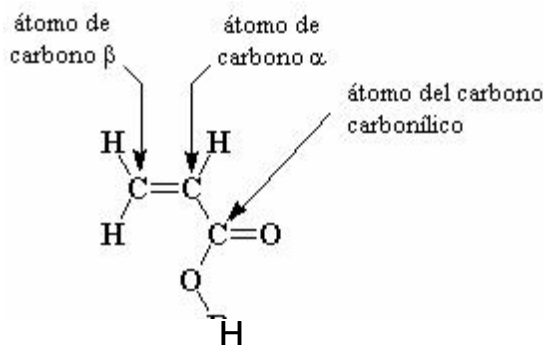


Figura 1: Estrutura química de ácido acrílico.

O ácido acrílico é um produto químico de considerável valor comercial (preço médio de importação e exportação no Brasil, 1,02 e 2,05 US\$/kg líquido (ALICE web, 2006), respectivamente (1996 a 2006)), que juntamente com as derivadas aminas e ésteres são os principais materiais utilizados na fabricação dos produtos poliméricos.

A produção de ácido acrílico em 2003 foi de 4,2 milhões de toneladas (CHEMICAL, 2005) e seus derivados, os acrilatos (e.g. coberturas, adesivos), têm o consumo global de 52%, enquanto que em comonômeros, polímeros superabsorventes têm 32% de consumo global (PASTER, PELLEGRINO E CAROLE, 2003).

O polímero acrilato mais simples é o poliácido acrílico, que absorve grandes quantidades de água, sendo usado como matéria prima na fabricação de absorventes.

Resinas acrílicas são tradicionalmente utilizadas em tintas e revestimento. Os polióis acrílicos são obtidos pela copolimerização de monômeros acrílicos convencionais, como acrilatos de etila ou butila, ácido acrílico, metacrilato de metila ou estireno e com monômeros acrílicos hidroxilados como os acrilatos de 2-hidroxietila ou 4-hidroxibutila. O poliácido de metila é um látex branco à temperatura ambiente e é utilizado na fabricação de elastômeros e adesivos,

enquanto que o polimetacrilato de metila é um plástico duro, resistente e transparente, conhecido comercialmente como vidro acrílico ou *plexiglass*.

Numerosas são as suas aplicações industriais de ácido acrílico como nos recobrimentos de superfícies, produtos têxteis, adesivos, no tratamento de papel, polimentos, couro, fibras, detergentes e materiais super absorventes.

A elevada hidrofiliçidade do ácido acrílico se deve ao grupo carboxílico, capaz de esterificar com o grupo hidroxila de açúcares, além da presença de grupo vinila que pode ser polimerizado (PARK et al, 2004a).

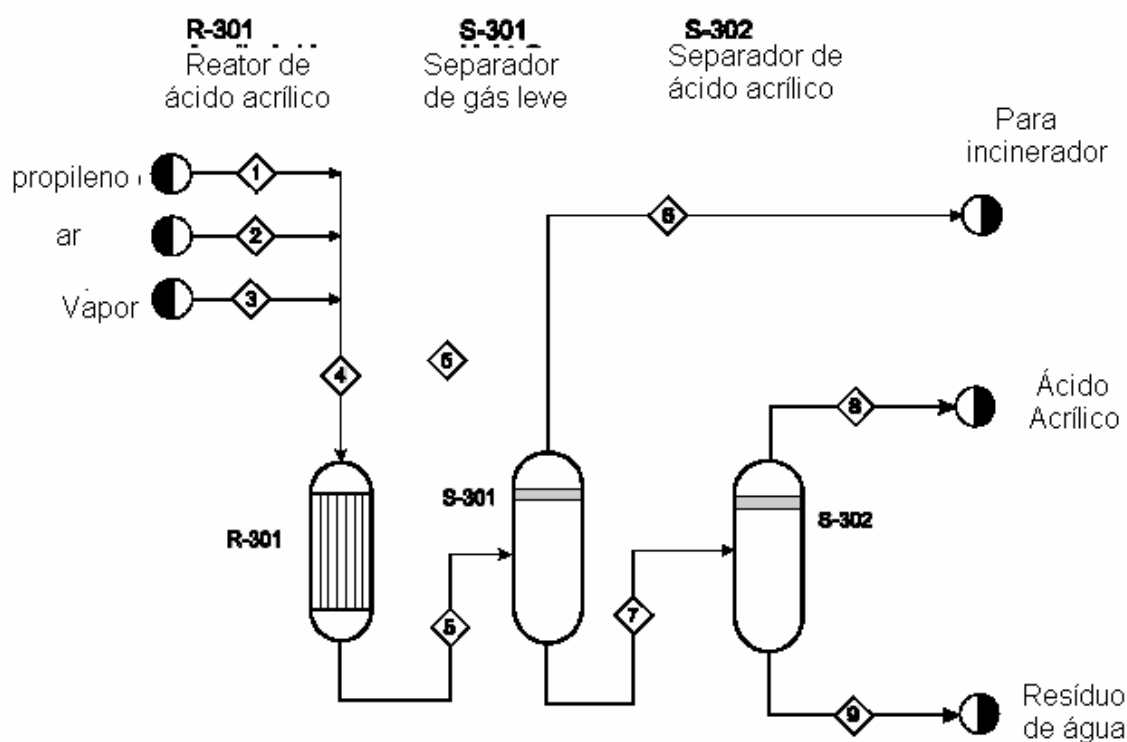


Figura 2: Diagrama simplificado de processo de escoamento para produção de ácido acrílico (WVU, 2006).

Um estudo recente, tratou da possibilidade de produção microbianas do ácido acrílico, ajustando diversas rotas metabólicas ou poderia ser introduzidas nas células por engenharia genética. Este estudo aparte ainda os principais

dificuldades termodinâmicas e cinéticas de obtenção de ácido acril/acrilato por fermentação (STRAATHOF et al, 2005).

3. Carboidratos e classificação de mono- e dissacarídeos

Os carboidratos (também chamados *sacarídeos*, *glicídios*, *oses*, *hidratos de carbono* ou *açúcares*), biomoléculas mais abundantes na natureza, são definidos, quimicamente, como poli-hidróxi-cetonas (cetoses) ou poli-hidróxi-aldeídos (aldoses), ou seja, compostos orgânicos com pelo menos três carbonos onde todos os esses possuem uma hidroxila, com exceção de um, que possui a carbonila primária (grupo aldeídico) ou a carbonila secundária (grupo cetônico). São moléculas que desempenham uma ampla variedade de funções, entre elas:

- Fonte e ou reserva de energia
- Estrutural
- Matéria prima para a biossíntese de outras biomoléculas.

Possuem fórmula empírica $C_n(H_2O)_m$ desde os mais simples (os monossacarídeos, onde $n = m$) até os maiores (com peso molecular de até alguns milhões de daltons). Outros carboidratos, entretanto, possuem em sua estrutura nitrogênio, fósforo ou enxofre não se adequando, portanto, à fórmula geral.

Os carboidratos mais simples são denominados monossacarídeos, possuindo pelo menos um átomo de carbono assimétrico que caracteriza a região denominada centro quiral, pois fornece isômeros ópticos. Possuem de 3 a 8 carbonos, sendo denominado, respectivamente, trioses, tetroses, pentoses, hexoses, heptoses e octoses.

Os monossacarídeos de ocorrência natural mais comum, como a ribose (5C), glicose (6C) (Fig. 3), frutose (6C) (Fig. 4), xilose (Fig.5) e manose (6C), existem como hemiacetais de cadeia cíclica (e não na forma linear), quer na

formas de furanose (um anel de 5 elementos, menos estável) ou de piranose (um anel de 6 elementos, mais estável) (MORRISON e BOYD, 2005).

A forma cíclica (hemiacetal) resulta da reação intramolecular entre o grupamento funcional (C1 nas aldoses e C2 nas cetoses) e um dos carbonos hidroxilados do restante da molécula (C4 na furanose e C5 na piranose), ocorrendo nas formas isoméricas α e β (cis ou trans), conforme a posição da hidroxila do C2 em relação à hidroxila do C1. Tais formas são interconvertidas por mutarrotação (MORRISON e BOYD, 2005).

Os carboidratos formam compostos pela união de duas ou mais moléculas de monossacarídeos, sendo classificados como dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos.

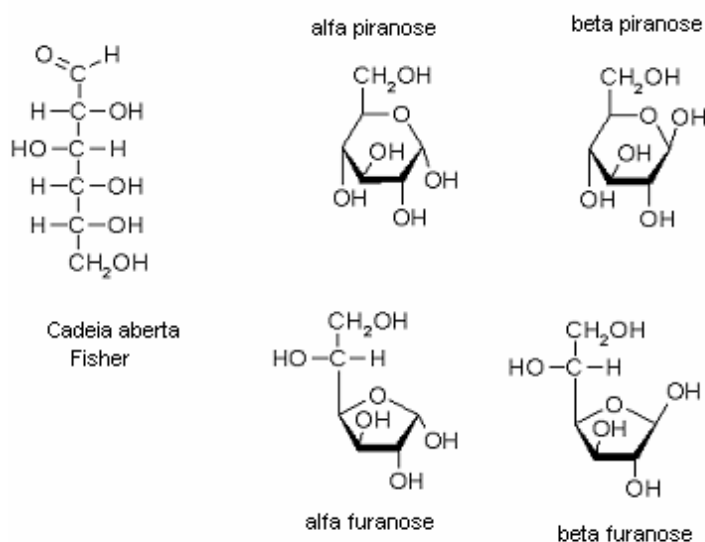


Figura 3: Estrutura glicose em modelo Fisher e em cíclicos (STEVE, 2006).

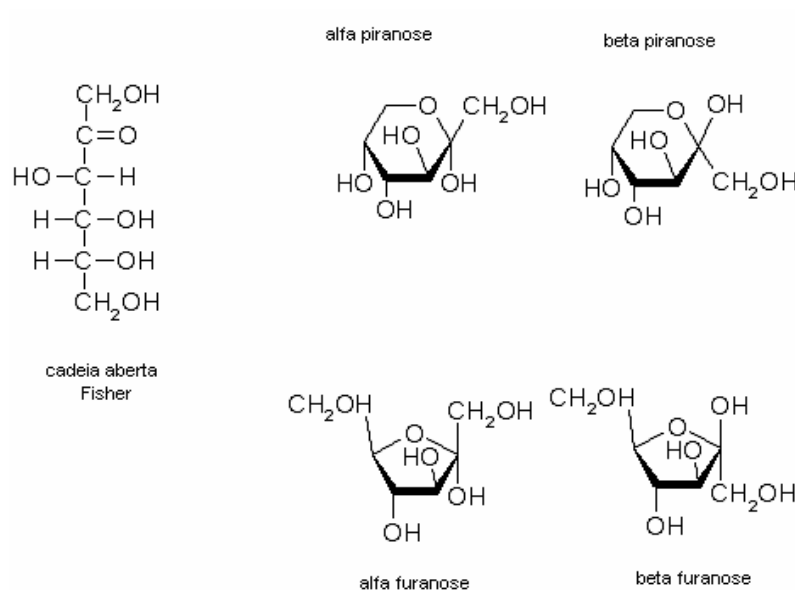


Figura 4: Estrutura de frutose em estrutura Fisher e em cíclicos (STEVE, 2006).

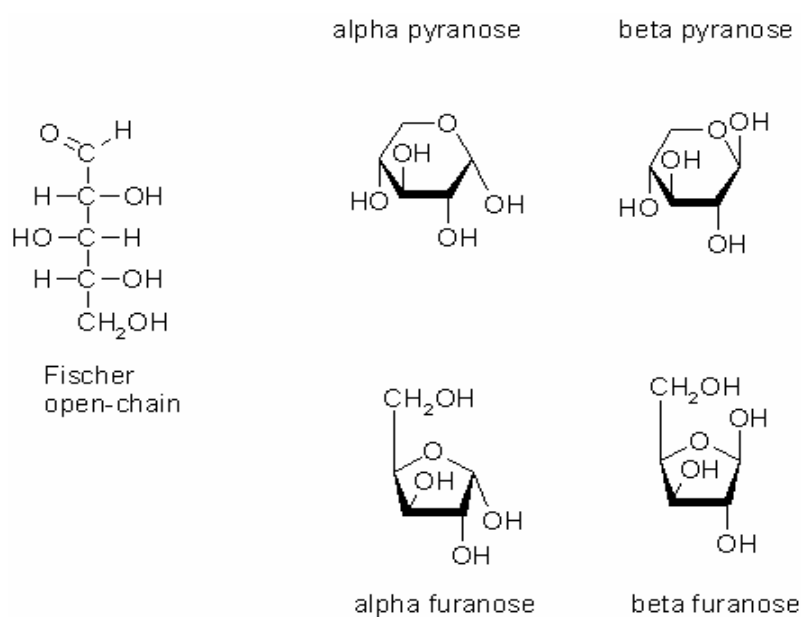


Figura 5: Estrutura de xilose em estrutura Fisher e em cíclicos (STEVE, 2006).

Os dissacarídeos são formados por duas unidades de monossacarídeos unidas por ligação covalente (Fig.6). Por hidrólise a molécula do dissacarídeo produz duas moléculas de monossacarídeos. Existem vários dissacarídeos presentes nos alimentos, como, por exemplo:

Maltose $\alpha(1 - 4)$ e a Iso-maltose $\alpha(1 - 6)$: duas moléculas de glicose e estão presente no malte (maltose) e são subproduto da digestão do amido e glicogênio (iso-maltose);

Lactose glicose + galactose $\beta(1 - 4)$: é o principal carboidrato do leite;

Sacarose: glicose + frutose $\alpha(1 - 2)$, sendo a forma mais comum de açúcar, obtida da cana-de-açúcar.

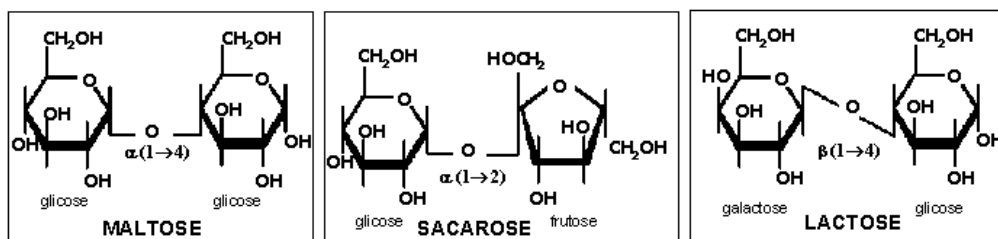


Figura 6: Estruturas dos respectivos dissacarídeos: maltose, sacarose e lactose.

3.1 Solubilidade de açúcares em solventes orgânicos

Sabe-se que os carboidratos apresentam baixa solubilidade, ex. 0,079 de glicose em etilmetilcetona a 60 °C (YAN, 2001) em solventes orgânicos. Para que ocorram altas taxas de conversões reacionais, é necessário que os carboidratos estejam dissolvidos no meio reacional e por esta razão a escolha de um solvente polar torna-se mais desejável. Porém, é bom ressaltar que nem todos os solventes polares são ideais para as reações de esterificação. Solventes polares que contém

grupos hidroxilas, como por exemplo, o glicerol e outros álcoois, podem competir com o substrato. Outros como piridina e dimetil formamida são altamente tóxicos e não devem ser utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêuticas ou que pretendam reduzir a emissão de rejeitos indesejáveis.

Janssen et al. (1991) estudaram a esterificação enzimática de carboidratos (D-sorbitol, D-glicose monohidratada e sacarose) em presença do co-solvente orgânico polar 2-pirrilidona ($\log P = -0,32$). Este co-solvente é utilizado nas indústrias e não é corrosivo, apresenta uma boa estabilidade química e é miscível em um grande número de solventes como, por exemplo, água, etanol, clorofórmio e benzeno. Segundo Carrea et al (citado por JANSSEN et al., 1991), uma maneira de melhorar a solubilidade dos carboidratos em solventes orgânicos é pela acetilação dos carboidratos. Os carboidratos acetilados são solúveis em benzeno, tolueno, clorofórmio, acetona e dioxano.

Oguntimein, Endmann e Schmid, 1993 e Park et al., 2004 relataram que muitos carboidratos são solúveis em terc-butanol, acetona, acetonitrila e outros tipos de solventes. Porém, nenhum desses autores especificou a concentração de açúcares e suas temperaturas.

Foi observado que a velocidade da reação de esterificação ou transesterificação enzimática pela lipase entre os açúcares (dissacarídeos) e os componentes orgânicos (ácidos graxos, butanoato de etila) depende da solubilidade destes compostos, no solvente orgânico (OOSTEROM, RANTWIJK e SHELDON, 1996), sendo que, quanto mais solúvel o açúcar, mais rápida a reação. A solubilidade dos dissacarídeos é determinada pela energia de retículo cristalino e pela energia de solvatação. Entretanto, estes autores consideram a energia de solvatação desprezível em solvente de polaridade média, devido à similaridade da estrutura com o carboidrato. O ponto de fusão, que é uma medida aproximada de energia de cristal entrelaçada, varia entre 98 °C (para trealose.2H₂O) até a decomposição de lactose.H₂O a 204 °C. Este comportamento indicou uma ampla faixa de solubilidade dos dissacarídeos que reflete na extensão da conversão enzimática. Assim, melhores rendimentos da esterificação serão

obtidos com carboidratos com baixas energias de retículo cristalino. Outra técnica para melhorar a solubilidade dos carboidratos que esses pesquisadores utilizaram foi a reação de esterificação enzimática em terc-butanol sob refluxo. A conversão de sacarose após 24 horas de reação sob refluxo foi de 18%, muito acima do 1% obtido a 40 °C sem refluxo. Esta conversão foi ainda aumentada até 40% com pequenas outras alterações. Entretanto a lactose, mesmo sob refluxo, foi considerada pouco reativa e não foi possível diminuir a cristalinidade da mesma. Maltose e trealose foram convertidas quase totalmente em condições de refluxo no mesmo solvente. A eficiência da reação de esterificação da maltose aumentou 5,6 vezes em refluxo do que inicialmente a 40 °C e o mono éster foi preferencialmente formado. Para trealose, este aumento foi de apenas 1,3 vezes, com predominância do diéster 6,6. Para aumentar a solubilidade de sacarose no solvente terc-butanol, foi utilizada a reação em ácido butanóico, um doador mais polar do grupo acila que o butanoato de etila. O mesmo grupo de pesquisadores observou que a transição do estado amorfo da sacarose para o estado cristalino pode ser mais rápida do que a velocidade de reação de esterificação, e assim, técnicas para diminuir a cristalinidade da sacarose podem não funcionar tão bem como o desejado.

Arcos, Bernabé e Otero (1998a) determinaram as solubilidades dos açúcares e seus ésteres em acetona numa solução saturada a 5°, 22° e 40 °C e observaram que a solubilidade da glicose era 0,44 mM ($0,079 \text{ g L}^{-1}$) a 22 °C. Os mesmos pesquisadores observaram que a solubilidade do açúcar pode ser o fator limitante para esterificação de frutose, mas que pode ser revertida, pois a permanente conversão da frutose em éster facilita a solubilização de maiores quantidades da frutose em acetona.

Degn et al. (1999) estudaram a solubilidade de açúcares (glicose, maltose e maltotriose) na reação com ácido láurico a 45 °C em terc-butanol. Eles obtiveram $13,4 \pm 0,5 \text{ mM}$ de glicose ($2,41 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$), $5,8 \pm 0,3 \text{ mM}$ ($2,09 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$) de maltose e $3,1 \pm 0,2 \text{ mM}$ ($1,56 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$) de maltotriose.

A Tabela 2 descreve estudos sobre solubilidade de carboidratos utilizando diferentes tipos de solventes orgânicos com suas respectivas temperaturas, descritos por diferentes autores.

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

Solvente (meio orgânico)	Açúcar	Temp. (°C)	Conc. (g.L⁻¹)	Autor
2-metil-2-butanol	Frutose	55	10	SCHECKERMANN et al, 1995
2-metil-2-butanol	α -glicose	60	2,6	FLORES et al, 2002
		30	0,6	TSAVAS et al, 2002.
		40	1,06	
		60	2,40	
		80	6,83	
		102	9,00	
Acetona	β -D(+) glicose	25	0,14	YAN, 2001.
		40	0,21	
		60	0,348	
Etil-metil-acetona	β -D(+) glicose	25	0,06	
		40	0,07	
		60	0,079	
		75	0,11	
Terc-butanol (TBA)	Maltose	45	4,32	PEDERSEN et al, 2002.
	Sacarose		1,4	
TBA: piridina (9:11)	Maltose		77,5	
	Sacarose		9,2	
TBA	β -D(+) glicose	60	3	CAO, BORNSCHEUER e SCHMID, 1999.
Reação de mistura de TBA e ácido láurico.	Glicose	45	13,4	DEGN et al, 1999.
	Maltose		5,8	
2-metil-2-butanol	Frutose	60	11	CHAMOULEAU et al, 2001.
Acetona	Frutose	5	0,22	ARCOS, BERNABÉ e OTERO, 1998.
		22	0,39	
		40	0,82	
	Glicose	22	0,08	ARCOS, BERNABÉ e OTERO, 1998. e 1998a.

Yan (2001) observou em seus experimentos que os açúcares (β -D(+)-glicose e D-glicose) eram insolúveis em dióxido de carbono, butanol, hexano, e propanol. Somente a acetona e o etilmetilcetona foram usados para a síntese de éster de ácido graxo de açúcar, pois esses eram capazes de solubilizar quantidades suficientes de glicose, mas quantidade limitada de palmitato de glicose.

Tsavas et al. (2002) mediram a solubilidade de D-glicose em meios orgânicos. Eles consideraram que um importante fator para este estudo era o equilíbrio entre os anômeros α e β , que pode ser particularmente lento. Deste modo, concentração dissolvida total continua a aumentar lentamente por algumas horas, após uma ascensão rápida inicial. Eles observaram que a solubilidade da β -glicose amorfa era maior do que a correspondente forma cristalina no solvente 2-metil-2-butanol. A adição de dimetil sulfóxido (DMSO) aumentou a solubilidade da glicose naquele solvente bem como a presença de ésteres destes açúcares, enquanto que a presença de ácidos graxos diminui a solubilização da glicose no mesmo solvente. Foi observado também que o ácido acético é um melhor solvente para glicose que o ácido propiônico e que a β -glicose é mais solúvel que a α tanto no estado cristalino como no amorfo em 2-metil-2-butanol.

Flores et al. (2002) utilizaram o excesso de β -glicose em 2-metil-2-butanol e obtiveram a solução de concentração de 17,9 mM ($3,22 \text{ g L}^{-1}$), 23% maior do que a encontrada com a α -glicose cristalina. A elevada solubilidade de D-glicose aponta para uma alta taxa de reação inicial ($12 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Os mesmos autores verificaram que a reação realizada por 24 horas a 102°C e resfriada para 60°C em condições de refluxo e excesso de D-glicose sólida em 2-metil-2-butanol, produziu uma solução supersaturada com concentração de 50 mM ($9,01 \text{ g L}^{-1}$) (300% maior que a solubilidade de glicose).

Pedersen et al. (2002) verificaram que a solubilidade de maltose aumentou de 12 mM para 215 mM quando o meio da reação foi alterado de terc-butanol para terc-butanol:piridina (9:11). Foi também observado que a solubilidade

da sacarose aumentou de 4 mM ($1,37 \text{ gL}^{-1}$) para 27 mM ($9,25 \text{ gL}^{-1}$) quando o meio da reação foi alterado de terc-butanol pra terc-butanol:piridina (9:11).

De acordo com Tsavas et al. (2002), a cinética e equilíbrio da reação de esterificação ou transesterificação são influenciados pela termodinâmica da reação da mistura, contendo açúcar, ácidos graxos, ésteres, água e solvente orgânico. As interações de solvatação nesta mistura são também importantes para o projeto de processos de separação para a purificação dos produtos. Estes autores construíram uma base de dados, determinando a solubilidade da sacarose em várias misturas. A Tabela 3 descreve estudo de solubilidade sacarose utilizando misturas binárias e ternárias de álcool, ácido, éster e água a diferentes temperaturas (30 e 60 °C) descritas por Tsavas et al. (2002a). Esses autores observaram que a solubilidade de sacarose na mistura de terc-pentanol ($w_{\text{terc-pentanol}} = 0,6997$) com água ($w_{\text{água}} = 0,3003$) foi $196,8 \text{ gL}^{-1}$ a 30 °C, o qual foi aumentado em quatro vezes quando comparado com a solubilidade apenas em terc-pentanol puro.

Tabela 3: Valores de solubilidade de sacarose em misturas binárias e ternárias de acordo com Tsavas et al, 2002 a.

Solvente (meio orgânico)		Temp. (°C)	Conc.
	Frações mássicas		(g.L ⁻¹)
Terc-pentanol (1) + água (2)	w ₁ = 0,9980; w ₂ = 0,0020.	30	0,21
	w ₁ = 0,9802; w ₂ = 0,1980.		0,96
	w ₁ = 0,9487; w ₂ = 0,5130.		1,85
	w ₁ = 0,9980; w ₂ = 0,0020.	60	0,42
	w ₁ = 0,9801; w ₂ = 0,1990.		1,78
	w ₁ = 0,9488; w ₂ = 0,5120.		2,90
Ácido propiônico (1) + água (2)	w ₁ = 1,000; w ₂ = 0,0000.	30	0,3 gL ⁻¹
	w ₁ = 0,8004; w ₂ = 0,1996.		135,2 gL ⁻¹
	w ₁ = 0,6997; w ₂ = 0,3003.		196,8 gL ⁻¹
Ácido octanóico (1) + terc-pentanol (2)	w ₁ = 0,4002; w ₂ = 0,5998.	60	0,27 gL ⁻¹
	w ₁ = 0,3006; w ₂ = 0,6994.		0,31 gL ⁻¹
	w ₁ = 0,1008; w ₂ = 0,8992.		0,39 n ⁻¹
Acetato de metila (1) + água (2)	w ₁ = 1,000; w ₂ = 0,0000. (a)	40	3,40 mg L ⁻¹
	w ₁ = 1,000; w ₂ = 0,000. (b)		3,57 mg L ⁻¹
	w ₁ = 0,9800; w ₂ = 0,02. (b)		4,89 mgL ⁻¹
	w ₁ = 1,000; w ₂ = 0,0000.(b)	50	9,17 mg L ⁻¹
	w ₁ = 1,000; w ₂ = 0,0000.(a)	59	17,10 mg L ⁻¹
	w ₁ = 0,9750; w ₂ = 0,0250.(a)	65	78,70 mg L ⁻¹
Acetato de etila (1) + água (2)	w ₁ = 0,9875; w ₂ = 0,0125.	40	3,63 mg L ⁻¹
	w ₁ = 1,0000; w ₂ = 0,0000.	50	3,21 mg L ⁻¹
	w ₁ = 0,9850; w ₂ = 0,0150.		9,87 mg L ⁻¹

Metodologias analíticas: (a) CLAE; (b) Enzimática.

4. Esterificação

A esterificação direta tem a vantagem de ser uma síntese em uma única etapa (MORRISON e BOYD, 2005). A reação entre álcoois e ácidos graxos livres é a reação inversa da hidrólise do acilglicerol correspondente. A relação entre as

velocidades da reação direta (esterificação) e da reação inversa (hidrólise) é usualmente controlada pelo conteúdo de água do meio reacional (CARVALHO et al, 2003).

O grau de esterificação é altamente dependente das condições de reação, em especial do conteúdo de água reacional, para que a hidrólise seja evitada. A adição de solventes orgânicos no meio tem sido usada como forma de impedir a hidrólise e aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos, tornando viável a reação de esterificação (CARVALHO et al., 2003).

A reatividade dos álcoois e ácidos carboxílicos na esterificação depende do impedimento estérico de ambos. Desta forma, as esterificações com ácidos ou álcoois terciários são lentas, a velocidade diminui na seguinte ordem (MORRISON e BOYD, 2005; HOYDONCKX et al., 2004):



A força ácida do ácido carboxílico tem um efeito menor na taxa da reação de esterificação.

5. Lipases

As lipases (triacilglicerol acilidrolases E.C. 3.1.1.3) ocorrem naturalmente em animais, plantas e microorganismos e atuam preferencialmente na interface óleo-água.

As lipases microbianas têm um grande potencial para aplicação industrial, devido a sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade de substratos. Uma grande quantidade de lipases obtida de fungos filamentosos foi estudada tanto do ponto de vista bioquímico quanto do genético, sendo que os melhores microorganismos produtores são os dos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*,

Aspergillus e *Rhizomucor* (SANCHEZ et al., 2000; FEVRIER et al., 2001; KIRAM e DIVAKAR, 2001). Existe também um grande número de lipases produzidas por leveduras, sendo a mais importante a do gênero *Candida*, bastante utilizadas em processos biotecnológicos (CARDENAS et al., 2001, CARDENAS et al., 2001a). As lipases têm sido amplamente utilizadas na hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos e são também empregadas em síntese em meio orgânico (TWEDDELL et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2001). Apesar da grande quantidade de lipases microbianas descritas, apenas alguns tipos apresentam adequada estabilidade e capacidade biossintética, permitindo, desta forma, o seu uso em reações orgânicas, e conseqüentemente são consideradas enzimas de importância industrial. A aplicação de diferentes técnicas de imobilização de enzimas introduziu consideráveis melhorias na eficiência de reações de esterificação. Alguns parâmetros tais como a atividade de água e log P (coeficiente de partição óleo/água), bem como o uso de solventes opticamente ativos também trouxeram importantes contribuições para melhoria do rendimento da reação e a seletividade de lipases (CARDENAS et al., 2001; LAANE, BOEREN E VEEGER, 1987).

5.1 Lipase de *Candida antartica* (CalB)

Lipases possuem diversas aplicações industriais, tais como na tecnologia de óleo, em detergentes, na indústria alimentícia e na indústria orgânica e de químicas finas. De fato, as lipases estão entre as enzimas mais utilizadas em biocatálise na química orgânica e na indústria. Estas enzimas são em geral estáveis e ativas em solventes orgânicos e podem ter ampla especificidade para substratos, muitas vezes combinada com alta regio e esteraseletividade.

5.1.1 Estrutura e origem

CalB é uma proteína globular com uma prega de alfa/beta hidrolase. É formada por 317 aminoácidos e sua massa molar é 33 kDa. Esta lipase foi

produzida inicialmente pela levedura *Candida antarctica* e possui dois componentes: A e B, como foi observado pelos pesquisadores Michiyo (1988), Hoegh et al. (1995) e Rotticci et al. (1998). Como o nome indica, a cepa foi originalmente isolada na Antártica, em um estudo com objetivo de encontrar enzimas com propriedades extremas (extromofílicas). A lipase A é cálcio dependente, altamente termoestável e ativa de maneira não-específica com relação a triglicerídeos. De fato, esta lipase tem preferência única sobre o grupo éster sn-2 e tem baixa atividade em éster simples. A lipase B é pouco menos termoestável, porém cálcio independente. É menos ativa para triglicerídeos de cadeia longa, mas muito ativa sobre a cadeia longa de ésteres, de amidos e de tiols (ANDERSON, LARSSON e KIRK, 1998). CalB foi clonada e expressada em grande quantidade em *Aspergillus oryzae* e patenteada pela Novo Nordisk (ROTTICCI, 2000), atualmente conhecida como Novozyme.

5.1.2 Mecanismo de reação e cinética

CalB é uma serina hidrolase e o seu mecanismo de reação hidrolítica pode ser caracterizado como um “ping-pong”. A reação ocorre em duas etapas: na primeira etapa, a enzima é acetilada pelo substrato 1 para formar um intermediário acil-enzima e o produto 1 é liberado; na segunda etapa, a enzima acetilada é então deacetilada pelo substrato 2, formando o segundo produto (Fig. 7.; ROTTICCI, 2000).

CalB pode aceitar vários tipos de doadores-acila, tais como: ésteres, ácidos, tioésteres, carbonatos e carbamatos (ROTTICCI, 2000).

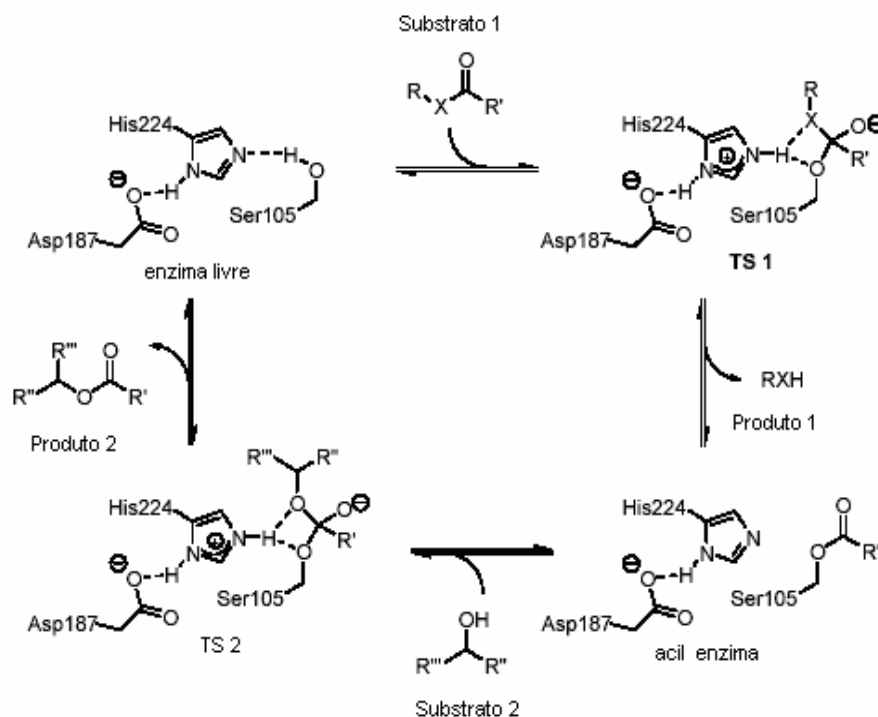


Figura 7. Mecanismo catalítico de lipases baseado na “tríade catalítica” de serina (nucleófilo), histidina e aspartato ou glutamato (ROTTICCI, 2000).

5.2 Reações catalisadas pelas lipases

A função biológica das lipases é a catálise das hidrólises de ésteres, especialmente de triacilglicerídeos de cadeia longa para produzir ácidos graxos, mono- e di-acilglicerol e glicerol. As lipases são capazes de catalisar a reação reversa, executando a esterificação, transesterificação (acidólises, interestificação, alcóólises), aminólises, oximólises, tiotransesterificação em solventes orgânicos anidros, sistemas bifásicos e em solução micelar com especificidade quiral (VILLENEUVE et al., 2000). O equilíbrio da reação direta e da reação reversa é controlado pela atividade de água na mistura de reação. Muitas aplicações industriais são encontradas nas misturas racêmicas, indústria têxtil, detergente,

sínteses farmacêuticas, entre outras. A Tabela 4 apresenta as principais reações catalisadas pelas lipases.

Embora sua função seja quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições micro-aquosas, como por exemplo, a formação de ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos. Estes dois tipos de reações básicas podem ser combinadas numa seqüência lógica para efetuar reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes empregados (OLIVEIRA et al., 2001).

Tabela 4: Exemplos de reações catalisadas pelas lipases (VILLENUEVE et al., 2000).

Hidrólises	
$R_1\text{-CO-OR}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow$	$R_1\text{-CO-OH} + R_2\text{-OH}$
Síntese de Éster	
$R_1\text{-CO-OH} + R_2\text{OH} \longrightarrow$	$R_1\text{CO-OR}_2 + \text{H}_2\text{O}$
Acidólises	
$R_1\text{-CO-OR}_2 + R_3\text{-CO-OH} \longrightarrow$	$R_3\text{-CO-OR}_2 + R_1\text{-CO-OH}$
Interestificação	
$R_1\text{-CO-OR}_2 + R_3\text{-CO-OR}_4 \longrightarrow$	$R_3\text{-CO-OR}_2 + R_1\text{-CO-OR}_4$
Alcoólise	
$R_1\text{-CO-OR}_2 + R_3\text{OH} \longrightarrow$	$R_1\text{-CO-OR}_3 + R_2\text{OH}$
Aminólises	
$R_1\text{-CO-OR}_2 + R_3\text{NH}_2 \longrightarrow$	$R_1\text{-CO-NHR}_3 + R_2\text{OH}$

6. Catálise enzimática em meio orgânico e seleção de solventes orgânicos adequados

As enzimas têm assumido grande importância para catálise nos setores alimentar, de diagnósticos, farmacêutico e demais indústrias. Considerando o ambiente lipofílico de determinados componentes da célula (ex. membranas), não nos supreende o fato de enzimas poderem atuar em meio orgânico não-aquoso.

As principais vantagens do emprego de enzimas em meio reacional orgânico para a síntese de novos compostos estão descritas na Tabela 5 (PEDERSEN, 2002).

Tabela 5: Algumas vantagens do uso de enzimas em meio reacional orgânico para a síntese de novos compostos (PEDERSEN, 2002).

-
1. Favorece o equilíbrio termodinâmico da reação de síntese ao invés hidrólise;
 2. Reações competitivas dependentes de água são desfavorecidas;
 3. Especificidade do substrato pode ser alterada;
 4. Enzimas podem ser recuperadas por operações simples de centrifugação ou filtração;
 5. As enzimas podem exibir maior termoestabilidade.
-

Além disso, um solvente orgânico ideal pode dissolver consideravelmente o substrato favorecendo a reação sem afetar a atividade enzimática. Se a solubilidade do produto for baixa, isto evita que ocorra a reação irreversível (YAN, 2001).

Aires-Barros (2003) observou alguns principais critérios que devem ser considerados para a escolha de um solvente orgânico (Tabela 6), onde se incluem critérios físico-químicos, biológicos, de segurança, logísticos e econômicos. Do ponto de vista físico-químico, os aspectos mais importantes são os coeficientes de partição, capacidade de solubilização dos reagentes e/ou produtos, etc.

Laane et al. (1987) observaram que dentro de uma regra geral para otimização dos diferentes sistemas biocatalíticos em solventes orgânicos, o coeficiente logarítmico de partição, $\log P$, pode ser considerado uma medida quantitativa de polaridade de solvente. Estes autores recomendam a seguinte classificação para a escolha de solventes empregados em catálise enzimática:

1. solventes com $\log P < 2$, o sistema biocatalítico é baixo devido a alta polaridade podendo ocorrer a inativação ou denaturação de catalisador;

2. moderados para solventes de $2 < \log P < 4$;
3. altos para $\log P > 4$, solventes apolares.

Sabe-se que existem poucos solventes orgânicos reconhecidos como seguros pelas autoridades sanitárias para serem usados em processos industriais como por exemplo, em alimentos. O terc-butanol (TBA) não está incluído nas listas de permissão para uso como solvente na preparação de alimentos nem como aditivo de alimentos. No entanto, o uso desse álcool como solvente se deve ao fato de o mesmo não ser utilizado como substrato e de ter capacidade de solubilizar alguns mono e dissacarídeos permitindo maiores concentrações que outros solventes. Os estudos dos pesquisadores PARK et al., 2004; PARK e CHANG, 2000; OOSTEROM, RANTWIJK e SHELDON, 1996, mostraram que apesar do $\log P$ de TBA ser menor que 2 ($\log P$ 0,73), a enzima lipase não era inativada, contrariando a indicação de Laane et al. (1987).

Yan (2001) verificou que apesar dos solventes butilacetato, etilacetato, metilacetato, metanol, etanol e 2-propanol serem permitidos para uso na manufatura de produtos alimentícios pelas autoridades sanitárias alemãs, eles não podem ser utilizados como meio reacional para síntese de éster de ácido graxos de açúcar por atuarem com inibidores competitivos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina quais solventes orgânicos são permitidos nas aplicações em alimentos e cosméticos (incluídos no Anexo I).

Tabela 6: Critérios para seleção do solvente orgânico (AIRES-BARROS, 2002):

Físico-químicos
- capacidade para solubilização do substrato e do produto;
- coeficiente de partição (log P);
- densidade;
- pontos de fusão e de ebulição;
- tensão superficial;
- viscosidade.
Biológicos
- Toxicidade para o biocatalisador.
Segurança
- Toxicidade;
- Inflamabilidade.
Logísticos
- Facilidade de obtenção;
- Eliminação de resíduos.
Econômicos
- Custo.

6.1 Escolha de solventes para reação enzimática

Na literatura encontram-se vários trabalhos sobre a síntese de carboidratos utilizando uma variedade de solventes (JANSSEN et al., 1991; KHALED et al., 1991; SCHLOTTERBECK et al., 1993; OGUNTIMEIN, ERDEMANN e SCHMID, 1993; WARD, FANG, LI, 1997; SOULTANI et al., 2001). Nas reações de esterificação enzimática de carboidratos, um fator preponderante está na escolha do solvente.

Oguntimein, Erdmann e Schmid (1993) utilizaram a *Candida* e *Mucor miehei* imobilizadas em síntese de ésteres de frutose (e glicose) a partir de ácido esteárico no meio TBA a 40 °C com rendimento de 10 a 24% do produto. Já na

presença de ácido organoborônico (que é solúvel em açúcar formando o complexo boronato de carbono), obtiveram alta produtividade de éster de glicose, formado após 24 horas de reação.

A partir das condições ótimas da reação de esterificação, os pesquisadores Cao et al. (1997) utilizaram os solventes com baixo valor de log P: acetona (log P 0,30) e dioxano (log P -1,1) e na mistura de doadores de acilas de cadeias longas (C₁₂ a C₁₈) foram catalisados com Novozym SP 435 (CalB). Neste estudo, foi obtido o produto palmitato de 6-O-β-D(+) glicose com 86% de conversão de β-D-glicose com ácido palmítico após 48 h de reação. Em meio TBA (log P 0,93), os mesmos autores observaram 57% de conversão nos experimentos contendo peneira molecular na reação.

Park et al. (2004) estudaram diferentes solventes para a reação de esterificação entre β-metilglucosídeo e ácidos. Foram utilizados os solventes: dioxano (log P -1,10), acetonitrila (log P -0,33), acetona (log P -0,23), terc-butanol (log P 0,80) e t-alcool amílico (log P 1,3). Entretanto, melhores conversões de β-MG foram obtidas utilizando os solventes com maiores valores de log P, sendo o terc-butanol escolhido como o melhor.

6.2 Razão Molar (açúcar e ácido orgânico)

Schlotterbeck et al., (1993) analisaram a monoacilação de frutose catalisada pela lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme 1M60) utilizando a reação de ácido esteárico, frutose, ácido fenilborônico (agente solubilizante) e hexano. Foi estudada a razão molar entre frutose/ácido fenilborônico. Os resultados obtidos mostraram que a razão de 1:1 apresentou melhor rendimento do produto.

Patil, Dordick e Rethwisch (1996) estudaram a transesterificação de acrilato de sacarose a partir de sacarose diluída em meio piridina anidra contendo acrilato de vinila (razão molar de 1:1,1 (açúcar: acrilato de vinila)) e Optimase M440 a temperatura ambiente durante 3 dias. A formação do éster foi monitorada

por cromatografia em camada delgada em placa sílica. Rendimentos de 56 e 31% foram obtidos para mono e diacrilato.

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

Torres e Otero (2001) estudaram a esterificação enzimática direta entre ácido láctico com ácidos graxos (razão molar 10:1), catalisada com Novozym 435 a 60°C e peneira molecular em meio n-hexano. Após quatro dias de reação, eles observaram que o melhor resultado foi de 55% de rendimento de formação de 2-lactato de O-caproila.

Pedersen et al. (2002) estudaram a reação de esterificação entre ácido graxo de C-4 a C-12 e açúcares, catalisada pela CalB de *Candida antarctica* em meio reacional de mistura de dos solventes 9:11 de terc-BuOH e piridina ($v v^{-1}$).

Pereira et al. (2003) estudaram a síntese de monolaurina conduzida pela esterificação direta entre ácido láurico e glicerol, em ausência de solvente. Lipase comercial imobilizada (Lipozyme IM 20) foi adicionada aos reagentes orgânicos, em reator batelada aberto com agitação constante. Foi observado conversão de 75% em produto com seletividade de 60% para monolaurina, utilizando se razão molar ácido láurico/glicerol igual a 1, temperatura de 55 °C e concentração de enzima de 3,0% ($p p^{-1}$).

6.3 Efeito de peneira molecular sobre esterificação de açúcares

Arcos, Bernabé e Otero (1998) estudaram a influência de água contida no meio sobre a seletividade da reação de esterificação entre a frutose e o ácido oléico, durante 6 horas de incubação. O conteúdo nas reações destas misturas foi: frutose (60 mg), ácido oléico (480 mg), lipase Novozym 435 (100 mg) e 2 mL de acetona sob agitação a 200 rpm e 60 °C. Na ausência de peneira molecular (4 Å)

foram observados maiores rendimentos de monoéster (58%), entretanto, o acúmulo de água formada conduziu a interrupção da reação após 6 horas, quando somente 75% da frutose inicial haviam sido convertidas em diéster ou o monoéster, mesmo nos experimentos em que excesso de ácido graxo foi empregado (cinco vezes). Os mesmos autores concluíram que a alta razão molar de diéster em relação à monoéster encontrada na presença de peneira molecular poderia ser atribuída à redução de atividade de água na solução reacional e redução da solubilidade da frutose devido à baixa hidratação do meio.

Otto et al. (2000) descreveram um experimento contendo mistura equimolar de glicose e ácido palmítico em TBA, à 60 °C sob 250 rpm de agitação, contendo lipase livre ou imobilizada (CalB) e pequena quantidade de peneira molecular (3 Å). Após 24 horas de incubação foram obtidos 84% de 6-O-palmitato de glicose.

Charmouleau 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 pela lipase *Candida antarctica* imobilizada (5 g L⁻¹) 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 velocidade inicial (4,9 g L⁻¹.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 afetada.

Torres e Otero (2001) observaram reduções nos rendimentos de éster aumentando a quantidade de peneira molecular (4Å) de 100 para 600 mg na reação de esterificação entre ácido láctico e ácido caprílico em hexano. Foi sugerido que uma possível causa para este efeito seria que a peneira molecular utilizada teria adsorvido, além da água, uma porção de ácido láctico.

Flores et al. (2002) utilizaram a peneira molecular (4Å) para remover a água produzida durante a reação enzimática entre α e β -glicose e ácido dodecanóico no solvente 2-metil-2-butanol. Eles observaram redução da solubilização da glicose em 2-metil-2-butanol na presença de peneira molecular. Quanto ao sistema reacional na presença de peneira molecular, um produto

apenas (monoéster) foi formado, com 70% de rendimento. Apesar da diferença de solubilidade entre a α -glicose cristalina e da glicose supersaturada, quando o sistema tinha a água removida pela peneira molecular, a conversão final dessas reações era similar.

Zhang et al. (2003) desenvolveram um método para predição de conversão de equilíbrio para a síntese de mono acil hexose com ácidos graxos, catalisada por lipase e contendo peneira molecular 3Å 1/16 ou 4Å 1/16 em meio 2-metil-2-propanol. Eles observaram a formação de diéster foi facilitada durante a reação, com a remoção de água no meio reacional.

Para os pesquisadores Park e seus colaboradores (2004), a adição de peneira molecular na reação de esterificação entre β -metilglicosídeo e ácido metacrílico promoveu efeito oposto ao esperado. Segundo eles, ao se reduzir a quantidade de água, a formação do complexo enzima-substrato foi inibida. A adição de 2% (p v⁻¹) de zeólita à reação promovia a redução da conversão final de 72,3 para 60%, bem como da velocidade inicial, de 118 para 102 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$. No entanto, na reação de esterificação de β -metilglicosídeo e ácido acrílico, parâmetros cinéticos diferentes foram obtidos, pois, mesmo com alta velocidade inicial (397 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) a conversão final foi menor, especialmente quando 0,5 e 1,5% de zeólita foram adicionadas, promovendo a redução da conversão para 57,1 e 46,3 %, respectivamente, indicando que a peneira molecular não deveria ser mais utilizada nos experimentos seguintes.

6.4 Lipases, ácido acrílico e carboidratos

De todos os trabalhos analisados da literatura até o presente momento, não foram verificados processos de síntese de esterificação direta do ácido acrílico com carboidratos utilizando lipases em meio orgânico. No entanto foi encontrada a patente alemã da empresa BASF (WO 03/042227 e US 2006/0035341) que descreve a síntese enzimática de acrilatos de açúcar. Nesta

patente foram mencionados vários tipos de açúcares, tanto mono- como dissacarídeos, porém a descrição detalhada dos exemplos relata somente os processos de esterificação de β -metilglicosídeo em meio terc-butanol (WO 03/042227) e/ou meio acetona (US 2006/0035341) catalisada pela lipase CalB. A literatura descreve trabalhos de transesterificação utilizando acrilato de vinila ou acrilato de etila com carboidratos (PARK et al., 2004; PARK et al., 2004a; CHAN e GANEM, 1993; PARK e CHANG, 2000) e menciona o uso de acrilatos de açúcares para aplicação em biomedicina. Espera-se também que estes ésteres de açúcares sejam eficientes monômeros com alta hidrofiliabilidade e biocompatibilidade (PARK et al., 2004a) para posterior polimerização. A Tabela 7 descreve os principais trabalhos relacionados a este tema.

Martin et al. (1992) estudaram a obtenção de 1'acrilato de sacarose utilizando a protease alcalina de *Bacillus sp* como catalisadora. O produto formado foi polimerizado em poli (acrilato de sacarose) através da reação convencional por radicais livres. Diversas lipases foram testadas, sendo a melhor aquela produzida por *Pseudomonas cepacia* para formação de acrilato de galactose, posteriormente polimerizado e caracterizado: $M_w = 135\ 000$ e $M_n = 58\ 000$ ($M_w/M_n = 2,3$). Este polímero é solúvel em água, DMF e DMSO e é bastante higroscópico.

Patil, Dordick e Rethwish (1996) sintetizaram o 1'acrilato de sacarose com Optimase M440 (*Bacillus licheniformis*) a partir de sacarose dissolvida em piridina e acrilato de vinila. Eles obtiveram 87% de conversão da frutose após 3 dias a temperatura ambiente. Após o processo de purificação, foi obtido o 1'acrilato de sacarose puro e este foi polimerizado formando o poli (acrilato de sacarose).

Na reação de transesterificação, Park e Chang (2000) utilizaram a protease comercial Optimase M-440 (obtida de *Bacillus licheniformis*) em concentração de 100 g L^{-1} , no meio reacional, contendo sacarose (1M) com acrilato de vinila (4M), em piridina anidra. O rendimento desse método de obtenção de acrilato de sacarose foi acima de 90% de sacarose convertida em 24 horas de reação. Após 5 dias de reação foram obtidos 70% (mol mol^{-1}) de monoacrilato de sacarose e 30% (mol mol^{-1}) de diacrilato de sacarose,

determinados pela cromatografia gasosa usando a coluna capilar 10 m (Alltech AT-1) empacotada com polidimetil siloxana.

Park et al. (2004) investigaram a esterificação enzimática de β -metilglicosídeo (β -MG) com ácido acrílico (AA), utilizando razão molar de 1:15 (açúcar:ácido) e lipase. Novozym 435 no solvente terc-butanol (escolhido previamente como melhor solvente) à 50 °C. Foram obtidas 60 g L⁻¹ de acrilato de β -MG. Máxima conversão em produto foi obtida para esterificação de β -MG com ácido acrílico e com ácido metacrílico: 59,3% e 71,3%, respectivamente. Atividade de água (A_w) durante a reação foi determinada e os autores observaram valores de A_w entre 0,275 a 0,475 ao longo da reação de esterificação entre o β -MG e AA. Os autores sugeriram que o valor de A_w de 0,275 era o mínimo necessário para a manutenção da atividade enzimática.

Tabela 7: Reações de esterificação e transesterificação dos açúcares com ácido acrílico e metacrílico:

Enzima	Reagentes	Solvente	Razão molar (ácido:açúcar)	Método analítico	Tratamento para retirada de água	Rendimento da conversão (%)	Ref. Bibliográfica
Pseudomonas cepacia (lipase P)	Acrilato de vinila + β -D-galactosídeo de metila	Piridina	1:8,5	CLAE (coluna carboidrato(Nova-Pak, 250 mm x 4.6 mm, Waters).	—	De β -D-galactosídeo de metila – 92%	MARTIN et al., 1992.
Subtilisin Carlsberg	Metacrilato de vinila + sacarose	N,N-dimetilformamida (DMF)	1:1,1	GPC (coluna SHODEX (8mmx300mm)	—	-Mono – 42%.; -Diester – 5% de rend.	CHAN e GANEM, 1993.
Optimase M440 (Bacillus licheniformis)	Acrilato de vinila + sacarose	Piridina	1: 1,1	Camada Delgada	—	- Mono – 56 %; - Diester – 31%	PATIL, RETHWISCH e DORDICK, 1996.
Optimase M440 (Bacillus licheniformis)	Acrilato de vinila + sacarose	Piridina	1:0,2	CG (coluna capilar 10 m Alltech AT-1))	—	- Mono – 70 %; - Diester – 30% (mol.mol ⁻¹).	PARK e CHANG, 2000.
CalB -Novozym 435	Acrilato de vinila /metacrilato de vinila + β -metilglicosídeo (β -MG)	TBA	1:3	CLAE (coluna carboidrato(Nova-Pak, 250 mm x 4.6 mm, Waters).	—	De β -MG – 100%	KIM et al., 2004.
CalB -Novozym 435	Ácido metacrilato/acrílico + β -metilglicosídeo (β -MG)	TBA	1:15	CLAE (coluna carboidrato(Nova-Pak, 250 mm x 4.6 mm, Waters).	Peneira molecular (3 Å, em pó).	– β -MG com AA e PM: 50 mg – 57,1; 100 mg- 53,4; 150 mg – 50,6; 200 mg - 46,3% – β -MG com MAA e PM: 50 mg –69,2; 100 mg –65,3; 150 mg- 64,2; 200 mg- 60,0%.	PARK et al., 2004.

Tabela 7 (cont.): Reações de esterificação e transesterificação dos açúcares com ácido acrílico e metacrílico:

Enzima	Reagentes	Solvente	Razão molar (ácido:açúcar)	Método analítico	Tratamento para retirada de água	Rendimento da conversão (%)	Ref. Bibliográfica
CalB -Novozym 435	Ácido metacrilato/ acrílico + β - metilglicosídeo (β -MG)	TBA e sem solvente (SS)	1:15	CLAE(coluna carboidrato(Nova- Pak, 250 mm x 4.6 mm, Waters).	—	β -MG com AA e: -TBA– 57,9 $\pm$ 0,98 -SS– 52,5 $\pm$ 3,36% β -MG com MAA e: -TBA– 72,8 $\pm$ 3,56 -SS –64,3 $\pm$ 1,74%	PARK et al., 2004a.

6.4.1 Purificação de acrilato de carboidratos

Após a formação dos produtos mono e diacrilatos de sacarose pela reação de transesterificação, os pesquisadores Patil, Dordick e Rethwisch (1996) retiraram primeiramente a enzima por centrifugação. O sobrenadante (solvente orgânico) foi vaporizado a 35 °C sob pressão reduzida e o material formado foi analisado e os compostos isolados por cromatografia em coluna “flash” de sílica gel foram: sacarose, 1-acrilato de sacarose e 6,1-diacrilato de sacarose. O material puro resultante após secagem a frio foi 1,8 g (36% de rendimento) de 1-acrilato de sacarose.

Park e Chang (2000) purificaram os ésteres acrilato de sacarose por cromatografia sílica gel. Mono e diacrilato de sacarose foram obtidos com rendimento de 55 e 70%. —

Park et al. (2004) removeram a lipase após o final da esterificação e extraíram os produtos com o mesmo volume de hexano que o volume da mistura reacional, por uma hora. A seguir o solvente foi vaporizado a 60 °C, sob pressão reduzida e o material formado foi re-extraído com hexano. O rendimento do produto isolado, metilglicosídeo, não foi descrito neste trabalho.

6.5 Inibição de lipases por ácidos e demais compostos orgânicos.

Janssen et al. (1991) investigaram a síntese enzimática de ésteres de carboidratos no solvente 2-pirrolidina. Esses pesquisadores observaram que a 2-pirrolidina em concentrações acima de 3M inibiam a produção de éster, catalisada pela inativação da lipase de *Chromobacterium viscosum*.

Ácido acético em concentrações de 0,2M inibiu a lipase de *C. antarctica*. (BOUSQUET et al., 1999). Foi observado que este ácido também pode competir pela água necessária para a atividade enzimática da lipase, podendo retirá-la da mesma. Observou-se também a reversão da reação de esterificação pela lipase pelo mecanismo de hidrólise do produto recém-formado.

De acordo com Cao, Bornscheuer e Schmid (1999), a atividade da CalB é reduzida na presença de ácidos graxos de cadeia curta. Eles observaram que ácido palmítico e o esterárico não inibiam a atividade desta lipase, mas ácidos graxos com cadeias mais curtas, tal como o ácido cáprico, provocou a perda de 30% da atividade após 24 horas de reação de esterificação. Os mesmos autores verificaram que acetona promovia a perda de 50% da atividade desta lipase em TBA .

Soultani et al. (2001) observaram que maiores teores de ácido graxo (razão molar de 1:5 entre o açúcar e o ácido) no meio reacional provocavam a redução do rendimento de conversão de ácido graxo. Segundo os autores, a inibição de CalB era devida à alta concentração de ácido ou devido à limitação de concentração de frutose no meio.

—

7 Referências bibliográficas

AIRES-BARROS, M.R. Biocatálise em solventes orgânicos. *Boletim Biotecnologia*, www.google.com.br. Acesso em 8 out. 2003.

ALICE WEB. Disponível em: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/default.asp>. Acesso em: 07 jun. 2006.

ANDERSON, E.M., LARSSON, K.M., KIRK, O. One biocatalyst – many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 16, p.181-204, 1998.

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.

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

ARROYO, M., SÁNCHEZ-MONTEIRO, J.M., SINSITERRA, V. Thermal stabilization of immobilization lipase B from *Candida Antarctica* on different supports: effects of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 3-12, 1999.

BOUSQUET, M.-P., WILLEMOT, R.-M., MONSAN, P., BOURES, E. Lipase-catalyzed α -butylglucoside lactate synthesis in organic solvent for dermo-cosmetic application. *Journal of Biotechnology*, v. 68, p. 61-69, 1999.

CAO, L., FISCHER, A., BORNSCHEUER, U.T., SCHMID, R.D. Lipase-catalysed solid phase synthesis of sugar fatty acid esters. *Biocatalysis and Biotransformation*, 14, p. 269-283, 1997

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

CARDENAS, F., DE CASTRO, M. S., SANCHEZ-MONTERO, J. M., SINISTERRA, J. V., VALMESEDA, M., ELSON, S. W., ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reaction in organic media, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 145-154, 2001.

CARDENAS, F., ALVAREZ, E., DE CASTRO, M. S., SANCHEZ-MONTERO, J. M., VALMESEDA, M., ELSON, S. W. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 14, p. 111-123, 2001a.

CARVALHO, P.O., CAMPOS, P. R. B., NOFFS, M. D., OLIVEIRA, J. G., SHIMIZU, M. T., SILVA, D. M. "Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados". *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

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

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

CHEMICAL MARKET REPORTER. Disponível em: <
<http://www.chemicalmarketreporter.com>>, 11 April 2005. Acesso em: 10 jun. 2006.

- CLAON, P.A., AKOH, C.C. Effect of reaction parameters on SP435 lipase catalyzed synthesis of citronellyl acetate in organic solvent. *Enzyme Microbiological Technology*, v.16, p. 835-853, 1994.
- DENG, P., PEDERSEN, L., DUUS J., ZIMMERMANN W. Lipase-catalysed synthesis of glucose fatty acid esters in tert-butanol. *Biotechnology Letters*, v.21, p. 275-280, 1999.
- FLORES, M.V., NARAGHI, K., ENGASSER, J.M., HALLING, P. J. Influence of glucose solubility and dissolution rate on the kinetics of lipase catalyzed synthesis of glucose laurate in 2-methyl-2-butanol. *Biotechnology and Bioengineering* , v. 78. issue 7, p. 815-821, 2002.
- FEVRIER, P., GUÉGAR, P., YVERGNAUX, F., CALLEGARI, J. P., DUFOSSÉ, L., BISSET, A. Evaluation of regioselectivity of lipase based on synthesis reaction conducted with propyl alcohol, isopropyl alcohol and propylene glycol, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 445-453, 2001.
- GBEKELOLUWA, B.O., ERDAMANN, H., SCHMID, R.D. Lipase catalysed synthesis of sugar ester in organic solvents. *Biotechnology Letters*, v. 15, n. 2, p. 175-180, 1993.
- HOEGH, I., PATKAR, S., HALKIER, T., HANSEN, M.T. Two lipases from *Candida antarctica* cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Canadian Journal Botanical*, v. 73, (suppl. 1), p.869-875, 1995.
- HOYDONCKX, H. E., VOS, De E. D., Chavan, S. A., Jacobs, P. A. Esterification and transesterification of renewable chemicals. *Topics in Catalysis*, v. 27, p. 83 – 96, 2004.
- JANSSEN, A.E.M.; KLABBERS, C.; FRANSSEN, M.C.R., VAN'T RIET, K. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters in 2-pyrrolidone. *Enzyme and Microbial Technology*, v.13, p. 565-571, 1991.

JOÃO, J. J., ZANELLO, C. R. Utilização de enzimas em meio orgânico, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, p. 32-36, 1998.

KATCHALSKI-KATZIR, E., KRAEMER, D.M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potencial. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 10, p. 157-176, 2000.

KHALED, N.; MORTET, D.; PINA, M.; GRAILLE, J. Fructose oleate synthesis in a fixed bed reactor. *Biotechnology Letters*, v. 13, nº 03, p. 167-172, 1991.

KIM, J., HAAM, S., PARK, D.-W., AHN, I.-S., LEE, T.G., KIM, H.-S., KIM, W.-S., "Biocatalytic esterification of β -methylglucoside for synthesis of biocompatible sugar-containing vinyl esters.", *Chemical Engineering Journal*, v. 99, p. 15-22, 2004.

KIRAN, K. R., DIVAKAR, S. Lipase catalyzed synthesis of organic acid esters of lactic acid in non-aqueous media, *Journal of Biotechnology*, v. 87, p. 109-121, 2001.

LAANE, C. White biotechnology: Europe on the move. Presentation *Renewable Resources and Biorefineries, Ghent, Belgium, 19-21 September, 2005*

LAANE, C., BOEREN, S., VOS, K., VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 30, p. 81-87, 1987.

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

MICHIYO, I. POSITIONALLY NON-SPECIFIC LIPASE FROM *CANDIDA* SP., A METHOD FOR PRODUCING IT, ITS USE AND A RECOMBINANT DNA PROCESS FOR PRODUCING IT., *European Patent* N° 0287 634, 1988.

MORRISON, R., BOYD, R. *Química Orgânica*, Tradução de M. Alves da Silva. 14^a edição, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005, Cap. 19: Ácidos Carboxílicos, p. 809-850.

OGUNTINEIN, G. B.; ENDMANN, H.; SCHMID, R. D. Lipase catalysed synthesis of sugar ester in organic solvents. *Biotechnology Letters*, v. 15, p 175-180, 1993.

OLIVEIRA, A. C.; ROSA, M.F.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid – a kinetic study, *Journal of Molecular Catalysis 13: Enzymatic*, v.11, p.999 – 1003, 2001.

OOSTEROM, M. W., RANTWIJK, F., SHELDON. Regioselective Acylation of Dissaccharides of tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* Lipase. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p.328- 333, 1996.

OTTO, R. T., SCHEIB, H., BORNSCHEUER, U. T., PLEISS, J., SYLDATK, C., SCHMID, R. D. Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 8, p.201–211, 2000.

PASTER, M., PELLEGRINO, J.L, CAROLE, T.M. Industrial Bioproducts: Today and Tomorrow. Washington D.C., jul. 2003. Disponível em: <
http://webdev.its.iastate.edu/webnews/data/site_biorenew_reading/30/webnewsfilefield_file/Industrial-Bioproducts-2003.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2006.

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

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

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, D. W., HAAM, S., KIM, H.S., KIM, W.S. Chemoenzymatic synthesis of sugar-containing biocompatible hydrogels: Crosslinked poly-(β -methylglucoside acrylate) and poly-(β -methylglucoside methacrylate), *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, vol. 71, n. 3, p.497-501, 2004a.

PEDERSEN, N.R., WIMMER, R., EMMERSEN, J., DEGN, P., PEDERSEN, L.H. Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalysed esterification of disaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 337, p. 1179-1184, 2002.

PEREIRA, C.C.B., LISBOA, J. S., SILVA, M.A.P, LANGONE, M.A.P. Síntese enzimática de monolaurina a partir da reação de esterificação direta entre ácido láurico e glicerol. ANAIS DO 12º CONGRESSO BRASILEIRO DE CATÁLISE, p. 790-794, 2003.

PRADO, A. G. S., Química verde, os desafios da química do novo milênio, *Química Nova*, v. 26, n. 5, 2003.

ROTTICCI, D., HÆFFNER, F., ORRENIUS, C., NORIN, T., HULT, K. Molecular recognition of *sec*-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 5, p. 267 – 272, 1998.

ROTTICCI, D. *Understanding and engineering the enantioselectivity of candida antarctica lipase B towards sec-alcohols*. 2000, 61p., Stockholm. Tese (Doutorado).

SANCHEZ, A., VALERO, F., LAFUENTE, J., SOLÁ, C. Highly enantioselective esterification of racemic ibuprofen in a packed bed reactor using immobilized

Rhizomucor miehei, lipase. *Enzyme Microbiological Technology Letters*, v. 27, p. 157-166, 2000.

SANSEVERINO, A. M. Química Verde, uma nova filosofia., **Revista Ciência Hoje**, São Paulo, p. 21-27, Agosto, 2002.

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

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

STEVE. Disponível em: <http://www.steve.gb.com/images/molecules/sugars/>. Acesso em: 08 jun. 2006.

STRAATHOF, A. J.J.; SIE, S.; FRANCO, T.T.; WIELEN, L.A.M. Feasibility of acrylic acid production by fermentation. *Applied Microbiological Biotechnological*, v. 67, p. 727-734, 2005.

TORRES, C.; OTERO, C. PartIII: Direct enzymatic esterification of lactose acid with fatty acids. *Enzymes and Microbial Technology*, v. 29, p. 3-12, 2001.

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

TSAVAS, P., POLYDOROU, S., VOUTSAS, E.C., MAGOULAS, K.G. Sucrose solubility in mixture of water, alcohol, ester and acid. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 47, p. 513-517, 2002a.

TWEDDELL, R. J., KERMASHA, S., COMBES, D., MARTY, A. Esterification and interestification activities of lipase from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in three different types of organic media: a comparative study. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p. 439-445, 1998.

VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J.M., GRAILE, J., HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical physical and molecular biological approaches. *Journal of Moleculara catalysis B: Enzymatic*, v. 9, p.113-148, 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.

WVU- WEST VIRGINIA UNIVERSITY- Disponível em:
<<http://www.che.cemr.wvu.edu/publications/projects/acrylic/acrylic-a.PDF>>. Acesso em: 20 jun. 2006.

YAN, Y. *Enzymatic production of sugar fatty acid esters*. Sttugart: Instituto Tecnológico de Bioquímica, Universidade de Stugart, Alemanha, 2001. Tese (Doutorado).

ZHANG, X., ADACHI, S., WATANABE, Y., KOBAYASHI, T., MATSUNO, R. Prediction of the equilibrium conversion for the synthesis of acyl hexose through lipase-catalysed condensation in water-miscible solvent in the presence o molecular sieve. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 293-297, 2003.

Capítulo III

Neste capítulo é apresentado o estudo de solubilidade de açúcares em t-butanol e a utilização da lipase comercial imobilizada, *Candida antarctica* lipase B (CalB) em reação de esterificação em meio orgânico com ácido acrílico.

A determinação dos parâmetros de solubilidade de açúcares e o uso de lipase em meio orgânico é fundamental para dar a continuidade ao estudo de reação de esterificação direta e obter os produtos de interesse, os acrilatos de açúcares. Os ensaios para solubilidade de açúcares foram realizados em batelada, a temperaturas de 45 a 65°C, e na ausência e presença de ácido acrílico. Para a síntese enzimática foram empregadas temperaturas de 45 a 65°C, razão molar ácido acrílico: açúcar e a massa de CalB, utilizando a técnica do planejamento experimental.

CAPÍTULO III

Direct synthesis of carbohydrate esters using lipase B *Candida antarctica* in tert-butanol.

Tsukamoto, J¹., Valença, G., P.², Franco, T.T^{1*}.

¹. Laboratory of Biochemical Engineering, Department of Chemical Processes, School of Chemical Engineering, State University of Campinas - UNICAMP, Caixa Postal 6066, 13081-970, Campinas-SP, Brazil. LEPAC, Department of Chemical Processes, School of Chemical Engineering, State University of Campinas – UNICAMP.

* To whom correspondence should be addressed.

Abstract

Candida antarctica lipase B (Novozym 435, CalB) was found to be an effective biocatalyst for the enzymatic esterification of carbohydrates in tert-butanol. An experimental factorial design was used to study the effect of temperature, reactants ratio and the amount of enzyme on the production of carbohydrate esters of acrylic acid. The water content was determined by Karl Fisher titration. The solubility of sugars at different temperature was determined in pure tert-butanol (TBA) and in TBA containing acrylic acid (AA). Addition of AA decreased the solubility of D-fructose from 12.69 to 11.2 gL⁻¹ and of D-glucose from 1.32 to 1.27 gL⁻¹ at 45 °C. D-fructose was at least six fold more soluble than D-glucose in TBA. In addition, solubility was strongly dependent on temperature. A similar effect was found for maltose and sucrose. Maltose was at least 48 fold more soluble than sucrose at 45 °C, and this effect was strongly dependent on the temperatures used for solubilization. Amongst all the carbohydrates studied, D-fructose was the most soluble in TBA, almost 20 gL⁻¹ at 65 °C and sucrose was the least soluble, 0.04 gL⁻¹ at 45 °C and 0.34 gL⁻¹ at 65 °C. According to the current literature found, this is the first time that butyl acrylate was produced by an enzymatic esterification reaction, catalyzed by CalB, achieving 94.6% of n-butanol conversion after 8 hours at 55 °C, indicating that the use of this enzyme is adequate for the production of such product. Application of the factorial design allowed the investigation of the esterification of monosaccharide with AA catalyzed by CalB. However, a lack of fit was observed and the F-test regression was neither significant nor predictive. Therefore the experimental design was not capable to describe the influence of response factors.

Key words: enzymatic esterification, lipase, carbohydrates, acrylic acid, CalB, acrylate esters.

1. Introduction

Enzymatic reactions in organic solvents have been studied since the mid 1980's (WARWEL, STEINKE and KLAAS, 1996; KLIBANOV, 1986). Specifically the esterification and transesterification reactions with lipases as biocatalysts have

been one of the reactions most frequently studied (ANDERSON, LARSSON and KIRK, 1998). The use of organic solvents as reaction media has dramatically increased the diversity of enzyme-catalyzed reactions. There are many advantages in using enzymes in organic media, such as an increased solubility of nonpolar substrates and an enhanced thermal stability of enzymes (MURAKAMI, HOSHI and HIRATA, 2003).

The esterification of acrylic acid with an alcohol is achieved commercially by using mineral acid catalysts such as sulfuric acid or hydrofluoric acid. However, mineral acids are toxic, corrosive and often hard to remove from the reaction media (CHEN, XU and OKUHARA, 1999). DUPONT et al. (1995) reported the esterification of acrylic acid with 1-butanol on solid acid catalysis. However this acid-catalyzed esterification needs a high reaction temperature. Enzyme could potentially be used for as catalyst esterification and transesterification at lower temperatures. In addition enzymes can selectively target the primary hydroxyl groups in alcohols.

A suitable organic solvent should dissolve enough substrate to carry out the reaction without affecting the enzyme activity or stability. In addition, the product solubility in the solvent should be as low as possible to facilitate crystallization and favor the reaction to the product (YAN, 2001). It is also known that there are only few organic solvents that are safe to be used in the cosmetic, food and medicinal processing.

Few sugar esters are used in the pharmaceutical, cosmetic, food industries and medicinal area, mainly the fatty acid esters. The synthesis of sugar esters using lipases has been extensively studied by several researchers (GOEDE et al., 1994; COULON et al., 1995; CAO et al., 1997; CAO et al., 1998; ARCOS, BERNABÉ and OTERO, 1998; DEGN and ZIMMERMANN, 2001; PEREIRA et al., 2003, KIM et al., 2004; PARK et al., 2004). Various methods have been studied for enzymatic esterification of sugars with organic acids and different reaction conditions, such as reaction media, amount of enzyme, molar ratio of substrates, initial substrate concentration and temperature (PARK et al., 2004; YAN, 2001).

The reaction is also affected by the carbon-chain length of the acid and temperature (PEDERSEN et al. 2002). However, sugars are insoluble in many organic solvents.

Acrylic acid is a versatile chemical with widespread use in industry. Lipase-catalyzed synthesis of esters of acrylic acid with sugars has been investigated for their biomedical use (PARK and CHANG, 2000). Sugar ester of acrylic acid are expected to be an efficient monomer for sugar containing polymers that are highly hydrophilic and biocompatible (PARK et al., 2004).

Kim et al. (2004) obtained high yields of acrylates when using an excess of the acrylic acid and carbohydrates such as methylglucosides, but did not work with direct esterification of carbohydrates. The optimal initial concentration of β -methylglucoside was 60 g L^{-1} at the optimum temperature of 50°C as determined by the initial rate and final conversion (KIM et al., 2004).

In the present study, the esterification of acrylic acid with n-butanol in toluene on a commercial lipase was studied. In particular, the effect of water on the catalytic activity was studied. The same enzyme was also used to catalyze the esterification of acrylic acid with mono and disaccharides in tert-butanol. A 2^3 factorial experimental design was used to quantify the effects of molar ratio, temperature and amount of enzyme and their interactions on the acrylic acid sugar esters enzymatic synthesis catalyzed by CalB. The solubility of the carbohydrates in TBA at three different temperatures was also studied. TBA was used as the reaction solvent as discussed in previous by Jeong and Park, 2006.

2. Experimental Section

2.1 Materials

2.1.1 Chemicals

CalB (lipase B from *Candida antarctica*, Novozym 435, a non-specific lipase immobilized on a macroporous acrylic acid resin, 10,000 propyl laurate units (PLU) g^{-1}) was kindly provided by Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Denmark). Monosaccharides were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA, batch number

of D-fructose 103K00391, Product n° F2543; D-glucose, batch n° 033K0121, Product n° G7528) and Fluka (Steinheim, Germany, xylose, batch n° 34004272, Product n° 95729). Disaccharides were purchased from Merck (sucrose, Germany, lot K28422551; maltose). Acrylic acid (AA) 99% (contained 0.02% of hydroquinone monomethyl ether) was provided by Aldrich Co. (batch n° 12006MC, Product n° 339741). Toluene was obtained from Carlo Erba Analyticals (batch n° U11639, Product n° 30825, Steinheim, Germany). n-Butanol and tert-butanol (TBA) were purchased from Merck (Germany) and TEDIA (USA), respectively. All the solvents used were dried with molecular sieves 3Å, pearls 2 mm, (Darmstadt, Germany, batch n° 946K13030804, Merck) for 2 days prior to being used.

2.2 Equipment

2.2.1 - Analytical methods

The liquid chromatography system had of a Waters 515 pump, a Waters 717 automatic injector and a Waters 410 differential refractometer detector. Millennium 32 software, version 3.05.01 (Waters Co., Milford, MA, USA) was used to control the system and to process signals. Separation was performed on a Shodex SH1011 column (8x300 mm, 6 µm particle size) connected to a Shodex SH-G guard column (6x50 mm, 10 µm particle size) (SHOWA DENKO KK, Japan) filled with the same phase. The column was kept at 50 °C. The mobile phase was sulphuric acid (0.0005 mol L) at 1 mL min⁻¹ flow rate and the injection volume was 20 µL. Quantification of substrates was based on a calibration curve obtained from standard solutions.

For the n-butanol esterification experiments, gas chromatography was performed on a Varian 3600 CX Gas Chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), manual sample and a split-splitless inlet. Standard capillary GC analysis of n-butanol biotransformation products was performed using a FFAP Cromacon Ciola capillary column (50m x 0.25mm x 0.3 µm). An isothermal method was performed at 80 °C with injector at 250 °C and the FID detector to 250 °C. The mobile phase consisted of the He gas and the flow rate was used 1.7 mL

min⁻¹. Calibration curves were established and used to calculate sample concentrations.

2.2.2 Determination of water content

The water content of the reaction mixture was measured using a Karl Fisher (KF) titrator (701 KF Titrino, 703 Ti Stand, Metrohm, Switzerland) and the water content was automatically calculated by consumption of an organic base in % unit.

3. Methods

3.1 Effect of the amount of lipase on the esterification of acrylic acid with *n*-butanol.

The esterification reaction of AA with *n*-butanol was carried out in glass vials (5 mL) using two different amounts of lipase. The vials were prepared as follow: 200 µL acrylic acid (2.9 mmol), 400 µL *n*-butanol (4.37 mmol), 3.5 mL toluene (32.94 mmol) and 60 or 200 mg lipase CalB.

The vials were maintained at 55 °C in a water bath under 140 rpm. Samples of 1 µL were withdrawn with a microsyringe at different time intervals and injected in the CG-FID. All experiments were made in duplicate.

The conversion of *n*-butanol to butyl acrylate was calculated by the number of moles of butyl acrylate produced:

$$\%C_B = 100 \times \frac{mol_{BA}}{mol_{ButOH}_{initial}} \quad (1)$$

and by the amount of water according to:

$$\%C_W = 100 \times \frac{(mol_{f\ water} - mol_{i\ water})}{mol_{calculated}} \quad (2)$$

where $mol_{i\ water}$ and $mol_{f\ water}$ are the initial and final amounts of water as determined by KF (%) and $mol_{calculated}$ was the amount of water that would be produced for 100% conversion of AA.

3.2 - Determination of the solubility of sugars

Pure TBA: 1 g of solid sugar powder (mono- and disaccharides) was added to 25 mL of TBA in a 50 mL glass-stopped Erlenmeyer flasks. They were stirred on a rotary shaker table at 200 rpm for 48 hours at 45°, 55° and 65 °C. Aliquots of 0.50 mL of the sugar solutions were withdrawn and analyzed by HPLC. The experiments were made in duplicate.

TBA + acrylic acid: 1 g of monosaccharides and 1.15 mL of acrylic acid were added to 25 mL of TBA in a 50 mL glass stopped Erlenmeyer flasks, and the same procedure as C was done. The experiments were made in duplicate. Disaccharides were not use in this experiment.

3.3 Enzymatic esterification of acrylic acid with carbohydrate in TBA

The experiment was carried out according to a 2³ factorial design described in section 4. Twenty five mL were prepared by mixing acrylic acid with sugar dissolved in pure TBA at different sugar to acrylic acid molar ratios. Reactions were started by adding CalB. The mixture was maintained in a glass-stopped Erlenmeyer flask in a water bath shaker at 200 rpm for 48 hours at 55 °C.

Acrylic acid conversion, %C_{AA}, was calculated bas follows

$$100 \times \frac{\text{conc.AA}}{\text{conc.AAi}}, \quad (03)$$

where conc. AA is the concentration of acrylic acid after reaction and concAAi is the initial concentration of AA.

4. Experimental design

A 2³ factorial design with 3 replicates at the central point is depicted in Table 1. Table 1 shows real and the coded values used in the factorial designs. All experiments were made in duplicate. The effect of temperature, amount of enzyme and molar ratio of the reactants, sugar: acrylic acid, on the amount of acrylic esters of carbohydrates was studied. The experimental were carried out at 45°, 55° and 65 °C. The amount of enzyme were 0.7, 1.4 and 2.1 g and the sugar to acrylic

acid molar ratios were 1:1, 1:3 and 1:5. The central point was 55° C, 1.4 g enzyme and 1:3 sugar to acrylic acid molar ratio. Further details are shown in Table 1.

Table 1: Real values and coded levels used in the factorial design.

Design	molar ratio	Coded level for molar ratio	Temp. °C	Coded level for temp.(°C)	Enzyme mass g	Coded level for enzyme
	1:1	-1	45	-1	0.7	-1
	1:3	0	55	0	1.4	0
	1:5	+1	65	+1	2.1	+1

5. RESULTS AND DISCUSSION

5.1 Conversion of *n*-butanol in butyl acrylate

There is no literature report on the enzymatic reaction of AA with *n*-butanol, nor about the enzyme tolerance to AA in such a combination of chemicals in toluene. Also, as butyl acrylate is commercially available, the reaction was easily followed by integration of the product peak area given in the GC analysis. The enzyme CalB was tolerant to the substrate concentrations used in this work as well to toluene up to 8 hour of reaction at 55 °C.

Two different amounts of enzyme were used to catalyze the esterification of AA and *n*-butanol expected, when the amount of lipase was increased from 60 to 200 mg, higher amounts of BA were obtained in shorter period of time (Table 2). In order to verify the influence of the amount of enzyme on the reaction, we started our studies by determining the concentrations of butyl acrylate produced. However, a second series of experiments was later settled in order to quantify both reaction products, namely, water and butyl acrylate.

Table 2 shows that when 60 mg of lipase were used, 61.6% of *n*-butanol conversion was reached after 8 hours, reaction at 55 °C, however when 200 mg of lipase was used for the same conditions, the conversion was 94.6%.

Table 2: Comparison of n-butanol conversion to butyl acrylate during the enzymatic reaction calculated by the GC peak integration area and by calculating the stoichiometric amounts of produced water.

Enzyme*	Time (h)	Butyl acrylate (mmol)	C _B (%)	Water (mmol)	C _w % calculated by the amount of produced water (%)
60 mg	2	0.61	21.2	nd.	nd
	5	nd.	nd.	1.76	34.8
	8	1.78	61.6	1.71	33.1
200 mg	1	0.46	15.9	nd.	nd
	2	1.78	61.4	nd.	nd
	7	nd.	nd.	1.55	27.6
	8	2.74	94.6	1.46	24.5

*200 μ L acrylic acid (2.9 mmol), 400 μ L n-butanol (4.37 mmol), 3.5 mL toluene (32.94 mmol) and lipase (60 and 200 mg of CalB). Initial content of water calculated by KF before the reaction was 0.33% (0.75 mmol). nd – not determined.

Figure 1 represents the results for the butanol conversion calculated by the different methods, by the amount of produced butyl acrylate (eq. 1) and the amount of water produced (eq. 2) in the reactions. We found that the product yield increased with increasing amount of enzyme at 55 °C and 8 hours of reaction, when the conversion to product was almost complete.

Chen, Xu and Okuhara (1999) studied the reaction (acrylic acid (43.7 mmol) and n-butanol (432.7 mmol), on a solid catalyst Cs_{2.5}H_{0.5}PW₁₂O₄₀ (1g) with the same organic solvent (toluene, 5 mL) at 80 °C. The highest catalytic conversion was a 15.6% to butyl acrylate, after 4 hours. The disadvantage of this chemical reaction was found to be the higher temperature required to obtain the same product, butyl acrylate.

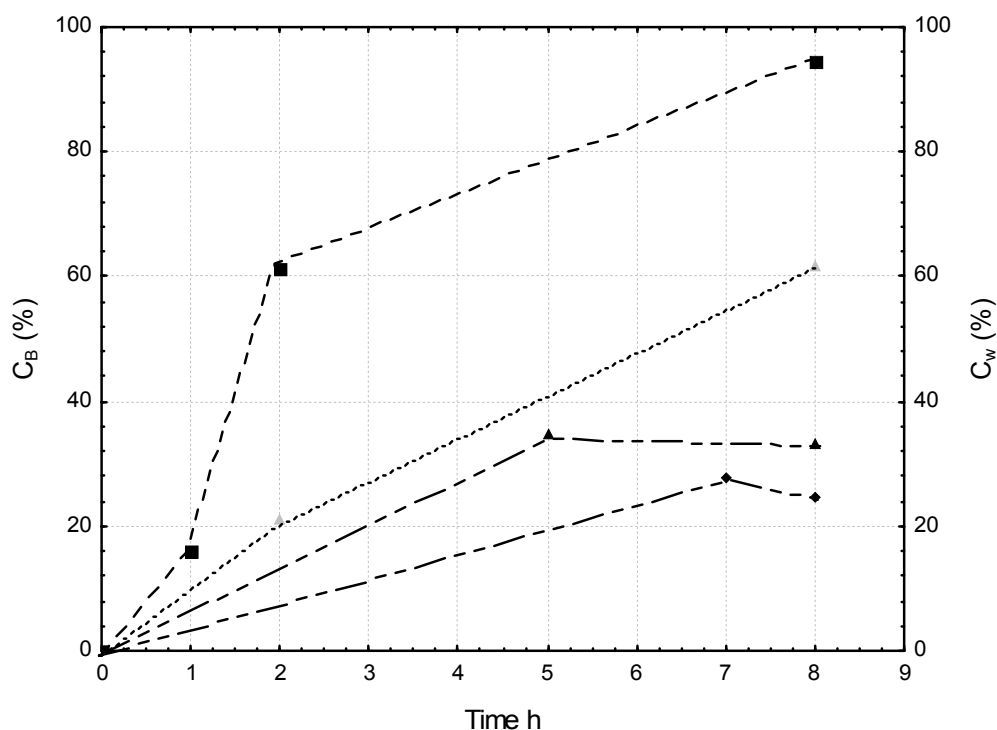


Figure.1: Effect of amount of enzyme (60mg and 200 mg of CalB) on the esterification of AA and n-butanol in toluene. ■ n-butanol (200 mg CalB); ◆ water (200 mg CalB); △ n-butanol (60 mg CalB); ▲ water (60 mg CalB).

Table 3 shows the results of n-butanol conversion (%) for different types of catalysts and compares with lipase used in this work. There are similar conversion up to 90% on lipase and other catalysts such as heteropolyacids or sulfuric acid. However, when, chemical catalysts were used a higher temperature was necessary to achieve the same conversion and other products were obtained.

Table 3: Comparison of types of catalysts and their respective conversions to butanol acrylate.

Substrates+ media	Catalyst(mass)	Temp. °C/time	Conv.(%) to BA	Byprod	Ref.:
AA (43.7 mmol) + 1-butanol (43.7 mmol) +toluene(3.5 cm ³)	CalB 60 mg	55 / 8 h	61.6	0	Tsukamoto et al., 2006
	CalB 200 mg		94.6	0	
AA (43.7 mmol) + 1-butanol (43.7 mmol) + toluene(5 cm ³)	Cs _{2.5} H _{0.5} PW ₁₂ O ₄₀ (56 mg)	79.85 / 4 h	15.9	3*	Chen et al., 1999.
	Cs _{2.5} H _{0.5} PW ₁₂ O _{40com.} (56 mg)		19.0	2**	
	Amberlist 15 (14 mg)		33.6	3*	
	H ₃ PW ₁₂ O ₄₀ (25.2 mg)		83.5	3*	
	H ₂ SO ₄ (2.8 mg)		60.2	3*	
AA/ButOH (molar ratio: 0.75)	H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	80 / 4 h25 m.	98.0	?	Dupont et al., 1995.
	H ₂ SO ₄	80 / 11h17m.	98.0	?	

* 3-butoxypropionic acid; butyl 3-butoxypropanate and butyl 3-acryloxy propanoate
 ** 3-butoxypropionic acid and butyl 3-acryloxy propanoate

Warwel, Steinke and Klaas (1996) compared preparative synthesis of undecyl-acrylate catalyzed by two different catalysts: CalB and sulphuric acid. They observed that the product yield was lower for the chemical catalyzed reaction (84% isolated of undecyl-acrylate) than for the enzyme catalyzed process (90% isolated), probably due to polymerisation of the product.

The literature about enzymatic esterification in organic solvents frequently describes the effect of water on the enzyme activity and stability (WEHTJE et al., 1997; COLOMBIÉ et al., 1998; CHARMOULEAU et al., 2001; PARK et al., 2004). The reaction conversion based on the amount of water measured in solution, C_W, was 34.4 after 5 h and 36.3% after 8 hours of reaction with 60 mg lipase (Table 2). When 200 mg of lipase was used, however, the amount of water measured in the

organic phase was 24.8% after 7 hours of reaction suggesting that the water formed during reaction is not in solution.

The amount of water in the beginning of the reaction was very small (183 mM). As the reaction proceeds water molecules started to be produced. As the stoichiometry for this reaction is one water molecule for one butyl acrylate molecule the amount of water formed during reaction should be the same as that of butyl acrylate. However, part of the water formed was not observed during the reaction. As the lipase used in this work is immobilized in a solid matrix and the solid complex is hydrophilic it is possible that part of the water formed during reaction was retained in the catalyst solid support. According to Novozymes®, CalB can absorb up to 10% water (w/w).

5.2 - Solubility of monosaccharides in TBA -

The solubility of D-glucose, D-fructose and D-xylose was measured after 48 hours stirring in TBA, at 45, 55 and 65 °C (Table 4). D-fructose was the most soluble carbohydrate, followed by xylose and glucose. A significant increase in the solubility of the three monosaccharides was observed when the temperature was increased from 45 to 55 °C.

Table 4: Solubility of monosaccharides in TBA with and without acrylic acid (0.67 M).

C (g L⁻¹)	Solubility (without			Solubility (with AA)		
	AA) (g L⁻¹)			(g L⁻¹)		
Temp.	45	55	65	45	55	65
(°C)						
D-glucose	1.32	2.22	2.55	1.27	2.24	2.13
D-fructose	12.69	18.32	19.77	11.2	15.47	12.1
D-xylose	4.38	8.95	11.83	nd	nd	nd

nd – not determined.

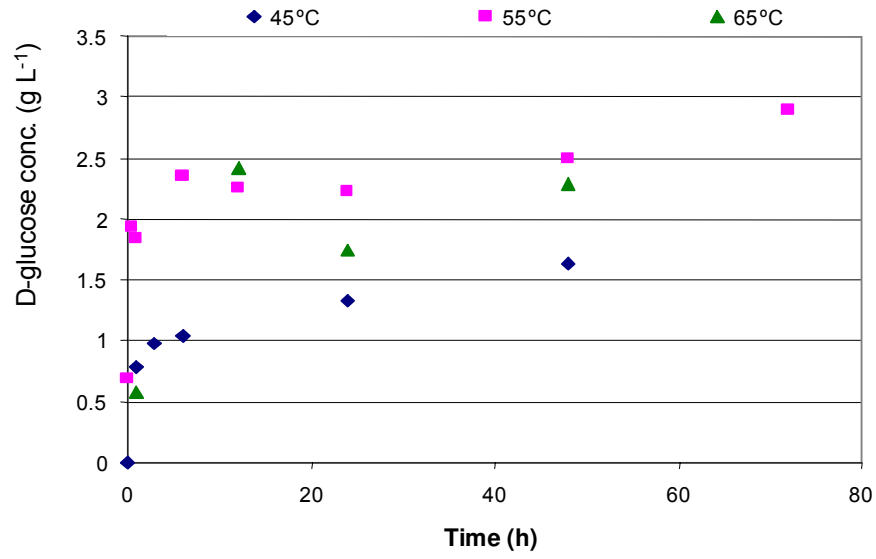
Our experimental data showed that the solubility of D-glucose in pure TBA was 1.32 g L^{-1} at 45°C , 2.22 g L^{-1} at 55°C and 2.55 g L^{-1} at 65°C . Cao et al. (1997) found that the glucose solubility in TBA was 0.34 g L^{-1} at 60°C .

Yan (2001) studied the influence of temperature on the solubility of D-glucose in acetone and ethyl methylketone (EMK). The solubility of D-glucose was lower in EMK than in acetone at 25, 40, 60 and 75°C . The solubility of D-glucose in EMK increased only 0.05 g L^{-1} when the temperature was increased from 25 to 60°C . In acetone, however, the solubility increased 3 to 4 fold.

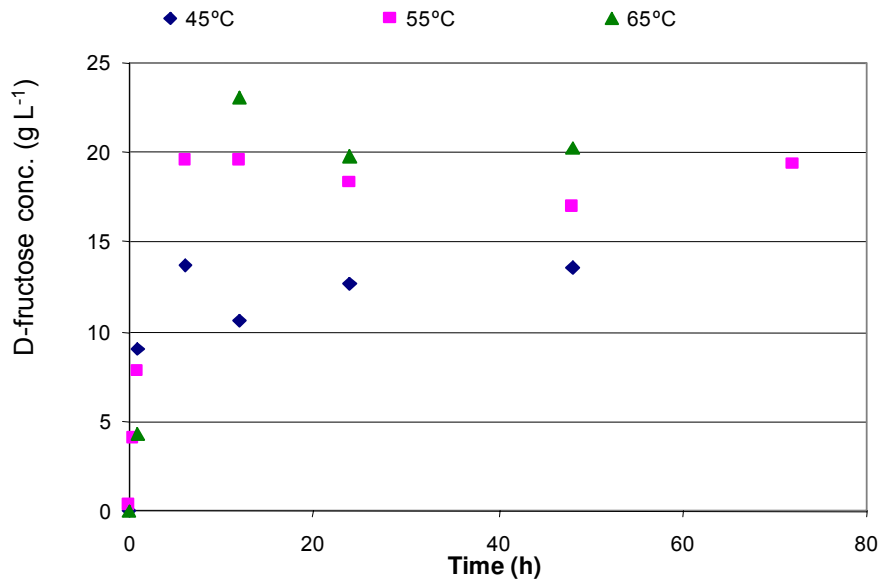
Flores et al. (2002) observed that an excess of crystalline β -glucose in 2-methyl-2-butanol at 60°C results in a glucose concentration of 17.9 mM (3.23 g L^{-1}), 23% higher than that found for crystalline α -glucose (14.4 mM (2.6 g L^{-1})).

Degn and Zimmermann (2001) measured the concentration of D-glucose after 24 h in solution in different solvents. These authors reported that the solubility of D-glucose decreased in the following order: dimethyl sulfoxide (DMSO) > dimethyl formamide (DMF) > pyridine > TBA > t-pentanol (5.22 , 2.16 , 24.2 , 2.16 and 1.82 g L^{-1}) > dioxane > acetonitrile > acetone > THF > toluene > hexane (1.35 , 0.19 , 0.47 , 0.38 , 0.11 , 0.0 g L^{-1}). The solubility of D-fructose in acetone at 5, 22 and 40°C was 0.22 , 0.39 and 0.82 g L^{-1} , respectively (ARCOS, BERNABÉ and OTERO, 1998). According to Scheckermann et al. (1995), the solubility of D-fructose in 2-methyl-2-butanol was 10 g L^{-1} at 55°C , and according to Chamouleau et al. (2001), it was 11 g L^{-1} at 60°C .

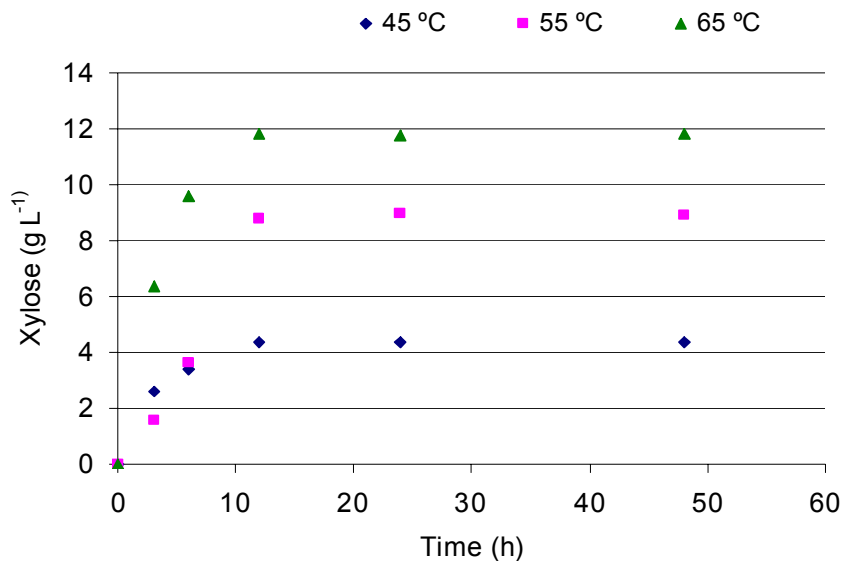
The effect of temperature on the solubility of D-glucose, D-fructose and D-xylose is represented by Figures 2 (A, B and C, respectively).



(A)



(B)



(C)

Figure 2. Effect of temperature on the solubility of D-glucose (A), D-fructose (B) and D-xylose (C) in TBA.

The addition of AA to TBA resulted in a decrease in solubility of D-fructose (Table 4). For example, when the concentration of AA in TBA was 0.65 M the solubility of glucose at 65 °C was 16% lower when compared to pure TBA. The effect of AA was the highest on the solubility of fructose, which decreased 15.6% at 55 °C and 38.7% at 65 °C when compared to pure TBA.

Tsavas et al. (2002) studied the mixtures of 2-methyl-2-butanol and DMSO as solvent and observed a significant increase of glucose solubility with increasing DMSO concentration (24 g L⁻¹ to 83.3 g L⁻¹). They also studied mixtures of water with short chain organic acids) and observed that acetic acid was a better solvent for α -glucose than propanoic acid but, during reaction, as the water content increased, as water is more soluble in acetic acid than the sugars, their solubility in both acids was almost the same. However, the same researchers commented that the presence of octanoic acid resulted in a decrease in glucose solubility, which

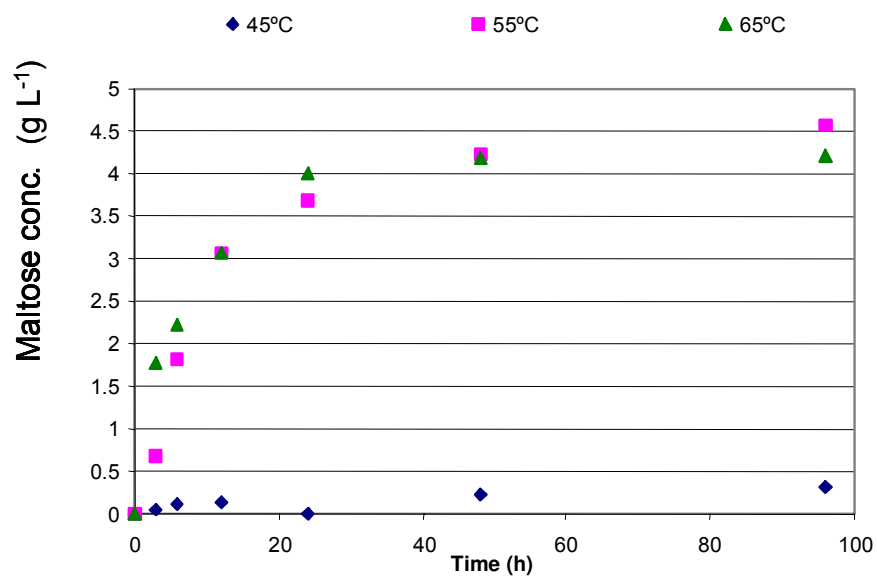
affects the anomerization equilibrium between the α and β -forms. The presence of glucose ester increased glucose solubility in 2-metyl-2-butanol, while the presence of fatty acid had the opposite effect (TSAVAS et al., 2002).

5.3 - Solubility of maltose and sucrose in TBA.

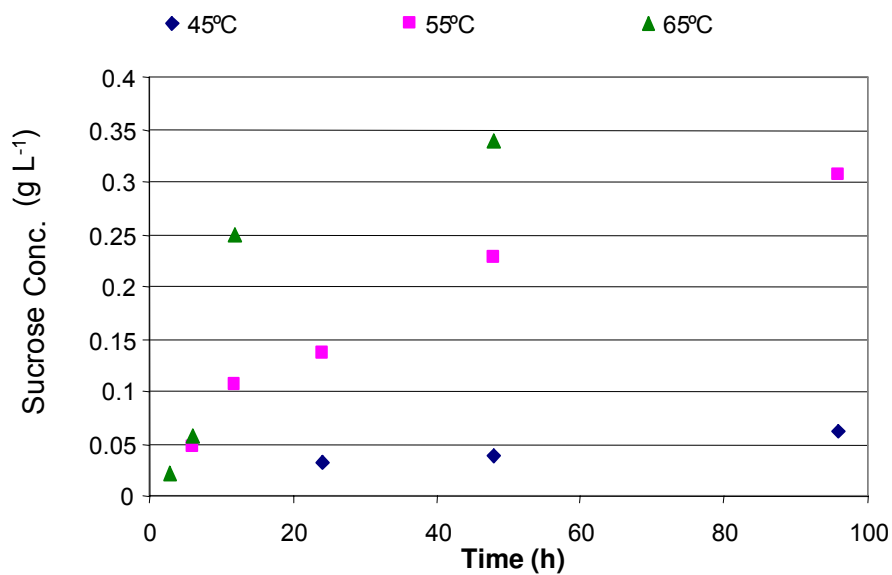
The solubility of two disaccharides (sucrose and maltose) in TBA was investigated at three different temperatures, 45°, 55° and 65 °C (Table 5). Maltose concentrations were higher than sucrose's for all temperatures used in this work, and maltose solubility was found to be highest, 4.7 gL⁻¹, at 65 °C (a 2.5 fold increase from 45° to 65 °C). The solubility of sucrose was 48 fold lower than that of maltose at 45 °C, 18 fold lower at 55 °C and 14 fold lower at 65 °C. However, sucrose solubility increased 9 fold from 45° to 55 °C, from 0.04 to 0.34 gL⁻¹ (Fig. 3 (B)).

Table 5. Solubility of disaccharides in the TBA with 0.67 M of acrylic acid at different temperatures.

C (gL⁻¹)	45 °C	55 °C	65 °C
Maltose	1.851	4.083	4.672
Sucrose	0.038	0.227	0.338



(A)



(B)

Figure 3. Effect of temperature on the solubility of maltose (A) and sucrose (B) in TBA.

Pedersen et al. (2002) showed values of solubility approximately 2.3 fold higher than our results for maltose and 35 fold higher for sucrose. The solubility of D-maltose and sucrose in TBA were 12 ± 1 mM (4.32 g L^{-1}) and 4 ± 0.2 mM (1.34 g L^{-1}), respectively, at 45°C . When pyridine was added to TBA (TBA: pyridine, 9:11) at 45°C , maltose solubility increased to 77.5 g L^{-1} (215 ± 1 mM) and that of sucrose increased to 9.29 g L^{-1} (27 ± 3 mM). These authors used saturated solutions of these sugars prepared in TBA and in 9:11 pyridine:TBA (v v^{-1}) and the mixture was kept on a rotary shaker at 250 rpm at 45°C . In this work, we prepared saturated solutions of sucrose in TBA. Pedersen et al. (2002) observed that increasing the polarity of the solvent will increase the solubility of the carbohydrate, but will also increase the susceptibility of the enzyme to denature.

Tsavas et al. (2002) noticed that when measuring the solubility of carbohydrate in organic solvents two factors should be observed: first, the equilibrium between the α and β -anomers may be rather slow; so that the total dissolved concentration continues to increase slowly with time after an initial rapid raise. Second, supersaturation can be achieved in the system, which can persist for days even in the presence of excess solid crystals.

5.4. Production of acrylate esters of carbohydrates by using factorial design experiments

Table 6 shows the factorial design matrix and the responses: conversion of acrylic acid in the esterification of D-fructose and of D-glucose. The statistical significance used was 95% of confidence levels for each effect of reaction of esterification of D-fructose and D-glucose.

Table 6 Design: real values and coded levels, and response data correspond to the average of duplicate. The responses were conversion of acrylic acid (%) in the esterification of D-fructose (DF) and of D-glucose (DG) after 96h of reaction in an open system.

Experiments	Real values			Coded level			Conversion of AA (%) D-F	Conversion of AA (%) D-G
	Molar Ratio	Temp. °C	Enzyme (g)	Molar Ratio	Temp. °C	Enzyme (g)		
1	1:5	65	2.1	1	1	1	10.6	10.5
2	1:5	65	0.7	1	1	-1	16.2	13.6
3	1:5	45	2.1	1	-1	1	21.3	11.6
4	1:5	45	0.7	1	-1	-1	24.7	12.1
5	1:1	65	2.1	-1	1	1	24.7	12.2
6	1:1	65	0.7	-1	1	-1	24.9	11.8
7	1:1	45	2.1	-1	-1	1	24.6	12.9
8	1:1	45	0.7	-1	-1	-1	24.9	13.5
9	1:3	55	1.4	0	0	0	35.2	13.7
10	1:3	55	1.4	0	0	0	35.4	13.7
11	1:3	55	1.4	0	0	0	35.5	13.7

The variables and their interactions effects were negatives for acrylic acid conversion (%) in the esterification of D-fructose as seen in the Pareto chart (Figure 4). The effects corresponding to molar ratio, temperature and amount of enzyme were statistically significant, i.e., increasing the D-fructose to acrylic acid molar ratio from 1:1 to 1:5, the temperature from 45 to 65 °C and the amount of enzyme from 0.7 to 2.1 g, resulted in a average decrease in the acrylic acid conversion of 17.28%, 9.95% and 8.15%, respectively. The interactions between molar ratio and T (1 by 2) and molar ratio and enzyme amount (1 by 3) produced negative effects in acrylic acid conversion that were statistically significant.

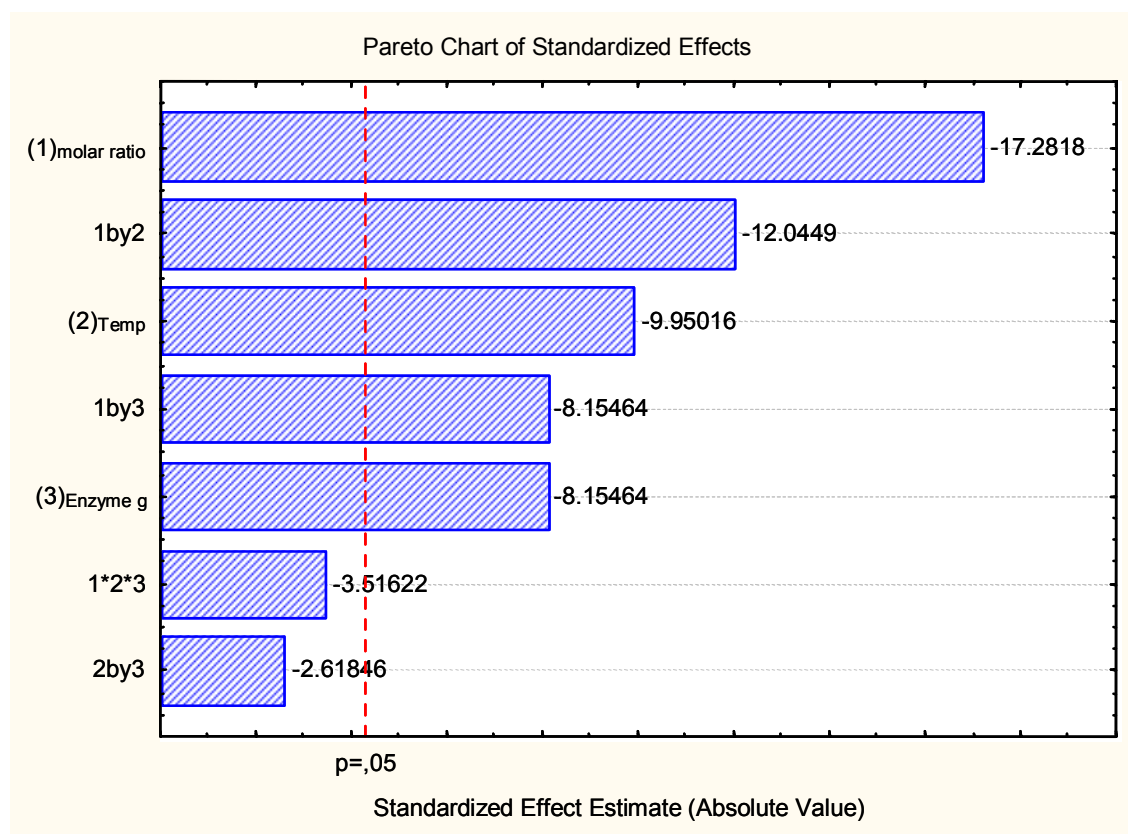


Figure 4. Pareto chart of standardized effects for variables in the conversion of acrylic acid (%) for production of D-fructose esters.

Park et al. (2004) studied the enzymatic esterification of β -methylglucoside with AA. They observed the effect of molar ratio (1:3 to 1:15), enzyme concentration (1 to 5% (wv^{-1})) and reaction temperature (45 to 60 °C) of reaction using the same lipase in TBA. Under these conditions, the maximum conversion for esterification of β -methylglucoside with AA was 57% after 48 h at the molar ratio of 1:15; with the enzyme concentration of 5% (wv^{-1}) and 50 °C of optimal temperature.

In the case of acrylic acid conversion for the esterification reaction of D-glucose, all these variables and their interactions are not statistically significant, as observed in the Pareto chart (Figure 5).

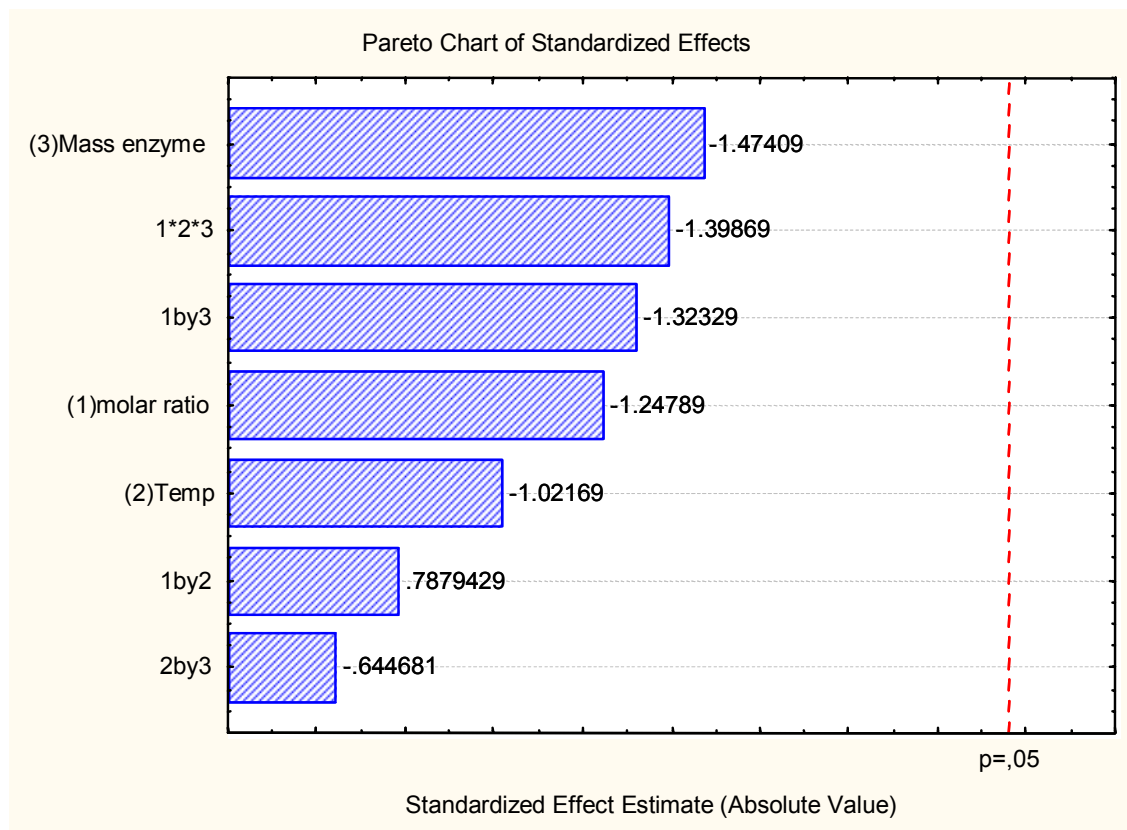


Figure 5. Pareto chart of standardized effects for variables in the conversion of acrylic acid (%) for D-glucose esters.

The calculated values for the F-test are 0.125 for D-fructose and 0.278 for D-glucose (Table 7). These values are lower than the $F_{95\%,8,2}$, for the esterification of D-fructose (19.37) and the $F_{95\%, 8,.13}$ for the esterification of D-glucose (2.77). Consequently, the regression is neither significant nor predictive.

Table 7. Analysis of variance (ANOVA) calculated from the responses factors for conversion of acrylic acid in the esterification reaction of D-fructose and D-glucose.

D-fructose monoester		*R-sqr: 0.30179, MS pure error: 0.22333		
Factor	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares	F-test
Regression	200.149	8	25.019	0.125 ^a
Residual	400.787	2	200.394	
Lack of fit	358.634	1	358.634	1606.062 _b
Pure error	0.447	2	0.223	
Total	514.289	10		
D-glucose monoester		*R-sqr: 0.33478, MS pure error: 1.7589		
Factor	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares	F-test
Regression	16.742	8	2.093	0,278 ^a
Residual	32.864	13	2.528	
Lack of fit	9.999	1	3.441	0.344 ^b
Pure error	22.865	13	9.999	
Total	49.606	21		

a F-ratio (regression/residual)

b F-ratio (lack of fit/pure error).

No reports of monosaccharide direct enzymatic esterification with acrylic acid were found to compare the main effects of parameters with our results.

Reactions of enzymatic production of sugar fatty acid esters were strongly influenced by temperature, which affected the rate of direct esterification (YAN, 2001). Lower temperatures result in slower initial reaction rates, since the reaction temperature directly affects the rate constant for esterification.

Soultani et al. (2001) noticed that by lowering the molar ratios of fructose to fatty acid increased the fructose consumption and total sugar ester concentrations. Conversely, it negatively affected fatty acid conversions. The effect of the molar ratio on the initial reaction rate was dependent on the fatty acid carbon-chain length. The highest rate of reaction was obtained for stearic acid.

6. Conclusions

This is the first time that butyl acrylate was produced by an enzymatic esterification reaction, catalyzed by CalB, achieving 94.6% of n-butanol conversion after 8 hours at 55 °C, indicating the use of this enzyme for the production of this product.

The solubility studies for the monosaccharides showed that D-fructose was least 6 fold more soluble than D-glucose in TBA, but this effect was strongly dependent on the temperatures used for solubilization.

A similar effect was found for the disaccharides maltose and sucrose. Maltose was at least 48 fold more soluble than sucrose at 45 °C, and this effect was strongly dependent on the temperatures used for solubilization.

Amongst all the carbohydrates studied, fructose was the most soluble in TBA, almost 20 g L⁻¹ at 65 °C and sucrose was the least soluble, 0.04 g L⁻¹ at 45 °C and 0.34 g L⁻¹ at 65 °C.

Application of the factorial design allowed the investigation of the esterification of monosaccharides with AA catalyzed by CalB. However, a lack of fit was observed and the F-test regression was not significant neither predictive. Therefore the experimental design was not capable to describe the influence of factors.

Acknowledgements: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil (FAPESP), CNPq, Capes and Alfa PolyLife are acknowledged for providing financial support and scholarship.

7. References

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.

ANDERSON, E. M., LARSSON, K. M., KIRK, O. “One biocatalyst – many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis.”, *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 16, p. 181-204, 1998.

CAO, L., FISCHER, A., BORNSCHEUER, U.T., SCHMID, R.D. “Lipase-catalysed solid phase synthesis of sugar fatty acid esters”, *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 14, p. 269-283, 1997.

CAO, L., BORNSCHEUER, U.T., SCHMID, R.D. Lipases-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters, IV: selectivity of lipases towards primary and secondary hydroxyl groups in carbohydrates. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 00, p. 1-9, 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., XU, Z., OKUHARA, T. “Liquid phase esterification of acrylic acid with 1-butanol catalyzed by solid acid catalysis.”, *Applied Catalysis A: General*, v.180, p. 261-269, 1999.

COLOMBIÉ, S., TWEDDEL, R. J., CONDORET, J.S., MARTY, A. Water activity control: a way to improve the efficiency of continuous lipase esterification. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 60, n. 3, p. 362 – 368, 1998.

COULON, D., GIRARDIN, M., ROVEL, B., GHOUL, M. “ Comparison of direct esterification and esterification of fructose by *Candida antarctica* lipase”, *Biotechnology Letters*, v. 17, 2, p. 183-186, 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, p. 483 - 491, 2001.

DUPONT, P., VEDRINE, J.C., PAUMARD, E., HECQUET, G., LEFEVBRE, F. Heteropolyacids supported on activated carbon as catalysts for the esterification of acrylic acid by butanol. *Applied Catalysis A: General*, v. 129, p. 217 – 227, 1995.

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.

GOEDE, A.T.J.W., OOSTEROM, M., DEURZEN, M.P.J., SHELDON, R.A., BEKKUM, H., RANTWIJK, F. "Selective lipase-catalysed esterification of alkyl glycosides", *Biocatalysis*, v. 9, p. 145-155, 1994.

JEONG, G.-T., PARK, D.-H. Response surface methodological approach for optimization of enzymatic synthesis of sorbitan metacrylate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 381-386, 2006.

KLIBANOV, A. M. Enzymes that work in organic solvents, *Chemtechnology*, v. 16, p.354-589, 1986.

KIM,J., HAAM, S., PARK, D.W., AHN,I.S., LEE, T.G, KIM, H.S., KIM, W.S."Biocatalytic esterification of β -methylglucoside for synthesis of biocompatible sugar-containing vinyl esters", *Chemical Engineering Journal*, v. 99, p. 15-22, 2004.

MURAKAMI, Y., HOSHI, R., HIRATA, A. "Characterization of polymer-enzyme complex as a novel biocatalyst for nonaqueous enzymology", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 22, p. 79-88, 2003.

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

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.

PEDERSEN, N.R., WIMMER, R., EMMERSEN, J., DEGN, P., PEDERSEN, L.H. "Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalysed esterification of disaccharides.", *Carbohydrate Research*, v. 337, p. 1179-1184, 2002.

PEREIRA, C.C.B., LISBOA, J.S., SILVA, M. A.P., LANGONE, M.A.P. "Síntese enzimática de monolaurina a partir da reação de esterificação direta entre ácido láurico e glicerol", *Anais do 12º Congresso Brasileiro de Catalise*, 2003.

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

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

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

YAN, Y. "Enzymatic production of sugar fatty acid esters", Thesis PhD, Institut für Biochemie der Universität Stuttgart, p. 104, 2001.

WARWEL, S., STEINKE, G., KLAAS, M. R. "An efficient method for lipase-catalysed preparation of acrylic and methacrylic acid esters.", *Biotechnology Techniques*, v.10, n. 4, p. 283-286, 1996.

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

Capitulo IV

O estudo de síntese enzimática de acrilatos de açúcares pela reação de esterificação direta entre ácido acrílico e açúcares (mono e dissacarídeos) é descrita neste capítulo IV.

A formação de produtos (mono, di, tri, tetraéster) de esterificação foi acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência e os produtos identificados por MALDI- ToF MS.

Capítulo IV

Enzymatic synthesis of acrylic acid esters of mono- and disaccharides

1. Junko Tsukamoto,¹ Gustavo P. Valença,² Sophie Haebel³, Martin G. Peter,³
and Telma T. Franco^{1*}

1. LEB, Department of Chemical Processes, School of Chemical Engineering, State University of Campinas, P.O. box 6066, 13081-970, Campinas, SP, Brazil
2. LEPAC, Department of Chemical Processes, School of Chemical Engineering, State University of Campinas, P.O. box 6066, 13081-970, Campinas, SP, Brazil
3. Institute of Chemistry, University of Potsdam, P.O. box 601553, D-14415 Potsdam, Germany

* Corresponding author, E-mail: franco@feq.unicamp.br

Abstract

Esters of sugars have attracted attention in many different areas such as surfactants, adsorbents, and polymers. They can be synthesized either by chemical or enzymatic processes. We describe here the lipase catalyzed esterification of three mono- and two disaccharides with free acrylic acid, using *tert*-butanol as the solvent, in the presence or the absence of molecular sieves. Analysis of reaction mixtures by high-performance liquid chromatography (HPLC) and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry shows that the main products are the mono- and diacrylates, while higher esters are formed as minor products. The enzymatic esterification of free carbohydrates with acrylic acid is unprecedented.

Keywords: carbohydrates, esterification, lipase, acrylic acid esters, MALDI-TOF mass spectrometry.

Introduction

The increasing interest in the production of sugar esters is due to their use as surfactants in the food and cosmetic industry, as well for as medical and technical applications, e.g. to modify antistatic properties, dye ability, adhesion, printability, biodegradability, and biocompatibility of polymers (Kitagawa et al. 2002). Enzyme catalyzed esterification of sugars by means of proteases (Park and Chang 2000), or lipases (Park et al. 2004a, 2004b; Boeckh et al. 2003; for reviews, see Plou et al. 2002; Drueckhammer et al. 1991) offers an attractive alternative to chemical synthesis. Usually, the reactions are carried out at moderate temperatures in organic solvents, such as *t*-butanol, dimethylformamide, acetone, or pyridine. In order to achieve high substrate concentrations, methyl glycosides are used as acyl acceptors, though free sugars can also be used, and carboxylic acid esters are used for transesterification, though acylation with free fatty acids has been reported in a few cases (Park et al. 2004a; Cao et al. 1998).

The aim of this work was to investigate the enzymatic acylation of the free sugars D-fructose, D-glucose, D-xylose, sucrose, and D-maltose with acrylic acid by means of immobilized lipase B from *Candida antarctica* in *t*-butanol, carrying out the reaction at 55 °C for 48 h, in the presence or the absence of molecular sieves. Reaction mixtures were analyzed by means of HPLC on a Shodex sugar column, and by MALDI-TOF MS, with triethylammonium α -cyano-4-hydroxycinnamate as the ionic liquid matrix (Armstrong et al. 2001; Santos, et al. 2004).

Materials and methods

Chemicals

CalB (lipase B from *Candida antarctica*, immobilized on a macroporous acrylic acid resin; spec. activity: 10.000 propyl laurate units (PLU) $\times$ g⁻¹; Lot # LC 200204) was kindly provided by Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Denmark). D-Fructose (cat. # 140929) and D-glucose (cat. # G5767) were from Sigma (St. Louis, MO, USA). D-xylose (cat. # 95729) was from Fluka (Steinheim, Germany). Disaccharides (Sucrose: cat. # 1.07.651.1000, and D-maltose, cat. # 1.05911.1000) were purchased from E. Merck (Darmstadt, Germany). Acrylic acid (99%; stabilized with 0.02% of hydroquinone monomethyl ether, cat. # 14723-0) and *t*-butanol (99.5%, cat. # 1.09629.5000) were from Aldrich (Steinheim, Germany) or E. Merck (Darmstadt, Germany), respectively. All solvents used were dried with molecular sieves (MS) 3Å, pearls 2 mm (E. Merck, Darmstadt, Germany, cat. # 1.05704.0250) for 2 days prior to use.

Saturated sugar solutions

Saturated solutions were prepared by adding the sugar (0.5 g) to *t*-butanol (40 mL) in a glass-stoppered Erlenmeyer flask and stirring for 24 h at 55 °C. The concentration of the sugar was measured by HPLC (Table 1).

Reactions

Acrylic acid (0.255 mL; 0.268 g; 3.72 mmol) was added to 15 mL of a saturated sugar solution placed in a 25 mL Erlenmeyer flask, with or without molecular sieves 3 Å (200 mg). The reactions were started by addition of CalB (1.4 g). The vessel was closed with a glass stopper and the reaction vessel was placed in a shaking water bath maintained at 200 rpm and 55 °C for 48 h. Aliquots of 200 µL of the reaction mixture were withdrawn after 48 h for analysis. A blank experiment was carried without adding CalB to the reaction mixture.

HPLC analysis

The HPLC system consisted of a 515 pump, a 717 automatic injector, and a 410 differential refractive index detector (all from Waters). Millenium 32 software, version 3.05.01, was used for control of the system and processing of signals. For separations, a Shodex SH-G guard column and a Shodex SH1011 column (8 mm i.d. × 300 mm, particle size 6 µm), maintained at 50°C, were used. The mobile phase was 1 mM aqueous H₂SO₄, flow rate: 1.0 mL × min⁻¹. Aliquots of 20 µL of the reaction mixtures were injected onto the column. For quantification, concentrations were calculated from calibration curves obtained from sugar standard solutions. Conversions were calculated as follows:

$$X = \frac{A_{S0} - A_{S48}}{A_{S0}}$$

where X = conversion, A_{S0} = peak area of the free sugar at t = 0; A_{S48} = peak area of the free sugar at t = 48 h.

MALDI-TOF MS analysis

The ionic liquid matrix (Armstrong et al. 2001; Santos et al. 2004) was prepared by adding dry triethylamine (Et₃N) (101 mg, 1 mmol) to a solution of α-

cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA) (189 mg, 1 mmol) in 10 mL of dry acetonitrile. The mixture was refluxed for 1 h and the solvent was removed *in vacuo*. Finally, a 1% solution of Et₃N- α -CHCA in an 1:1 (v $\times$ v⁻¹) mixture of acetonitrile : water was prepared. An aliquot of 3 μ L of the reaction mixture was mixed with 5 μ L of the ionic liquid matrix solution, 0.5 mL of this mixture was applied on the target, and the solvent was evaporated under a gentle steam of air. Mass spectra were recorded on a Bruker Reflex II (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) in the positive ion mode. Ionisation of the sample was achieved with a nitrogen laser operating at 337 nm with a 3 ns pulse width and 3 Hz. All spectra were measured in the reflector mode, using external calibration with angiotensin II.

Results and Discussion

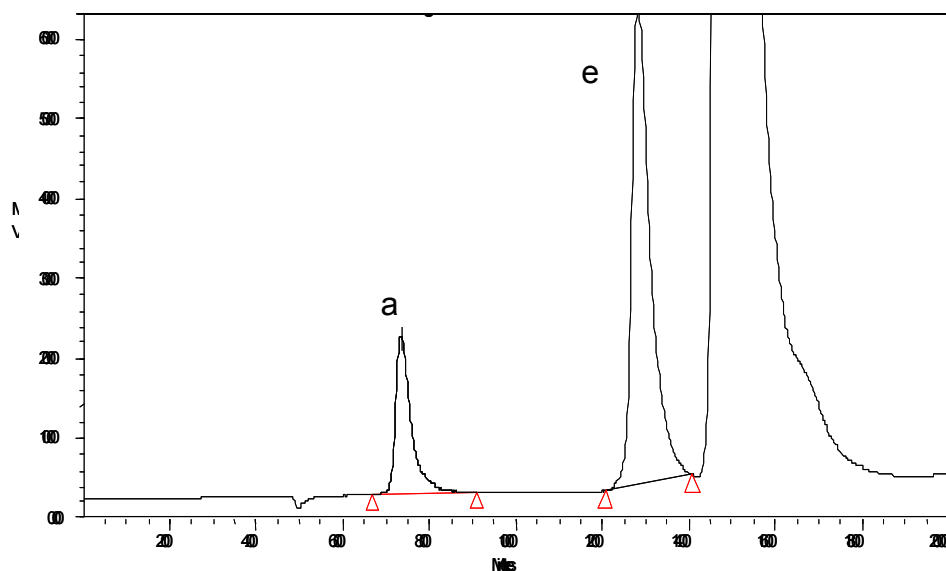
In the present study, the lipase-catalyzed esterifications of D-fructose, D-glucose, D-xylose, sucrose and D-maltose in *t*-butanol were investigated. Earlier, we found that the best solvent, for the *Candida antarctica* lipase B catalyzed esterification of carbohydrates with acrylic acid was *t*-butanol at a reaction temperature of 55°C (to be published elsewhere).

D-Glucose appears to be the best substrate, with a conversion of 80.3 % in the presence, and 72.4 % in the absence of molecular sieves. Smaller differences are found in the conversion of D-fructose in the presence or in the absence of molecular sieves, while D-xylose and D-maltose are rather poor substrates (Table 1). The conversion of sucrose could not be calculated from the chromatograms, because of a strong peak tailing, obscuring the integration of the peaks. No conversion is observed in the blank reactions, as exemplified for D-fructose in Fig. 1.

Table 1. Conversion of sugars in the presence (A) or the absence (B) of molecular sieves, as calculated from HPLC-chromatograms.

	Concentration of satd. solution (mmol $\times$ mL ⁻¹)	Conversion of sugar (%)	
		A	B
D-Glucose	12.32	80.3	72.4
D-Fructose	101.66	63.3	64.7
D-Xylose	59.22	27.6	18.1
Sucrose	0.66	n.d.	n.d.
D-Maltose	11.33	25.7	25.7
n.d._not determined			

A



B

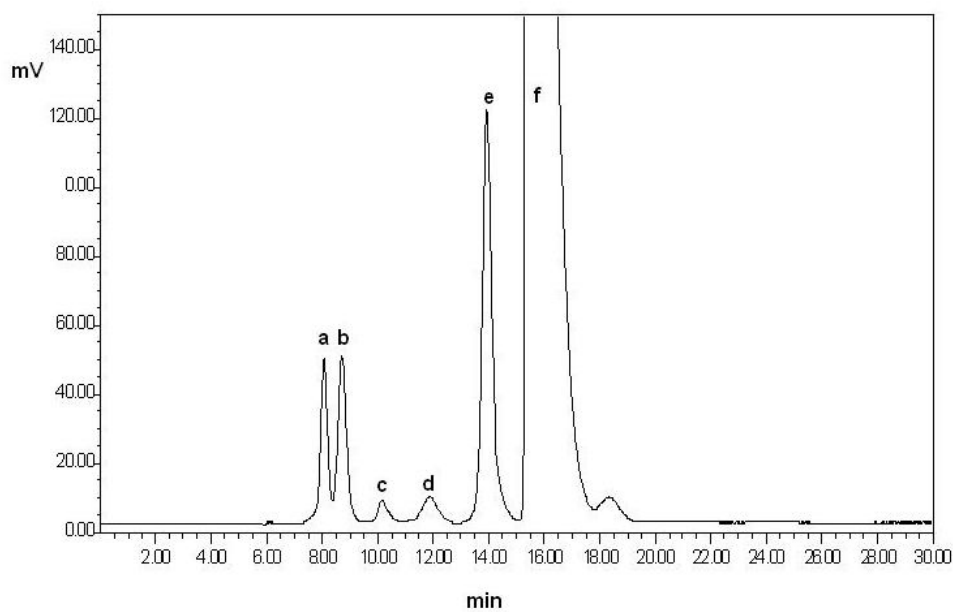


Figure 1. HPLC of (A) blank experiment, (B) the reaction mixture of the lipase catalyzed esterification of D-fructose in the absence of molecular sieves, after a reaction time of 48 h. Peak assignment: a: D-fructose, b: monoacrylate, c: diacrylate, d: triacrylate, e: acrylic acid, f: *t*-butanol.

The main products are, in all cases, the monoacrylates. Di- and triacrylates are found by HPLC only in the reactions of D-fructose (Fig. 1) and D-glucose (not shown) while higher esters are present, if at all, only in very small amounts. Except in the reaction of D-xylose, the presence of molecular sieves results in rather small differences in the conversions.

Analysis of reaction mixtures by MALDI-TOF MS

Monosaccharides

For evaluation of the MALDI-TOF mass spectra, the calculated theoretical and the observed masses of sodiated resp. potassiated molecular ions of the two hexoses and the pentose are compiled in Table 2.

The mass spectrum of the reaction mixture of the lipase catalyzed esterification of D-fructose with acrylic acid in the absence of molecular sieves is shown in Fig. 2A. The potassiated pseudomolecular ions predominate in this case. The conversion calculated from HPLC is also reflected by the relative intensities of the peaks of the free sugar $m/z = 203.13$ $[M+Na]^+$; 219.10 $[M+K]^+$, as compared with those of the monoacrylate at $m/z = 257.14$ $[M+Na]^+$; 273.12 $[M+K]^+$, plus the diacrylate at $m/z = 311.16$ $[M+Na]^+$; 327.13 $[M+K]^+$. However, it should be mentioned that MALDI-TOF MS is not suitable for quantification of chemically different molecular species. When the reaction is carried out in the presence of molecular sieves, traces of the tri- and tetraacrylate are observed in the mass spectrum, as revealed by peaks at $m/z = 365.51$ $[M+Na]^+$ and 419.6 $[M+Na]^+$; 435.48 $[M+K]^+$ (Fig. 2B).

Table 2. Calculated and observed masses (m/z) of sodiated resp. potassiated molecular ions generated in MALDI-TOF MS of hexoses, pentoses, and corresponding acrylates (A: reaction in the presence of molecular sieves; B: in the absence of molecular sieves).

		calcd. (m/z)	found (m/z)				calcd. (m/z)	found (m/z)	
		Hexoses	D-Fructose		D-Glucose		Pentose	D-Xylose	
			A	B	A	B		A	B
Free sugars	[M+Na] ⁺	203.05	203.20	203.13	203.21	203.24	173.04	173.22	173.24
	[M+K] ⁺	219.02	219.18	219.10			189.01		
Monoacrylates	[M+Na] ⁺	257.06	257.24	257.14	257.25	257.28	227.05	227.27	227.29
	[M+K] ⁺	273.03	273.21	273.12	273.23	273.24	243.02		
Diacrylates	[M+Na] ⁺	311.07	311.27	311.16	311.28	311.31	281.06	281.32	281.34
	[M+K] ⁺	327.04	327.23	327.13			297.03		
Triacrylates	[M+Na] ⁺	365.09	365.51		365.35	365.51	335.08	335.54	
	[M+K] ⁺	381.06					351.04		
Tetraacrylates	[M+Na] ⁺	419.10	419.60		419.33	419.36	389.09		
	[M+K] ⁺	435.07	435.48				405.05		
Pentaacrylates	[M+Na] ⁺	473.11			473.65	473.68			
	[M+K] ⁺	489.08							

The reaction of D-Glucose yields, as the major product, the monoacrylate as revealed by the intensive peaks of the sodiated pseudomolecular ion at m/z = 257.28, while the diester appears at m/z 311.31 (Fig. 3A). In addition to the free sugar (m/z = 203.34), small amounts of higher esters seem to be produced from glucose, as indicated by the peaks at m/z = 365.51 (tri-), 419.36 (tetra-), and 473.38 (pentaacrylate). Essentially the same product pattern is detected after carrying out the reaction in the presence of molecular sieves (see supplement, Fig. S1A).

The conversion of D-xylose seems to be rather low, as the intensity of the peak of the free sugar at m/z = 173.24 is nearly as high as that of the monoacrylate at m/z = 227.29 (Fig. 3B). A rather intensive peak is also seen for the diacrylate, while a trace of the triacrylate is found at m/z = 335.54 after carrying out the reaction in presence of molecular sieves (see supplement, Fig. S1B).

Disaccharides

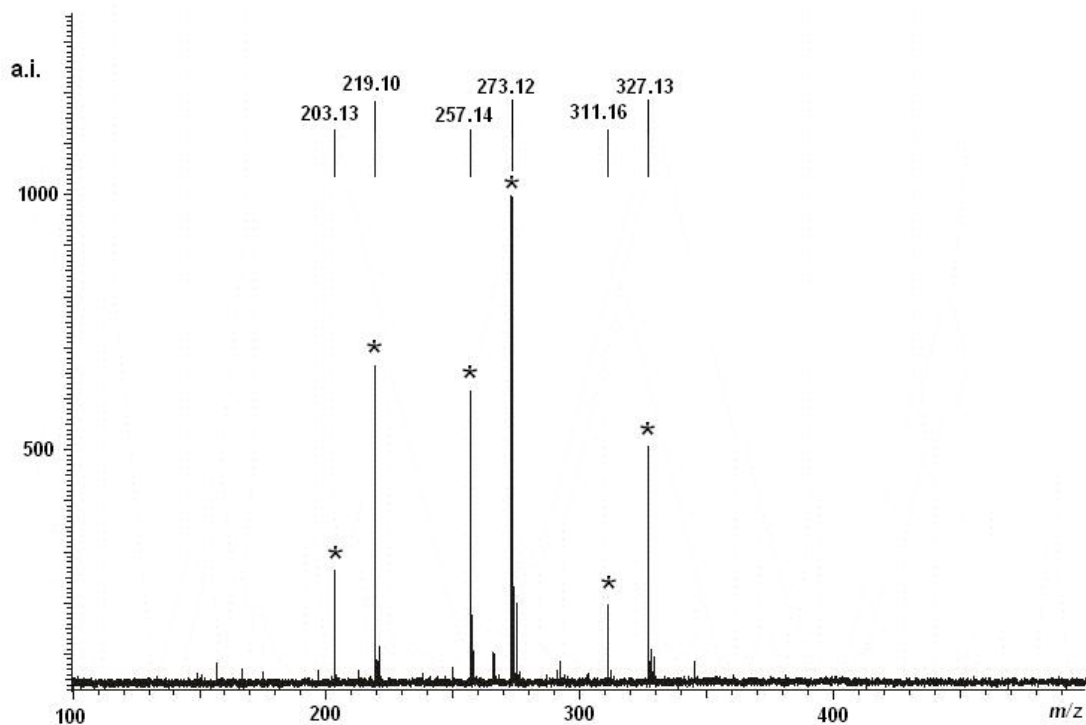
The calculated theoretical and the observed masses of sodiated resp. potassiated molecular ions of the two disaccharides are compiled in Table 3.

Table 3. Calculated and observed masses (m/z) of sodiated resp. potassiated molecular ions generated in MALDI-TOF MS of disaccharides, and corresponding acrylates (A: reaction in the presence of molecular sieves; B: in the absence of molecular sieves).

		calcd. (m/z)	found (m/z)			
		Disaccharides	Sucrose		D-Maltose	
			A	B	A	B
Free sugars	[M+Na] ⁺	365.11	365.30	365.41	365.34	365.35
	[M+K] ⁺	381.08	381.54	381.38		381.30
Monoacrylates	[M+Na] ⁺	419.12	419.30	419.43	419.38	419.36
	[M+K] ⁺	435.09			435.29	435.31
Diacrylates	[M+Na] ⁺	473.13	473.21	473.46	473.36	437.55
	[M+K] ⁺	489.10				
Triacrylates	[M+Na] ⁺	527.14				
	[M+K] ⁺	543.11				

The high intensity of the peak of the free sucrose at $m/z = 365.41$ indicates a rather low conversion of the disaccharide (Figure 3D). The mono- and the diacrylates are detected at $m/z = 419.43$ and at 419.30 in the presence or in the absence of molecular sieves, respectively. Similar results are obtained with D-maltose which shows a higher conversion than sucrose (Figure 3E).

A



B

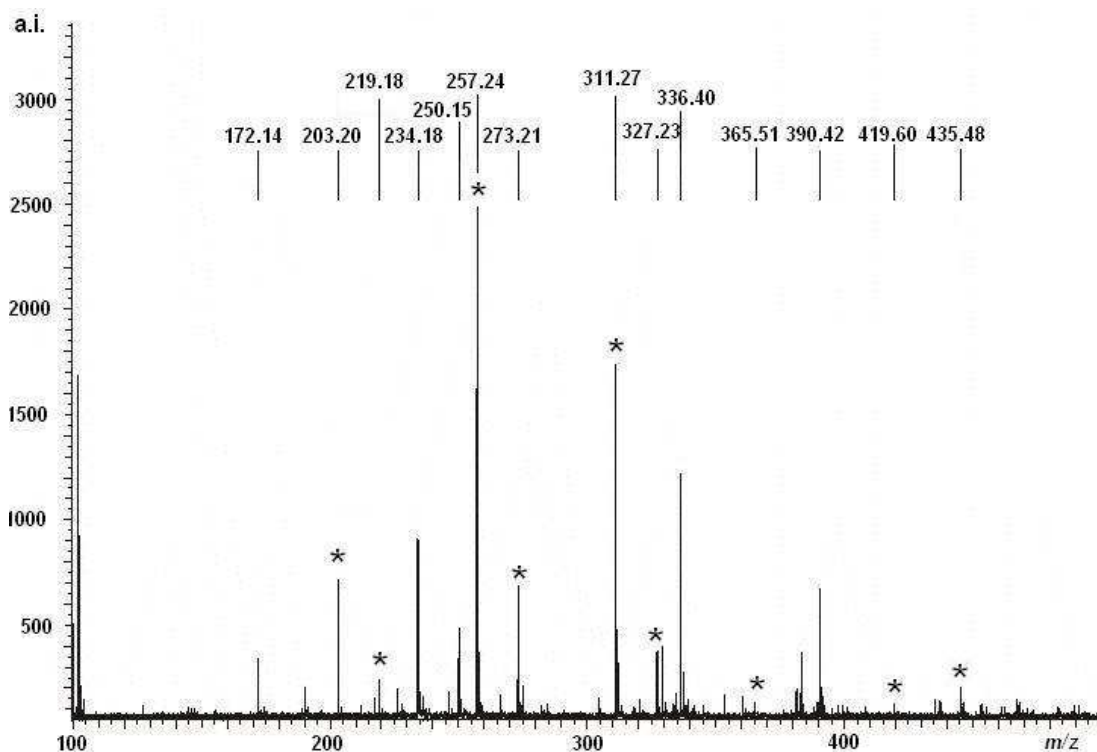
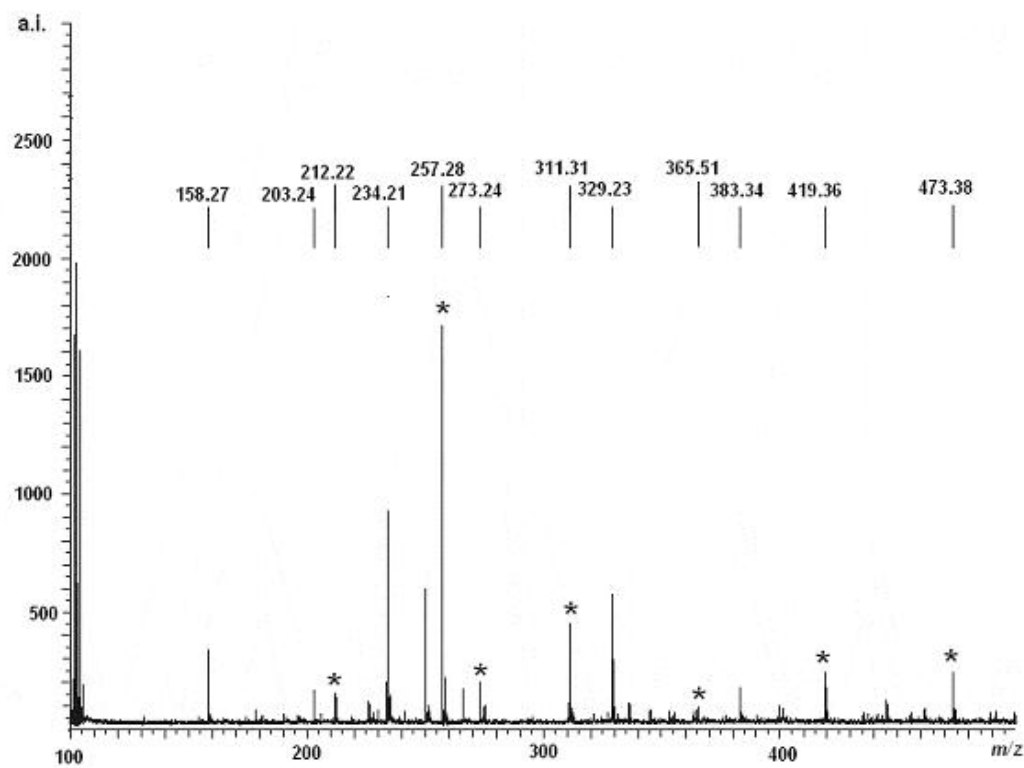
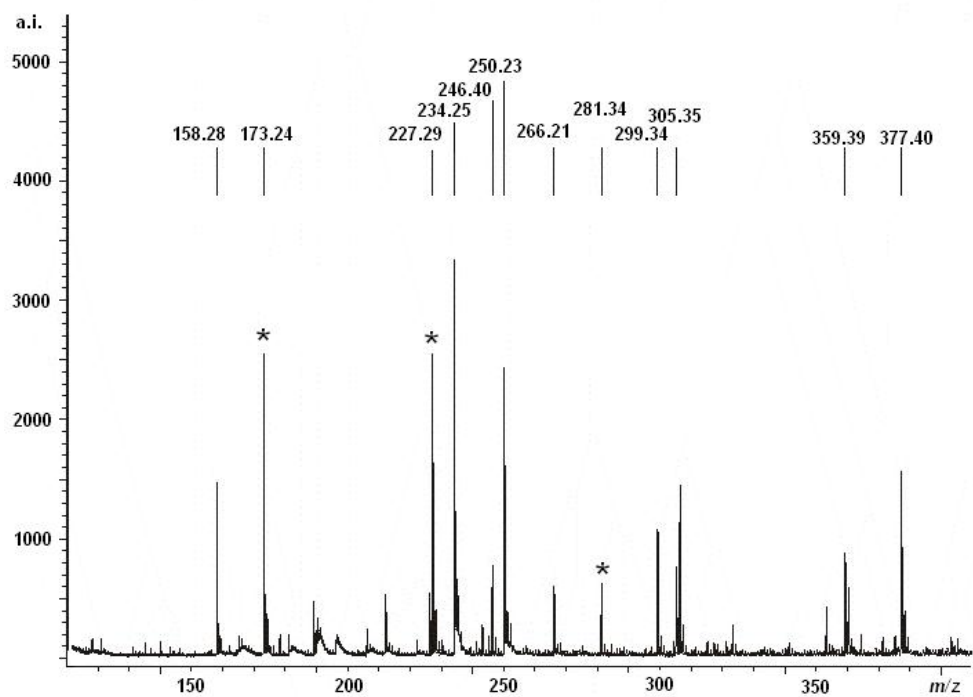
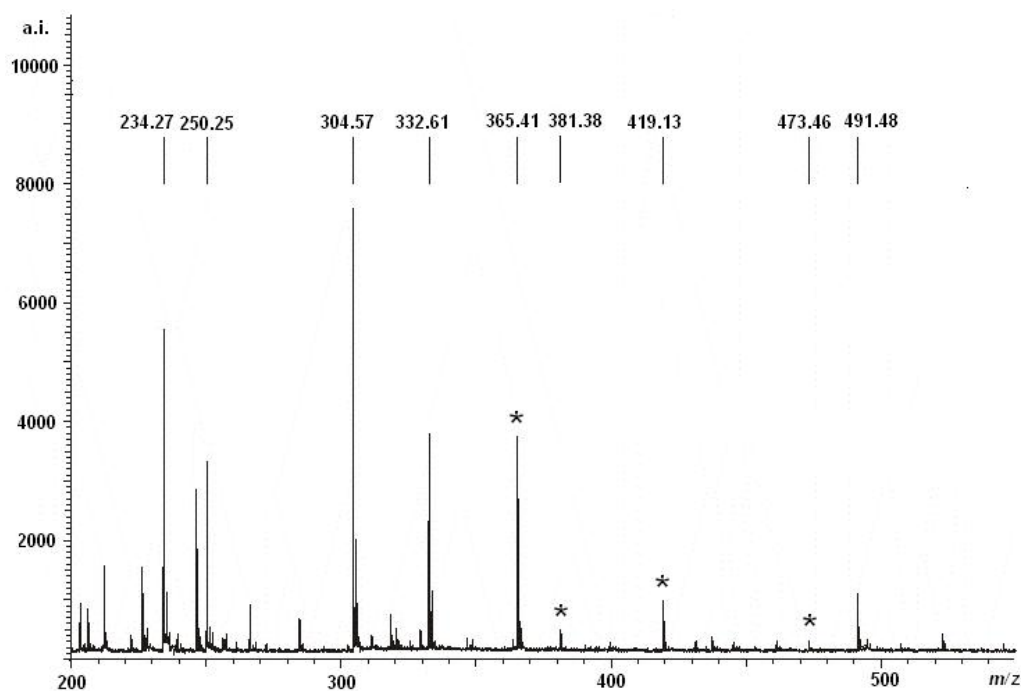


Figure 2. MALDI-TOF MS of the reaction mixtures of the lipase catalyzed esterifications of D-fructose in the absence of molecular sieves, recorded after a reaction time of 48h. Asterisks indicate peaks from fructose and acrylates. A: in the absence of molecular sieves; B: in the presence of molecular sieves.

A**B**

C



D

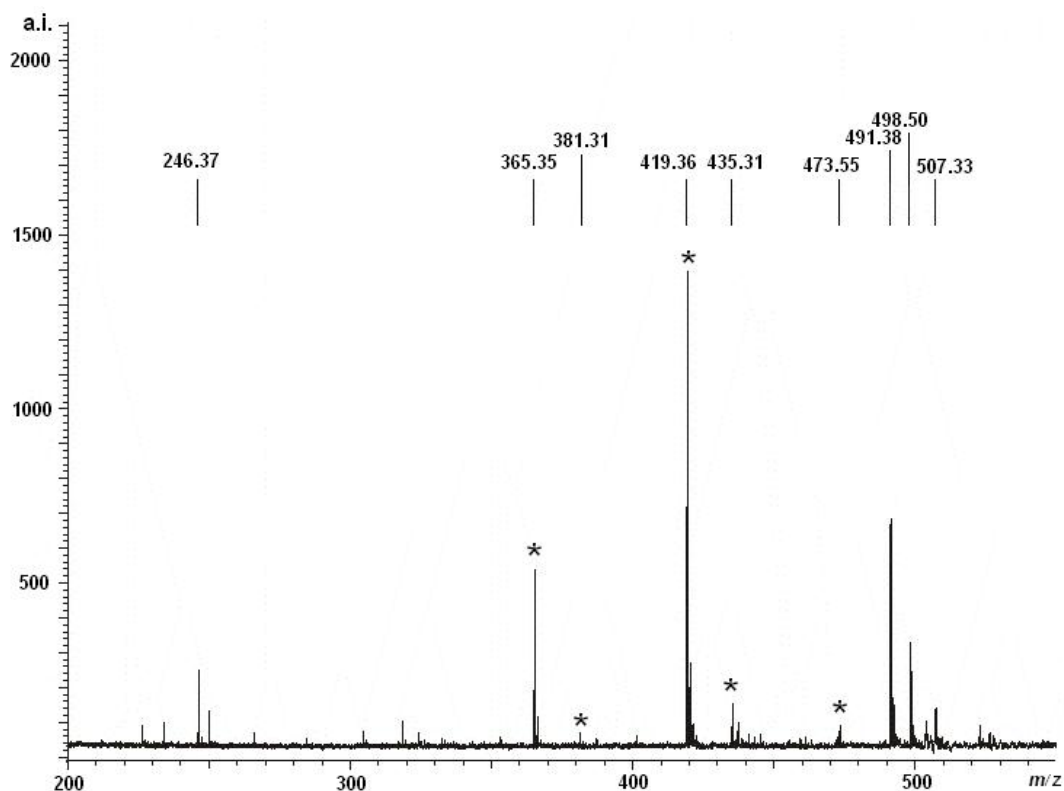


Figure 3. MALDI-TOF MS of reaction mixtures of lipase catalyzed esterifications of sugars in the absence of molecular sieves, taken after a reaction time of 48h. Asterisks indicate peaks from sugars and acrylates. A: D-glucose; B: D-xylose; C: sucrose; D: D-maltose.

Conclusions

No major differences are seen in the conversions when the reactions are carried out in the presence or the absence of molecular sieves. However, higher acrylates are observed in the presence of the water binding agent, as the tri- and tetraacrylates are formed from D-fructose and even the pentaacrylate from D-glucose, while the triacrylate is detected in the case of D-xylose. As multiple esterification is considered to be unfavorable in terms of selectivity of the reaction and, in addition, numerous unidentified impurities are introduced with the molecular sieves, it appears that the use of molecular sieves does not offer an advantage in the lipases catalyzed esterification of sugars with acrylic acid.

Park et al. (2004a) reported on the esterification β -D-methylglucoside with acrylic acid or vinyl acrylate, using Novozym 435 in *t*-butanol or in a solvent-free system, and analyzed the products by ^1H NMR spectroscopy, mentioning only the 6-*O*-acrylate. However, our results clearly show that significant amounts of multiple esters are formed under essentially the same conditions as used by Park et al. (2004a), when high-resolution analytical methods such as mass spectrometry are used for product analysis. It appears that, of the mono- and disaccharides studied, the highest conversion is observed when glucose is used as the substrate. On the other hand, the formation of multiple substitution products up to the pentaacrylate shows that the selectivity is rather poor in this case.

Acknowledgements: Financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil (FAPESP), from CNPq, from Capes, and from the European Commission, Programme Alfa, is acknowledged.

References

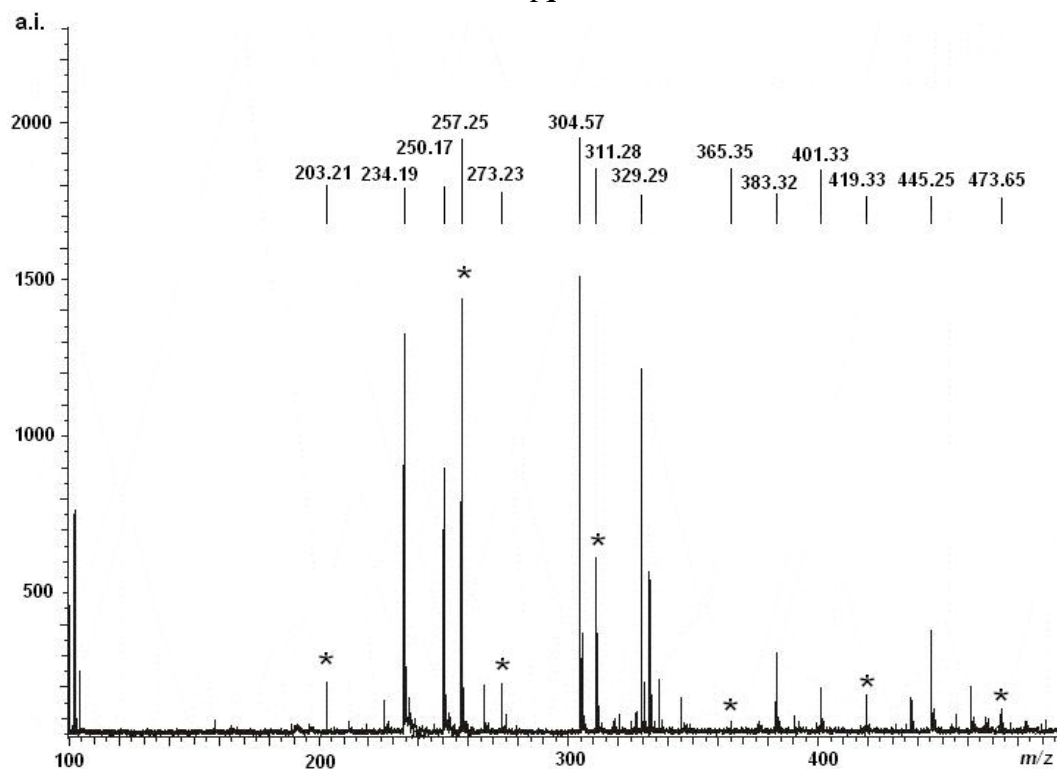
- Armstrong, D. W., L.-K. Zhang, L. He and M. L. Gross (2001). "Ionic Liquids as Matrixes for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry." *Analytical Chemistry* **73**: 3679-3686.
- Boeckh, D., B. Hauer and D. Haering (2003). Enzymatic synthesis of sugar acrylates. WO 03/042227. (BASF Aktiengesellschaft, Germany).
- Cao, L. Q., U. T. Bornscheuer and R. D. Schmid (1998). "Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters, IV: Selectivity of lipases towards primary and secondary hydroxyl groups in carbohydrates." *Biocatalysis and Biotransformation* **16**: 249-257.
- Drueckhammer, D. G., W. J. Hennen, R. L. Pederson, C. F. Barbas, III, C. M. Gautheron, T. Krach and C. H. Wong (1991). "Enzyme catalysis in synthetic carbohydrate chemistry." *Synthesis* 499-525.
- Kitagawa, M., T. Raku, H. Shimakawa, H. Fan and Y. Tokiwa (2002). "Effect of Water on the Enzymatic Synthesis of Vinyl Sugar Ester in Hydrophilic Organic Solvent." *Macromol. Biosci.* **2**, 233–237.
- Park, H. G. and H. N. Chang (2000). "Enzymatic regioselective synthesis of sucrose acrylate esters." *Biotechnology Letters* **22**, 39-42.
- Park, D. W., S. Haam, T. G. Lee, H.-S. Kim and W.-S. Kim (2004a). "Chemoenzymic synthesis of sugar-containing biocompatible hydrogels: Crosslinked poly(β -methylglucoside acrylate) and poly(β -methylglucoside methacrylate)." *Journal of Biomedical Materials Research*, **71 A**, 497-507.
- Park, D. W., Haam, S., Ahn, I. S., Lee, T. G., Kim, H. S. and Kim, W. S. (2004b). "Enzymatic esterification of β -methylglucoside with acrylic/methacrylic acid in organic solvents." *Journal of Biotechnology*, **107**, 151-160.

Plou FJ, Cruces MA, Ferrer M, Fuentes G, Pastor E, Bernabe M, Christensen M, Comelles F, Parra JL, Ballesteros A (2002). " Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent." *Journal of Biotechnology*, **96**, 55-66.

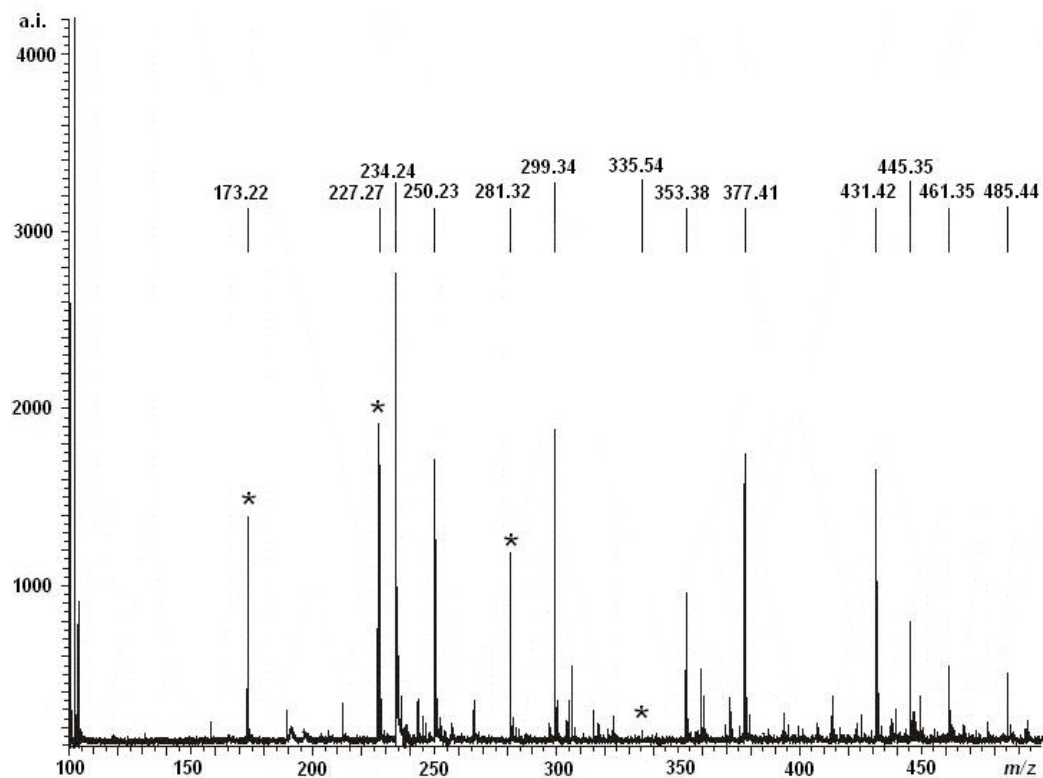
Santos, L. S., R. Haddad, N. F. Hoeehr, R. A. Pilli and M. N. Eberlin (2004). "Fast screening of low molecular weight compounds by thin-layer chromatography and \"on-spot\" MALDI-TOF mass spectrometry." *Analytical Chemistry* **76**, 2144-2147.

Supplementing Information:

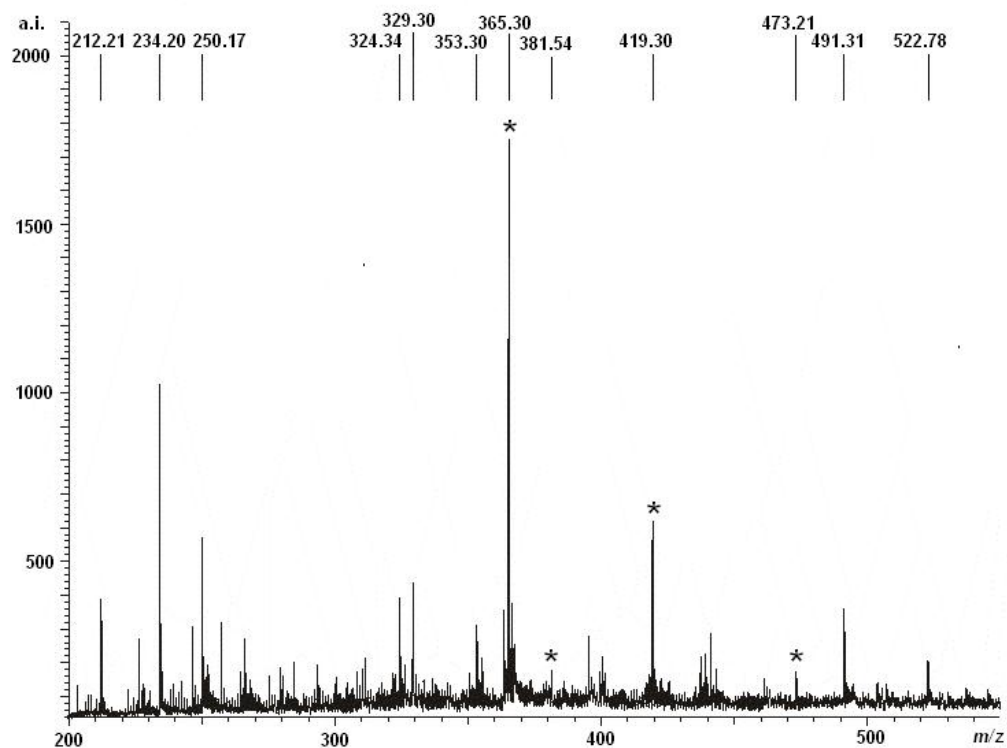
A



B



C



D

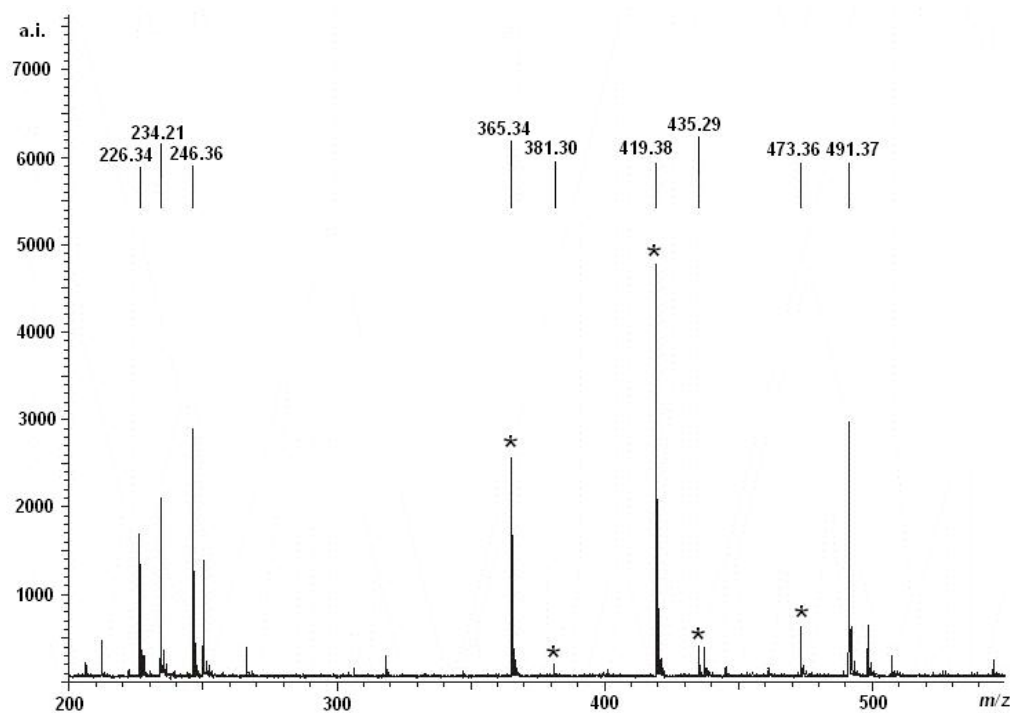


Figure S1. MALDI-TOF MS of reaction mixtures of lipase catalyzed esterifications of sugars in the presence of molecular sieves, taken after a reaction time of 48h. Asterisks indicate peaks from sugars and acrylates. A: D-glucose; B: D-xylose; C: sucrose; D: D-maltose.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

Este trabalho visou o desenvolvimento de processo de esterificação entre o ácido acrílico e carboidratos por biocatálise em meio orgânico na obtenção de acrilatos de açúcares.

Quanto à capacidade de esterificação e tolerância da enzima a reagentes da mistura reacional:

Na reação inicial entre n-butanol e ácido acrílico, utilizada como teste da capacidade de esterificação da CalB e para verificação da tolerância da mesma a presença de reagentes e solventes, foi obtida elevada conversão de n-butanol em acrilato de butila, em TBA: 61,4% de conversão quando 60 mg de lipase foi utilizada e 94,6% de conversão com 200 mg da mesma enzima, ambas reações à 55 °C, por 8 horas.

Foi observada discrepância entre o método de cálculo de conversão de butanol à acrilato de butila: cálculo pela massa de água formada ou pela massa de acrilato de butila, indicando que esta diferença parece ser devido à remoção da água pela matriz sólida da enzima imobilizada.

Quanto à solubilidade de açúcares em TBA:

No estudo de solubilização de carboidratos em TBA realizados em temperaturas de 45 a 65 °C, observou-se que a D-frutose era a mais solúvel, atingindo concentrações de 19,77 gL⁻¹ e o carboidrato menos solúvel observado foi a sacarose, com concentração máxima de 0,34 gL⁻¹, ambos a 65 °C.

Foi observado forte efeito da temperatura na solubilidade dos monossacarídeos, principalmente na região entre 45 a 55 °C, e menos pronunciada na região entre 55 a 65 °C.

Foi observado que a adição de ácido acrílico à mistura reacional promoveu a redução da solubilidade da frutose e da glicose, para 12,1 gL⁻¹ e 2,33 gL⁻¹, respectivamente, a 65 °C.

Para os dissacarídeos maltose e sacarose, foi observado forte efeito da temperatura na solubilidade dos mesmos.

Foi observada grande diferença de solubilidade entre a maltose e a sacarose: a maltose era 48 vezes mais solúvel que a sacarose em TBA a 45 °C, 18 vezes maior a 55 °C e 14 vezes maior a 65 °C.

A solubilidade da sacarose foi aumentada em 9 vezes com aumento de temperatura de 45 para 55 °C, de 0.04 para 0.34 g L⁻¹.

Quanto à esterificação enzimática entre ácido acrílico e carboidratos:

Planejamento experimental fatorial foi utilizado para estudo da reação enzimática, verificou-se maior conversão de ácido acrílico (%) na região do ponto central (razão molar 1:3 (DF:AA), 55 °C e 1,4 g de CalB. No entanto, foi observado falta de ajuste e de modelo não preditivo tanto nas reações de esterificação de DF e de DG, indicando a necessidade de continuidade do planejamento fatorial.

Quanto aos métodos analíticos empregados:

Tanto os reagentes como os produtos da reação foram analisados por CLAE, com exceção da água.

As reações enzimáticas para obtenção de ésteres foram acompanhadas por determinações analíticas por CLAE e MALDI-TOF MS.

A partir dos resultados por CLAE, foi verificada a formação predominante de monoésteres para todos os açúcares. Menor formação de diésteres foi observada para DF e DG e de triésteres para DF.

A partir dos resultados obtidos por MALDI-TOF MS, foram observados também triéster de xilose, diéster de sacarose e di e triéster de maltose.

A ordem de eluição por CLAE observada foi: carboidrato, monoéster, diéster (quando presente), triéster (quando presente), ácido acrílico e TBA.

Quanto ao efeito de peneira molecular:

Não foi observado efeito significativo de peneira molecular na esterificação dos carboidratos, ao contrário de diversos outros autores.

Como a esterificação direta entre o ácido acrílico e carboidratos não foi descrita na literatura, mas apenas esterificação entre açúcares metilados com ácido acrílico e casos de transesterificação, não foi possível comparar os dados obtidos com os descritos por outros pesquisadores.

CAPÍTULO VI

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar a conversão de ácido acrílico (%) por diferentes métodos enzimáticos;
- Obtenção de solubilidade de açúcares com maior concentração, principalmente a sacarose;
- Vantagens e desvantagens para obtenção de acrilato de açúcar a partir de reação de esterificação e/ou transesterificação;
- Determinar a estabilidade da enzima e reutilização dela na reação de esterificação;
- Maximizar a produção de produtos “tailor made” (monoéster, diéster ou outros).
- Utilizar o leito fixo encamisado contendo a enzima e outro leito opcionalmente, contendo peneira molecular;
- Purificação e caracterização dos produtos; analisar as posições regio e enantioméricas dos produtos utilizando o RMN;
- Polimerização e estudos dos polímeros obtidos.

Anexo I

Legislação brasileira.

1. Gerência Geral de COSMÉTICOS - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

Consultar a legislação pertinente da GGCOS, principalmente a Lista Restritiva (RDC nº 215/2005) e a Lista Negativa (Res. 79/00, Anexo VI), além dos compêndios cosméticos. Poderá ser feita consulta ao site <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/legis/index.htm>

Nº ORD	SUBSTÂNCIAS	RESTRIÇÕES			CONDIÇÕES DE USO E ADVERTÊNCIAS QUE DEVEM CONSTAR NO RÓTULO
		CAMPO DE APLICAÇÃO E/OU UTILIZAÇÃO	CONCENTRAÇÃO MÁXIMA AUTORIZADA NO PRODUTO FINAL	OUTRAS LIMITAÇÕES E REQUERIMENTOS	
A	b	c	d	E	f
1a.	Ácido bórico, Boratos e Tetraboratos (BORIC ACID)	a) Talcos. b) Produtos para higiene bucal. c) Outros produtos (com exceção dos produtos para banho e para ondulação dos cabelos).	a) 5% (p/p calculado como ácido bórico). b) 0,1% (p/p calculado como ácido bórico). c) 3% (p/p calculado como ácido bórico).	a) - Não utilizar em produtos para crianças menores de 3 anos de idade. - Não usar em pele lesionada ou irritada se o teor de boratos solúveis livre exceder 1,5% calculado como ácido bórico (p/p). b) - Não usar em produtos para crianças menores de 3 anos de idade. c) - Não usar em produtos para crianças menores de 3 anos de idade. Não usar em pele lesionada ou irritada se o teor de boratos solúveis livre exceder 1,5% calculado como ácido bórico (p/p).	a) - Não usar em crianças menores de 3 anos de idade. - Não usar em pele lesionada ou irritada. b) - Não usar em crianças menores de 3 anos de idade. - Não ingerir. c) - Não usar em crianças menores de 3 anos de idade. - Não usar em pele lesionada ou irritada.
1b	Tetraboratos	a) Produtos para banho. b) Produtos para ondulação dos cabelos.	a) 18% (p/p calculado como ácido bórico). b) 8% (p/p calculado como ácido bórico).	a) Não utilizar em produtos para crianças menores de 3 anos de idade. b) Enxaguar abundantemente.	a) Não usar no banho de crianças menores de 3 anos de idade. b) Enxaguar abundantemente.

2a	Ácido tioglicólico e seus sais (THIOGLYCOLIC ACID)	a) Produtos para alisar ou ondular os cabelos. 1- Uso geral. 2- Uso profissional. b) Depilatórios. c) Outros produtos para cuidado dos cabelos que são removidos após a aplicação.	a) 1) 8% pronto para uso pH 7 a 9,5 2) 11% pronto para uso pH 7 a 9,5 b) 5% pronto para uso pH 7 a 12,7 c) 2% pronto para uso pH 7 a 9,5 (Porcentagens calculadas como ácido tioglicólico)	a) e c) No MODO DE USO devem constar obrigatoriamente as seguintes informações: - Evitar contato com os olhos. - Em caso de contato, enxaguar com água imediata e abundantemente e procurar um médico. - Usar luvas adequadas. b) No MODO DE USO devem constar obrigatoriamente as seguintes informações: - Evitar o contato com os olhos; - No caso de contato com os olhos, lavar com água imediata e abundantemente e consultar um médico.	a) b) e c) Contém sais de ácido tioglicólico. Seguir as instruções de uso. Manter fora do alcance de crianças. Só para uso profissional (quando for o caso).
2b	Ésteres do ácido tioglicólico	Produtos para alisar ou ondular os cabelos. 1) Uso geral. 2) Uso profissional.	1) 8% pronto para uso pH 6 a 9,5 2) 11% pronto para uso pH 6 a 9,5 (Porcentagens calculadas como ácido tioglicólico)	a) 1 e 2 No MODO DE USO devem constar obrigatoriamente as seguintes informações: - Pode causar sensibilização por contato com a pele - Evitar o contato com os olhos - No caso de contato com os olhos, lavar com água imediata e abundantemente e consultar um médico; - Usar luvas adequadas.	1 e 2 Contém ésteres de ácido tioglicólico. Seguir as instruções de uso. Manter fora do alcance de crianças. Usar luvas adequadas. Só para uso profissional (quando for o caso)
3	Ácido oxálico, seus ésteres e sais alcalinos (OXALIC ACID)	Produtos de uso profissional para cuidados dos cabelos.	5%		Só para uso profissional.
4	Amônia (AMMONIA)		6% calculados como NH ₃		Acima de 2%: Contém amônia.
5	Tosilcloramida sódica (*) (CHLORAMINE T)		0,2 %		

				dico.	
45	Ácido undecilênico e seus sais de zinco, amidas, monoetanolamidas e sulfosuccinatos. (UNDECYLENIC ACID)	Produtos para combater a caspa.	2%	Como conservante consultar lista específica.	
46	Cetoconazol (KETOCONAZOLE)	Produtos para combater a caspa.	1%		
49	1-hidroxi-2-(1H) piridinotionato de zinco (ZINC PYRITHIONE)	a) Produtos para combater a caspa com enxágüe. b) Produtos para combater a caspa sem enxágüe.	a) 2% b) 0,25%	Como conservante consultar lista específica	
50	1-Hidroxi-4-metil-6-(2,4,4-trimetilpentil-2-(1H)-Piridona e sal de monoetanolamina (PIROCTONE OLAMINE)	Produtos para combater a caspa com enxágüe.	1%	Como conservante consultar lista específica	
51	Ácido salicílico (SALICYLIC ACID)	a) Produtos para combater a caspa. b) Produtos para combater a acne.	a) 3% b) 2%	Como conservante consultar lista específica.	b) Para uso externo apenas.
58	Metanol (METHYL ALCOHOL)	Desnaturante para etanol e isopropanol.	5 % máximo calculado como porcentagem de etanol e isopropanol.		
60	Monofluorofosfato de amônio (AMMONIUM MONOFLUOROPHOSPHATE)	a) Dentífrícios. b) Enxaguatório bucal.	a) 0,15% expresso como flúor. Em caso de mistura com outros compostos fluorados permitidos, a concentração máxima total de flúor não excederá 0,15%. b) 202,5 - 247,5 ppm.		(a) e (b) Contém monofluorofosfato de cálcio. (b) Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade.

Lista provisória I - Até 31/12/2007

Nº ORD	SUBSTÂNCIAS	RESTRIÇÕES			CONDIÇÕES DE USO E ADVERTÊNCIAS QUE DEVEM CONSTAR NO RÓTULO
		CAMPO DE APLICAÇÃO E/OU UTILIZAÇÃO	CONCENTRAÇÃO MÁXIMA AUTORIZADA NO PRODUTO FINAL	OUTRAS LIMITAÇÕES E EXIGÊNCIAS	
a	b	c	d	e	f
14	Hidroquinona (#) (HYDROQUINONE)	a) Substância Corante de oxidação para cabelos: 1) Uso geral. 2) Uso profissional. b) Agente para clarear a pele localmente.	a) 2% b) 2%	(a) a	a) 1 Não usar para tingir em cílios ou sobrancelhas. Evitar contato com os olhos. Em caso de contato, enxaguar com água abundantemente e consultar um médico. Contém hidroquinona 2 Só para uso profissional. Contém hidroquinona. Evitar contato com os olhos. Em caso de contato, enxaguar com água abundantemente e consultar um médico. b) Contém hidroquinona. Evitar contato com os olhos. Aplicar sobre pequenas áreas. Em caso de irritação, suspender o uso.
					Não usar em crianças com menos de 12 anos.

Lista provisória II - Fica proibida sua utilização em produtos cosméticos a partir de 31 de julho de 2005 e a comercialização a partir de 31 de janeiro de 2006.

Nº ORD	SUBSTÂNCIAS	RESTRIÇÕES			CONDIÇÕES DE USO E ADVERTÊNCIAS QUE DEVEM CONSTAR NO RÓTULO
		CAMPO DE APLICAÇÃO E/OU UTILIZAÇÃO	CONCENTRAÇÃO MÁXIMA AUTORIZADA NO PRODUTO FINAL	OUTRAS LIMITAÇÕES E EXIGÊNCIAS	
a	b	c	d	e	f
57	Acetato de chumbo (LEAD ACETATE)	Tintura capilar.	0,6 % calculados como chumbo.		Manter fora do alcance de crianças. Evitar contato com os olhos. Lavar as mãos após o uso. Contém acetato de chumbo. Não usar em cílios, sobrancelhas e bigodes. Em caso de irritação interromper o uso.

2. Gerência Geral de ALIMENTOS - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA

Os solventes permitidos na elaboração de aromas e corantes utilizados em alimentos constam da Resolução nº. 04, de 1988, e da Resolução nº. 104, de 1999. Essas legislações podem ser consultadas nos seguintes endereços: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/04_cns.pdf e <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=102>, respectivamente.