

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
ESCOLA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA REDONDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

ACÁCIO RAPHAEL AGUIAR MORAES

METODOLOGIAS ALTERNATIVAS NA SÍNTESE DE SURFACTANTES DE  
AÇÚCARES

VOLTA REDONDA  
2017

ACÁCIO RAPHAEL AGUIAR MORAES

**METODOLOGIAS ALTERNATIVAS NA SÍNTESE DE SURFACTANTES DE  
AÇÚCARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Alessandra Rodrigues Rufino

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Alves Carneiro

Volta Redonda, RJ

2017

M827 Moraes, Acácio Raphael Aguiar.

Metodologias alternativas na síntese de surfactantes de açúcares / Acácio Raphael Aguiar Moraes – Volta Redonda, 2017.

123 f.: il

Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) –  
Universidade Federal Fluminense

Orientador: Alessandra Rodrigues Rufino

Coorientador: Patrícia Alves Carneiro

1. Tecnologia ambiental. 2. Catálise enzimática. 3. Biossurfactantes. 4. Micro-ondas. 5. Ultrassom. I. Rufino, Alessandra Rodrigues. II. Carneiro, Patrícia Alves. III. Título.

CDD 628

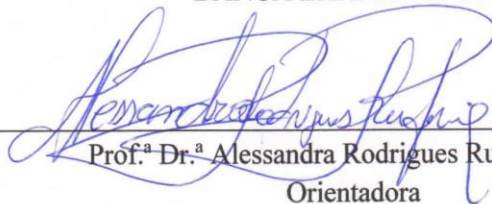
ACÁCIO RAPHAEL AGUIAR MORAES

**METODOLOGIAS ALTERNATIVAS NA SÍNTESE DE SURFACTANTES DE  
AÇÚCARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.


Aprovado em 17 de agosto de 2017

BANCA EXAMINADORA



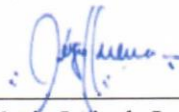
---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Rodrigues Rufino - UFF  
Orientadora



---

Prof. Dr. Ricardo de Freitas Branco - UFF



---

Prof. Dr. Sérgio Luiz de Lucena - UNIOESTE

Volta Redonda  
2017

Aos meus avós, Mariana Balieiro Aguiar e  
Orlandino de Souza Aguiar

## **AGRADECIMENTOS**

Eu não teria desenvolvido esse trabalho sem a ajuda de várias pessoas e gostaria de agradecê-las.

Em primeiro lugar, agradeço à minha família: minha mãe, Cláudia Aparecida, que passou o amor à ciência pela genética; meu pai, Isaac Moraes, que me ensinou a ter garra e lutar pelo que quero; meu irmão, Leonardo Moraes, que me obrigou (e obriga) a ser um exemplo; e a meus avós, Mariana e Orlandino Aguiar, que me ensinaram a importância da unidade familiar, e me confortaram com suas comidas e canções tiradas no violão.

Também quero agradecer a minha segunda família, aquela que escolhi, meus amigos, por caminharem ao meu lado durante essa jornada. Aos amigos de curso e universidade, pelos momentos especiais que compartilhamos, estudando ou nos divertindo e aos amigos de fora da universidade pelo apoio que recebi para todas as reclamações que fiz (não foram poucas) e pela compreensão em todas as minhas ausências (não foram poucas).

Agradeço à Universidade Federal Fluminense que me proporcionou essa oportunidade, com a esperança de que eu esteja à altura de retribuir ao meu país o que dele recebi. Agradeço ao corpo docente, técnico, administrativo e laboral do nosso instituto, que através de seu trabalho duro me proporcionaram condições de desenvolver a minha pesquisa. Em especial, gostaria de agradecer à minha orientadora Alessandra Rufino pela paciência em compartilhar comigo as coisas que aprendeu na profissão e na vivência, e por me incentivar sempre para dar o melhor de mim.

Gratidão.

*A história está repleta de pessoas que, como resultado do medo, ou por ignorância, ou por cobiça de poder, destruíram conhecimento de imensurável valor que em verdade pertenciam a todos nós. Nós não devemos deixar isso acontecer de novo.*

(Carl Sagan)

## RESUMO

Ésteres de açúcar são moléculas que atuam como biossurfactantes possuindo a propriedade de atuar na interface de misturas heterogêneas, uma característica importante para diversos segmentos industriais, com destaque para as indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos. O emprego de materiais provenientes de fontes renováveis, como o ácido oleico e o xilitol atribuem valor à essa tecnologia. Entretanto, o método clássico de síntese dos surfactantes emprega catalisadores ácidos e altas temperaturas, características contrárias aos preceitos da química verde. Aliando as tecnologias da catálise enzimática, que suaviza as condições reacionais, e o uso de fontes alternativas de aquecimento, como o ultrassom e o micro-ondas, é possível desenvolver uma metodologia sintética menos agressiva ao meio ambiente. O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo da síntese de monoésteres de xilitol e glicerol para verificar a viabilidade do uso da catálise enzimática associado ao aquecimento do meio reacional por banho de ultrassom ou reator de micro-ondas. Nos experimentos realizados foram estudados os rendimentos reacionais para a obtenção de monoésteres de xilitol e glicerol através da catálise enzimática empregando a lipase Novozym 435. As reações levaram a um rendimento de 96% em 2 h e 75% em 1,5 h utilizando-se reator de micro-ondas e banho de ultrassom respectivamente. Ainda foi estudado o reuso da enzima em reator de micro-ondas com obtenção de resultados satisfatórios (superiores a 77%) até o 3º ciclo. Adicionalmente, foram realizados experimentos com variação de ácidos graxos (ácidos oleico, adípico e butírico) e poliálcoois (xilitol, glicerol e derivados protegidos). Na análise da reação em CLAE foi possível verificar seletividades entre 60% e 70% em tempos de cerca de 20 minutos para as reações de esterificação do ácido oleico com os poliálcoois desprotegidos. Para as vias quimioenzimáticas, a proteção do poliálcool alcançou uma seletividade de 83% para a formação do mono-oleato de glicerol.

Palavras-chave: Catálise Enzimática. Biossurfactantes. Micro-ondas. Ultrassom



## ABSTRACT

Sugar esters are molecules that act as biosurfactants possessing the property of acting at the interface of heterogeneous mixtures, an important characteristic for several industrial segments, especially the pharmaceutical, food and cosmetic industries. The use of materials from renewable sources such as oleic acid and xylitol attach value to this technology. However, the classical method of synthesis of surfactants employs acid catalysts and high temperatures, characteristics contrary to the precepts of green chemistry. Combining the technologies of enzymatic catalysis, which softens the reaction conditions, and the use of alternative heating sources such as ultrasound and microwave, it is possible to develop a synthetic methodology less aggressive to the environment. The objective of this work was to perform a study of the synthesis of xylitol and glycerol monoesters to verify the feasibility of the use of enzymatic catalysis associated to the heating of the reaction medium by ultrasonic bath or microwave reactor. In the experiments carried out, the reaction yields for the preparation of monoesters of xylitol and glycerol were studied by enzymatic catalysis using Novozym 435 lipases. The reactions led to a yield of 96% in 2 h and 75% in 1,5 h using a reactor Microwave and ultrasonic bath respectively. The reuse of the enzyme in a microwave reactor with satisfactory results (above 77%) up to the 3rd cycle was also studied. In addition, experiments were carried out with variation of fatty acids (oleic, adipic and butyric acids) and polyalcohols (xylitol, glycerol and protected derivatives). In the analysis of the reaction in HPLC it was possible to verify selectivities between 60% and 70% in times of about 20 minutes for the esterification reactions of oleic acid with the deprotected polyalcohols. For the chemo-enzymatic routes, the protection of the polyalcohol achieved a selectivity of 83% for the formation of the glycerol monooleate.

Keywords: Enzymatic Catalysis. Biosurfactants. Microwave. Ultrasound

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura genérica dos surfactantes, p.20
- Figura 2 - Estrutura de uma micela, p.20
- Figura 3 - Estrutura orgânica da molécula de xilitol, p.23
- Figura 4 - Métodos de produção do xilitol, p.24
- Figura 5 - Estrutura orgânica da molécula de xilitol, p.25
- Figura 6 - Mercado mundial do glicerol, p.26
- Figura 7 - Estrutura da molécula de ácido oleico, p.28
- Figura 8 - Estrutura da molécula de ácido adípico, p.29
- Figura 9 - Estrutura da molécula de ácido adípico, p.30
- Figura 10 - Hidrólise de triglicerídeos por lipase, p.33
- Figura 11 - Reações catalisadas por lipases, p.34
- Figura 12 - O espectro eletromagnético, p.37
- Figura 13 - Banho de ultrassom Eco-Sonics Ultronique Q1.8/40A, p.41
- Figura 14 - Reator de micro-ondas Anton Paar modelo Monowave 300 MAS 24, p.42
- Figura 15 - Aparentagem para proteção do xilitol, p.43
- Figura 16 - Mecanismo proposto para a proteção do xilitol, p.51
- Figura 17 - Reação global proteção do xilitol, p.51
- Figura 18 - Reação global proteção do glicerol, p.52
- Figura. 19 - Mecanismo proposto para a síntese de cloretos de ácido, p.53
- Figura. 20 - Rota sintética para a formação do mono-oleato de xilitol protegido via química, p.53
- Figura. 21 - Mono-oleato de xilitol, p.54
- Figura. 22 - Rota sintética para a formação do mono-oleato de glicerol protegido via química, p.55
- Figura. 23 - Fórmula estrutural do mono-oleato de glicerol, p.55
- Figura 24 - Reação global de esterificação enzimática do ácido oleico e xilitol empregando Novozym 435, p.56
- Figura 25 - Rendimento (%) por hora de reação na esterificação do ácido oleico com xilitol em micro-ondas empregando Novozym 435, p.57
- Figura 26 - Rendimento (%) por hora de reação na esterificação do ácido oleico com xilitol em ultrassom empregando Novozym 435, p.59

Figura 27 - Acompanhamento por consumo percentual de ácido oleico de cinco ciclos de utilização da lipase Novozym 435, p.64

Figura 28 - Acompanhamento por consumo percentual de ácido oleico para cinco ciclos de utilização da lipase Novozym 435, p.64

Figura 29 - Reação global de esterificação enzimática do ácido adípico e xilitol protegido empregando Novozym 435, p.65

Figura 30 - Gráfico da conversão relativa do monoéster de xilitol empregando ácido oleico para diferentes tempos reacionais, p.69

Figura 31- Gráfico da conversão relativa do monoéster de xilitol protegido empregando ácido oleico para diferentes tempos reacionais, p.70

Figura 32 - Gráfico da conversão relativa do monoéster de glicerol empregando ácido oleico para diferentes tempos reacionais, p.72

Figura 33 - Gráfico da conversão relativa do monoéster de glicerol protegido empregando ácido oleico para diferentes tempos reacionais, p.73

Figura 34 - Rendimento (%) por hora de reação na esterificação do ácido oleico com xilitol em ultrassom empregando Novozym 435 com t-BuOH e iso-octano, p.75

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Propriedades do xilitol, p.23
- Tabela 2 - Propriedades do glicerol, p.26
- Tabela 3 - Propriedades do ácido oleico, p.28
- Tabela 4 - Composição mássica do ácido oleico em diversos tipos de óleos vegetais, p.29
- Tabela 5 - Propriedades do ácido adípico, p.30
- Tabela 6 - Propriedades do ácido butírico, p.31
- Tabela 7 - Principais grupos enzimáticos, p.33
- Tabela 8 - Propriedades da enzima Novozym 435, p.35
- Tabela 9 - Usos e aplicações das lipases, p.36
- Tabela 10 - Fator de Perda para os principais solventes orgânicos, p.39
- Tabela 11 - Condições reacionais para as reações de proteção de poliálcoois, p.43
- Tabela 12 - Condições reacionais para a síntese de cloretos de ácido oleico, p.44
- Tabela 13 - Condições reacionais para síntese dos ésteres de xilitol e glicerol via química, p.45
- Tabela 14 - Condições reacionais para síntese via enzimática dos ésteres de xilitol com diferentes fontes de aquecimento, p.46
- Tabela 15 - Condições reacionais para síntese enzimática dos ésteres de xilitol empregada em 5 ciclos consecutivos da reação, p.47
- Tabela 16 - Condições reacionais para síntese via enzimática dos ésteres de xilitol com diferentes ácidos graxos, p.48
- Tabela 17 - Condições reacionais para síntese via enzimática dos ésteres de xilitol com diferentes poliálcoois, p.49
- Tabela 18 - Condições reacionais para síntese via enzimática dos ésteres de xilitol empregando iso-octano como solvente reacional, p.50
- Tabela 19 - Concentrações (mol.L<sup>-1</sup>) de ácido oleico consumido por hora de reação e rendimento correspondente na esterificação do ácido oleico com xilitol em micro-ondas, empregando Novozym 435, p.57
- Tabela 20 - Concentrações (mol.L<sup>-1</sup>) de ácido oleico consumido por hora de reação e rendimento correspondente na esterificação do ácido oleico com xilitol em ultrassom, empregando Novozym 435, p.59
- Tabela 21 - Resultados em concentração molar por hora para 5 ciclos de uso da Novozym 435 nas esterificações do ácido oleico com xilitol em reator de micro-ondas, p.61

Tabela 22 - Conversão percentual da concentração de ácido oleico para 5 ciclos de uso da Novozym 435 na esterificação com aquecimento por micro-ondas por hora, p.61

Tabela 23 - Concentrações (mol.L<sup>-1</sup>) de ácido butírico consumido por hora de reação e rendimento correspondente na esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom, empregando Novozym 435, p.66

Tabela 24 - Tempos de retenção de referência para as análises em CLAE deste trabalho para os monoésteres formados por ácido oleico e poliálcoois diversos, p.68

Tabela 25 - Conversão relativa do monoéster de xilitol empregando ácido oleico, calculada com base na área de integração dos picos do espectro obtido por CLAE para diferentes tempos reacionais, p.68

Tabela 26 - Conversão relativa do monoéster de xilitol protegido empregando ácido oleico, calculada com base na área de integração dos picos do espectro obtido por CLAE para diferentes tempos reacionais, p.70

Tabela 27 - Rendimento reacional no tempo máximo para o monoéster obtido empregando ácido oleico e, como substrato, o xilitol e o xilitol protegido, p.71

Tabela 28 - Conversão relativa do monoéster de glicerol empregando ácido oleico, calculada com base na área de integração dos picos do espectro obtido por CLAE para diferentes tempos reacionais, p.71

Tabela 29 - Conversão relativa do monoéster de glicerol protegido empregando ácido oleico, calculada com base na área de integração dos picos do espectro obtido por CLAE para diferentes tempos reacionais, p.72

Tabela 30 - Rendimento reacional no tempo máximo para o monoéster obtido empregando ácido oleico e, como substrato, o glicerol e o glicerol protegido, p.73

Tabela 31 - Rendimento calculado com base no consumo de ácido oleico para a reação de esterificação do xilitol empregando a Novozym 435 e banho de ultrassom em diferentes solventes, p.74

Tabela 32 - Condições reacionais nas sínteses via clássica e via enzimática empregadas no presente trabalho, p. 76

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsufóxido

NaOH – hidróxido de sódio

NMP - Metilpirrolidona

POS-PVA – Polissiloxano-álcool Polivinílico

PPTS – ácido p-toluenossulfônico

RMN  $^{13}\text{C}$  – ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN  $^1\text{H}$  – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

rpm – rotações por minuto

t-BuOH – terc-butanol

THF – Tetraidrofurano

TLC – Cromatografia de Camada Fina (*Thin Layer Chromatography*, do inglês)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p. 17

2 OBJETIVOS, p. 19

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, p. 20

3.1 SURFACTANTES, p. 20

3.2 POLIÁLCOOIS, p. 22

3.2.1 Xilitol, p. 22

3.2.2 Glicerol, p. 25

3.3 ÁCIDOS GRAXOS, p. 27

3.3.1 Ácido Oleico, p. 28

3.3.2 Ácido Adípico, p. 29

3.3.3 Ácido Butírico, p. 30

3.4 CATÁLISE ENZIMÁTICA, p. 31

3.4.1 Lipases, p. 33

3.5 MICRO-ONDAS, p. 37

3.6 ULTRASSON, p. 39

4 METODOLOGIA, p. 40

4.1 SÍNTESE DE CETASIS (REAÇÕES DE PROTEÇÃO), p. 42

4.2 SÍNTESE DE ÉSTERES DE AÇÚCARES VIA QUÍMICA, p. 43

4.2.1 Síntese do cloreto de ácido oleico, p. 43

4.2.2 Síntese do mono-oleato de xilitol, p. 44

4.2.3 Síntese de mono-oleato de glicerol, p. 44

4.3 ESTERIFICAÇÃO POR CATÁLISE ENZIMÁTICA, p. 45

4.3.1 Avaliação do rendimento da esterificação com catálise enzimática em diferentes fontes de aquecimento, p. 45

4.3.2 Avaliação do rendimento da esterificação com catálise enzimática em ciclos consecutivos de reuso da enzima, p. 46

4.3.3 Obtenção de ésteres de xilitol com diferentes ácidos graxos, p. 47

4.3.4 Avaliação da seletividade na obtenção de monoésteres de ácido oleico com diferentes poliálcoois e poliálcoois protegidos, p. 48

4.3.5 Avaliação do rendimento reacional da esterificação com catálise enzimática em diferentes solventes, p. 49

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 50

5.1 SÍNTESE DE CETASIS (REAÇÕES DE PROTEÇÃO), p. 50

5.2 SÍNTESE DE ÉSTERES DE AÇÚCARES VIA QUÍMICA, p. 52

5.2.1 Síntese do cloreto de ácido oleico, p. 53

5.2.2 Síntese do mono-oleato de xilitol, p. 53

5.2.3 Síntese de mono-oleato de glicerol, p. 54

5.3 ESTERIFICAÇÃO POR CATÁLISE ENZIMÁTICA, p. 55

5.3.1 Avaliação do rendimento da esterificação com catálise enzimática em diferentes fontes de aquecimento, p. 56

5.3.1.1 Esterificação do ácido oleico com xilitol via catálise enzimática em reator de micro-ondas, p. 56

5.3.1.2 Esterificação do ácido oleico com xilitol via catálise enzimática em banho de ultrassom, p. 59

5.3.2 Avaliação do rendimento da esterificação com catálise enzimática em ciclos consecutivos de reuso da enzima, p. 60

5.3.3 Obtenção de ésteres de xilitol com diferentes ácidos graxos, p. 65

5.3.3.1 Esterificação do ácido adípico com xilitol através de catálise enzimática em banho de ultrassom, p. 65

5.3.3.2 Esterificação do ácido butírico com xilitol através de catálise enzimática em banho de ultrassom, p. 66

5.3.4 Avaliação da seletividade na obtenção de monoésteres de ácido oleico com diferentes poliálcoois e poliálcoois protegidos, p. 67

5.3.5 Avaliação do rendimento reacional da esterificação com catálise enzimática em diferentes solventes, p. 74

6 CONCLUSÃO, p. 76

REFERÊNCIAS CONSULTADAS, p. 78

APÊNDICE I, p. 85

APÊNDICE II, p. 95

APÊNDICE III, p. 110

APÊNDICE IV, p. 120



## 1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes compõem uma classe de moléculas caracterizadas por sua capacidade de atuar na interface óleo-água, possuindo uma estrutura composta de uma parte polar, comumente chamada “cabeça”, e uma parte apolar, conhecida como “cauda”. Diversos compostos orgânicos atuam como surfactantes, com destaque dentre eles para os ésteres de açúcares, materiais não-iônicos, insípidos, inodoros, biodegradáveis, não tóxicos e não irritantes (NAKAYMA *et al.*, 2015; LIN, 2015). O conjunto de características desses materiais os torna interessantes para sua aplicação em indústrias de cosméticos, alimentícia e farmacêutica. Na produção clássica, os emulsificantes são sintetizados a partir de reações de esterificações empregando ácidos graxos, com cadeias de diversos comprimentos, e polialcoóis derivados de açúcares naturais. Devido à gama de combinações possíveis empregando diferentes substratos, os mais variados ésteres podem ser obtidos. Alguns estudos apontam a obtenção de ésteres com atividade antimicrobiana a partir do emprego de ácido oleico como substrato, despertando o interesse na aplicação desses compostos na formulação de fármacos (ABDELKADER *et al.*, 2016).

O xilitol é um poliálcool promissor para o uso como substrato na síntese de ésteres. Sua principal fonte de obtenção industrial é pela redução da xilose extraída da madeira. As indústrias altamente consumidoras desse material são as alimentícias e farmacêuticas, que o empregam na composição de diversos alimentos direcionados aos pacientes com diabetes, visto que ele é metabolizado no organismo por uma via independente da insulina (ALBURQUEQUE *et al.*, 2014).

O glicerol, outro poliálcool, é produzido a partir da hidrólise de triacilglicerídeos no organismo. É um dos principais subprodutos em diversas indústrias, com destaques pra indústria dos sabões e do biodiesel. Por outro lado é uma matéria-prima presente nos mais diversos setores industriais, com enorme destaque à sua empregabilidade nos ramos farmacêuticos e cosméticos (MARTIN *et al.*, 2011)

A metodologia para produção industrial de ésteres, pode apresentar dificuldades na sua implementação, já que as vias clássicas de síntese são realizadas em condições de altas temperaturas e com o emprego de catalisadores agressivos (ácidos fortes). O produto reacional precisa ainda passar por etapas de purificação e destilação para a remoção dos poliésteres formados como subprodutos por vias secundárias e que reduzem as propriedades

emulsificantes do monoéster. Essa necessidade de etapas adicionais para a obtenção de um produto final refinado e de qualidade encarece o processo total (GHAMGUI *et al.*, 2006).

Uma alternativa interessante para a produção desses ésteres é o uso de catálise enzimática, já que enzimas são biopolímeros capazes de promover reações orgânicas em temperaturas e pressões próximas às ambientes, além de promover maior especificidade na obtenção do produto final, com quimio-enantiosseletividade (BENKOVIC *et al.*, 2003). As reações de esterificação são melhores promovidas pelas enzimas pertencentes à subclasse das lipases, caracterizadas por sua capacidade de atuar na interface óleo-água (LERIN *et al.*, 2014). Reações de esterificação empregando o glicerol e o xilitol como precursores na síntese de ésteres derivados de ácido oleico levaram a rendimentos da ordem de 90% (RUFINO *et al.*, 2009).

Apesar das vantagens associadas ao rendimento e à temperatura, o uso de lipases leva a tempos reacionais mais longos comparados às vias clássicas de síntese. Uma alternativa que propõe a redução desses tempos reacionais é o emprego do reator de micro-ondas e do banho de ultrassom como alternativas ao aquecimento.

Publicações acerca do emprego do reator de micro-ondas e banho de ultrassom na síntese orgânica estão aumentando, principalmente nos últimos anos, devido às inúmeras vantagens que o emprego dessas tecnologias traz, destacando-se principalmente a redução de tempo reacional associado à redução do volume de solvente ou até mesmo sua eliminação. Esses benefícios vão ao encontro do interesse industrial quanto à redução do uso de matérias-primas empregadas e à busca por processos energeticamente mais sustentáveis (RATHI *et al.*, 2015; LERIN *et al.*, 2014).

Neste trabalho foi proposto um estudo das reações de esterificação de ácidos graxos (butírico, adípico e oléico) com polialcóis empregando a catálise enzimática promovida pela lipase comercial Novozym 435 (*Candida antarctica*) imobilizada em resina acrílica. Visto a necessidade de se reduzirem os tempos reacionais das reações de esterificações enzimáticas, foram utilizadas metodologias alternativas para o aquecimento da reação por meio de reator de micro-ondas e banho de ultrassom.

Empregando-se a catálise enzimática foram realizados estudos dos parâmetros reacionais, tais como tempo, fonte alternativa de aquecimento, ciclo de reuso da enzima e natureza do substrato.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal estabelecer uma metodologia para obtenção de monoésteres de açúcares, sendo necessário, portanto, atingir os seguintes objetivos específicos:

- (i) Determinar o melhor tempo para rendimento máximo da reação enzimática no uso das fontes de aquecimento por irradiação micro-ondas e por banho em ultrassom;
- (ii) Avaliar os rendimentos reacionais para a reutilização da enzima comercial Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica*) em ciclos consecutivos reacionais.
- (iii) Estudar a obtenção de derivados de ácidos graxos diferentes, empregando os ácidos oleico, adípico e butírico na esterificação do xilitol;
- (iv) Analisar a seletividade da enzima comparando-se os resultados de rendimento na síntese dos monoéster para o xilitol, o glicerol, e seus derivados protegidos, utilizando o ácido oleico;
- (v) Determinar a partir do rendimento o melhor solvente a ser empregado na síntese de mono-oleatos de xilitol com aquecimento em ultrassom;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 SURFACTANTES

Os surfactantes são compostos orgânicos que apresentam em suas estruturas uma parte hidrofílica, com afinidade ao meio polar, e uma parte hidrofóbica, com afinidade ao meio apolar, conforme apresentado na fig. 1.

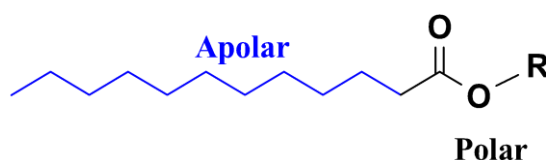


Figura 1- Estrutura genérica dos surfactantes

Devido à sua estrutura, os surfactantes podem atuar na interface entre uma mistura óleo-água, reduzindo a sua tensão superficial. Além dessa propriedade, a partir de dada quantidade de material, quantificada pela concentração micelar crítica, os surfactantes passam a formar micelas no interior do meio polar que são capazes de adsorver material apolar. A estrutura de uma micela é apresentada na figura 2 (LONG *et al.*, 2015). Nessa conformação um surfactante que solvata uma molécula orgânica pode mobilizá-la em água. Essa propriedade é explorada nos sabões de uso doméstico ou industrial, compostos carboxilados ou sulfonados que permitem através da formação de micelas tanto que a água permeie as fibras dos tecidos quanto a solubilização de óleos e gorduras na própria água.



Figura 2 - Estrutura de uma micela (LONG *et al.*, 2015)

A tecnologia dos surfactantes já é conhecida e explorada pela indústria e tratada na literatura especializada. Em seu trabalho, Hasanbeigi e Price (2015) descrevem o emprego de surfactantes na remoção de resíduos industriais no setor têxtil, discutindo as vantagens e desvantagens de mais de quinze técnicas diferentes. As tecnologias em geral levam à economia de água, energia e tempo promovendo taxas de eliminação de resíduo maiores que as técnicas que não fazem uso de surfactantes. Outro trabalho de revisão na área, apresentado por Olajire (2013), discorre sobre uma gama de metodologias que possibilitam a aplicação de surfactante na recuperação do petróleo. O maior empecilho para a aplicação dessas técnicas, citado recorrentemente, é a dificuldade de sua adaptação aos processos industriais causada por falta de pesquisa científica na área. As tecnologias de uso de surfactantes podem ser também exploradas por indústrias mais exigentes. A indústria farmacêutica emprega ésteres de sucrose como solubilizantes e estabilizantes em fármacos. Outros ésteres também são comumente utilizados como parte da formulação de remédios, aprimorando a distribuição do princípio ativo empregado (SZÜTS *et al.*, 2012).

A síntese clássica de surfactantes, entretanto, faz uso necessário de solventes que podem causar intoxicação pela sua presença residual no produto comercial, como o benzeno. O alto custo para a remoção do solvente residual desses materiais torna a tecnologia mais dispendiosa e menos interessante. O cenário atual de pesquisa incentiva a busca de alternativas que possibilitem a redução no volume de solventes e o emprego de materiais não-tóxicos (QUENEAU *et al.*, 2008).

A pesquisa por metodologias para síntese de surfactantes busca adaptar-se às exigências contemporâneas no que diz respeito à redução de danos e impactos ambientais. As pesquisas mais recentes têm feito um esforço na investigação dos processos de produção de biossurfactantes, utilizando materiais biodegradáveis, aproveitamento de biomassas residuais e/ou e matéria-prima renovável. A literatura já propõe o emprego de biossurfactantes em diversos setores econômicos, dentre eles ramos industriais conhecidos como potenciais geradores de impactos ambientais, como a mineração, construção civil e fabricação de tintas e corantes (SZÜTS *et al.*, 2012).

Devido à sua menor agressividade como produtos químicos, os biossurfactantes são de grande interesse para indústrias de química fina. Na indústria cosmética, ésteres de açúcares são responsáveis pela estabilização de loções óleo-água e de emulsões água-óleo por possuírem excelente atividade superficial (KHAN *et al.*, 2015). O trabalho de Ansoerge-Schumacher e colaboradores (2013) destaca os monoésteres de glicerol como altamente eficientes na alteração das propriedades reológicas destas emulsões. Biossurfactantes

sintetizados a partir de açúcares, ou poliálcoois derivados de açúcares, e ácidos graxos podem ser empregados também na indústria farmacêutica. Nos estudos feitos por Furukawa (2010) esses materiais apresentaram eficiência na remoção do biofilme protetor secretado por bactérias que as tornam resistentes aos antibióticos e outros tratamentos. Essa propriedade também pode ser potencialmente explorada pela indústria alimentícia no desenvolvimento de conservantes mais eficientes e menos agressivos ao consumidor. Além disso, essa indústria ainda pode explorar a capacidade dos ésteres de atuarem como emulsificantes eficientes, com destaque para os ésteres de sucrose, entre outros carboidratos (QUENEAU *et al.*, 2008).

### 3.2 POLIÁLCOOIS

Os poliálcoois são compostos orgânicos com mais de uma hidroxila alcoólica em sua estrutura. Muitas dessas substâncias são derivadas de carboidratos de ocorrência natural. Essas múltiplas hidroxilas permitem que um único substrato seja empregado em múltiplas esterificações, formando, poliésteres. Devido a essa característica, é usual, na busca da síntese seletiva de monoésteres, que seja realizada uma etapa intermediária de formação de cetais de forma que apenas uma hidroxila dos poliálcoois fique disponível para a reação. Nessa pesquisa, foram empregados o xilitol e o glicerol, assim como seus derivados protegidos, de forma a estudar o comportamento e seletividade da Novozym 435 na esterificação desses compostos.

#### 3.2.1 Xilitol

O xilitol é um poliálcool de cadeia orgânica com cinco carbonos funcionalizados com hidroxilas, conforme mostrado na fig. 3. A tabela 1 resume algumas características desse composto. Seu nome IUPAC é pentan-1,2,3,4,5-pentol. Apesar de descoberto em 1881, apenas tardiamente, em meados do século XX, foram atribuídos usos industriais, principalmente na produção de adoçantes naturais. Sua estrutura é derivada da D-xilose, um hidrocarboneto natural que pode ser obtido em diversas plantas, sendo a madeira sua principal fonte de obtenção atualmente. A xilose, dentre os açúcares, é o mais doce, com capacidade adoçante semelhante a da sucrose e com cerca de apenas um terço de suas calorias. O xilitol, além disso, é metabolizado no organismo humano por uma via independente da insulina, o que permite que esse poliálcool seja empregado na confecção de alimentos específicos para a dieta de pacientes diabéticos.

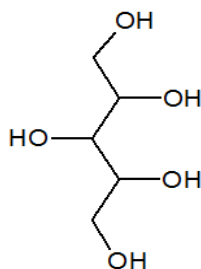


Figura 3 - Estrutura orgânica da molécula de xilitol (JENA et al., 2013)

Tabela 1 - Propriedades do xilitol.

<b>Fórmula</b>	$C_5H_{12}O_5$ (Massa Molecular = 152,15 g/mol)
<b>Aparência</b>	Pó branco cristalino inodoro
<b>Atividade Óptica</b>	Apresenta
<b>Ponto de Fusão</b>	92-96 °C
<b>Ponto de Ebulição</b>	216 °C
<b>Solubilidade</b>	169 g/100gH <sub>2</sub> O (parcialmente solúvel em etanol e metanol - à 20°C)
<b>pH em H<sub>2</sub>O (100g/l)</b>	5-7
<b>Estabilidade</b>	Estável a 120 °C; não sofre caramelização; estável também sob condições usuais em processamento de alimentos; caramelização ocorre se aquecido por alguns minutos em temperatura próxima à do ponto de ebulição.

(Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2016)

Além do emprego na produção de medicamentos e produtos para pacientes de diabetes, o xilitol também é muito empregado nas indústrias cosmética e alimentícia por possuir propriedades anticarianas. Assim, esse poliálcool é encontrado na formulação de cremes dentais e enxaguantes bucais e de doces e balas, principalmente voltados para o público infantil, mais vulnerável a essas infecções. O consumo de xilitol traz poucos efeitos

colaterais e estes tratam majoritariamente de irritações gastrointestinais (GREMBECKA, 2015).

O xilitol é naturalmente sintetizado por diversos gêneros vegetais como frutas, principalmente maçã, framboesas e pera; leguminosas e na aveia, mas é produzido em pequenas quantidades no organismo humano. Ele é absorvido no nosso organismo em taxas de 50 a 75% e a tolerância humana é de 100 g.dia<sup>-1</sup> (MAKINEN, 2016).

O principal método de produção industrial baseia-se na hidrólise do xilano à xilose que, após purificação, é hidrogenado ao álcool, empregando-se principalmente catalisadores metálicos. Rafiqul e Sakinah (2013), em seu trabalho de revisão, apontam métodos alternativos de produção industrial. O esquema na figura 4 a seguir apresenta o fluxograma do método de produção principal da xilose industrial através da hidrogenação química. O xilano, precursor do xilitol que é principalmente extraído de madeira, também pode ser obtido de outras fontes.

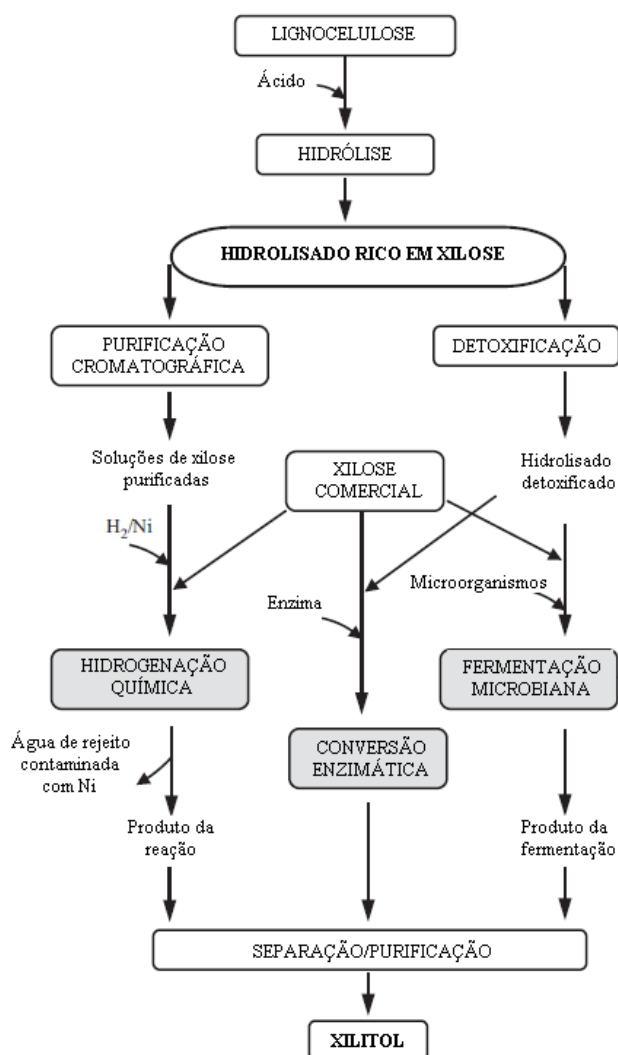


Figura 4 - Métodos de produção do xilitol (RAFIQUL & SAKINAH, 2013)



A biomassa do bagaço da cana-de-açúcar empregado na produção de etanol é uma potencial matéria-prima para esse fim, considerando que contém de 12 a 17% de açúcares na sua composição. Essa alternativa torna-se interessante também sob a ótica de aproveitamento da biomassa residual obtida como subproduto da indústria de combustíveis vegetais (DEUSTSCHMANN *et al.*, 2012; DHALIWAL *et al.*, 2011). O Brasil produziu 420 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em 2013, configurando-se como o maior produtor mundial. O bagaço residual, gerado por essa elevada produção de cana-de-açúcar, é uma fonte barata e acessível para a obtenção do xilitol (JENA *et al.*, 2013), o que justifica o desenvolvimento de bioemulsificantes sintetizados a partir desse açúcar.

### 3.2.2 Glicerol

O glicerol (propan-1,2,3-triol) é outro poliálcool e possui fórmula molecular  $C_3H_8O_3$  e sua estrutura química está representada na figura 5 a seguir. Sua maior ocorrência na natureza é como parte da estrutura de triglicerídeos, sendo sua principal via de obtenção nos processos industriais. Foi inicialmente obtido como produto secundário da indústria de sabões a partir de óleos e gorduras, sendo formado pela hidrólise desses materiais, até que em meados do século XX desenvolveram-se os métodos de formação microbiana do glicerol. Em 1943 também surgia a produção sintética desse material a partir do petróleo em uma técnica patenteada pela I. G. Farben (Alemanha) seguida da metodologia desenvolvida pela Shell (E.U.A.) (MARTIN *et al.*, 2011). A tabela 2 a seguir sumariza as principais propriedades físico-químicas do glicerol.

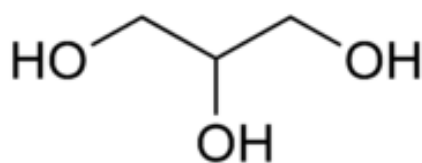


Figura 5 - Estrutura orgânica da molécula de glicerol

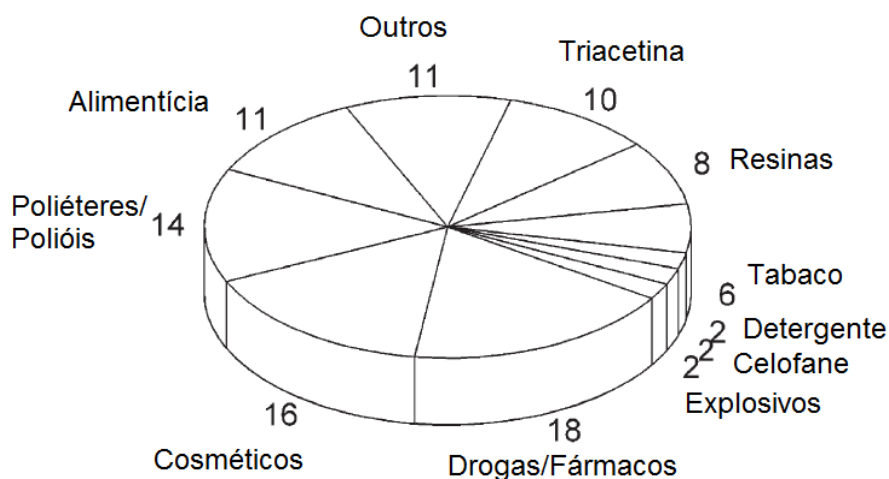
Tabela 2 - Propriedades do glicerol.

<b>Fórmula</b>	$C_3H_8O_3$ (Massa Molecular = 152,15 g/mol)
<b>Aparência</b>	Líquido viscoso
<b>Atividade Óptica</b>	Apresenta
<b>Ponto de Fusão</b>	17 °C
<b>Ponto de Ebulição</b>	290 °C
<b>Solubilidade</b>	Miscível em água e álcool. Insolúvel em éter e clorofórmio

(Fonte: NICROM QUÍMICA LTDA, 2015)

Esse álcool é um material altamente versátil, e suas aplicações são possíveis em um extenso leque de oportunidades que abrangem uma grande faixa de mercado.

Atualmente é largamente utilizado na indústria farmacêutica e de cosméticos, na qual participa majoritariamente na composição de sabões e sabonetes, Também tem grande empregabilidade na produção de poliésteres, resinas, triacetina, tabaco e na indústria alimentícia, dentre outros. A figura 6 a seguir apresenta uma visão geral do mercado do glicerol.

Figura 6 - Mercado mundial do glicerol. (MARTIN *et al.*, 2010)

O uso do glicerol é favorável por ser uma matéria-prima ambientalmente amigável, altamente disponível na natureza e que pode ser empregado como precursor de uma variedade imensa de produtos. Esse álcool também é um subproduto na indústria do biodiesel. Nos processos industriais contemporâneos, têm-se aproximadamente 1 litro de glicerol produzido para cada 10 litros de combustível. Considerando o atual mercado internacional de biodiesel, que gera cerca de 6 mi. de toneladas anuais de biodiesel (sendo o Brasil um dos cinco maiores produtores), nota-se a geração em grande escala de resíduo que contém cerca de 75% da composição em glicerol com grande potencial de investimento. Entretanto, observando que as maiores consumidoras desse açúcar são as indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, exigentes quanto à pureza e qualidade da matéria-prima empregada, é necessário o emprego de substâncias que possam gerar produtos livres de qualquer toxicidade e o uso desse subproduto torna-se inviável até o desenvolvimento de uma técnica apropriada para seu tratamento e purificação (SARMA et al., 2012).

O glicerol pode ser aplicado também na formação de monoésteres de ácidos graxos com potencial atividade biológica, visto que a esterificação desses ácidos com poliálcoois os tornam isomericamente mais estáveis no organismo humano.

### 3.3 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são uma classe de compostos caracterizados por possuírem uma cadeia carbônica funcionalizada com um ácido carboxílico. Essas biomoléculas são responsáveis pela composição dos óleos e das gorduras. Eles normalmente contêm de 4 a 18 átomos de carbono em sua cadeia e possuem ou não duplas ligações que, quando ocorrem, estão mais frequentemente localizadas nos carbonos 6, 9 e 12. As longas cadeias carbônicas alcançadas tornam esses materiais altamente apolares, reduzindo sua possibilidade de dissolução em água. As insaturações da cadeia levam à ocorrência de isomeria geométrica que podem ser determinantes para as propriedades desses compostos, principalmente o ponto de fusão (LEHNINGER, 2002).

Nos organismos vivos, principalmente para os animais, os ácidos carboxílicos atuam como fonte de armazenamento de energia. De forma combinada com o glicerol, um sacarídeo de três carbonos, formam os triacilgliceróis, responsáveis pela composição das gorduras, das ceras e de parte dos óleos vegetais (FIGUEREDO, 2013).

### 3.3.1 Ácido Oleico

O ácido oleico, cujo nome oficial IUPAC é ácido octadec-9-enóico, é um ácido muito encontrado em óleos naturais diversos. A figura 7 a seguir apresenta a sua fórmula estrutural.

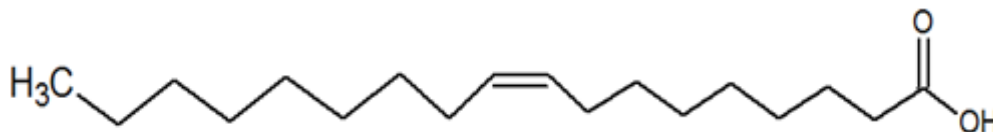


Figura 7 - Estrutura da molécula de ácido oleico (FIGUEREDO, 2013)

Esse ácido possui atividade biológica e previne a formação e desenvolvimento de carcinomas. Essa propriedade levou ao desenvolvimento da pesquisa de Carrilo e colaboradores (2012) que concluíram um resultado positivo na atividade antitumoral do ácido oleico. Além disso, ele é um eficiente redutor de pressão sanguínea conhecido pela medicina e empregado no tratamento de casos de hipertensão (IBAGUREN *et al.*, 2014).

A tabela 3 apresenta um resumo de propriedades físico-químicas dessa substância.

Largamente presente na natureza, esse produto natural pode ser extraído de diferentes variedades vegetais. Dentre os óleos comerciais, a tabela 4 apresenta o teor de ácido oléico na composição dos principais produtos do mercado em composição mássica.

Tabela 3 - Propriedades do ácido oleico.

<b>Fórmula</b>	$C_{18}H_{34}O_2$ (Massa Molecular = 282,24 g/mol)
<b>Aparência</b>	Líquido incolor viscoso
<b>Atividade Óptica</b>	Não apresenta
<b>Densidade</b>	$0,895 \text{ g.cm}^{-1}$
<b>Ponto de Fusão</b>	13-14 °C
<b>Ponto de Ebulição</b>	360 °C
<b>Solubilidade</b>	Insolúvel em água (a 20°C)

(Fonte: BERMUDEZ *et al.*, 2011)

Tabela 4 Composição mássica do ácido oleico em diversos tipos de óleos vegetais.

Óleo	Composição (%m/m) de ácido oleico (C18:1)
Milho	25,4
Algodão	13,0-44,0
Soja	17,7-28,5
Coco	5,4-9,9
Girassol	26,4-50,9
Canola	52,0-67,0
Amendoim	36,0-72,0
Palma	37,3-40,8
Oliva	55-83

(Fonte: CUNICO, 2012; BERMUDEZ *et al.*, 2011).

### 3.3.2 Ácido Adípico

O ácido adípico é um diácido orgânico com seis carbonos em estrutura acíclica e cadeia normal. Sua estrutura orgânica é apresentada na figura 8 a seguir.

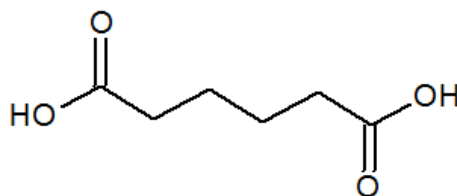


Figura 8 - Estrutura da molécula de ácido adípico (DENG *et al.*, 2016)

Formalmente conhecido como ácido hexanodióico, ele é majoritariamente empregado na síntese do Nylon 6-6 em uma metodologia desenvolvida na década de 1930 (POLEN *et al.*, 2013). Esse emprego é responsável pela movimentação de um mercado com valor superior a 6,3 bi. de dólares a cada ano no mundo. Além do uso na síntese desse polímero, o ácido adípico pode ser empregado na produção de poliuretanos, poliésteres e plasticidas, como lubrificante ou como acidulante na indústria alimentícia, principalmente presente na composição de gelatinas e sobremesas (POLEN *et al.*, 2013).

A principal via de obtenção desse ácido é através da oxidação do óleo KA, uma mistura de ciclohexanol e ciclohexanona. A reação é catalisada com ácido nítrico e o óleo KA é obtido em uma das etapas do fracionamento do petróleo (DENG *et al.*, 2016).

Outras vias de obtenção desse material também são possíveis, com destaque para as vias biossintéticas, que promovem o emprego de matéria-prima renovável. O ácido adípico pode ser naturalmente encontrado no suco de beterrabas vermelhas, por exemplo. Nesses

vegetais ele atua como intermediário da degradação do ciclohexano, ciclohexanol e ciclohexanona (BART e CAVALLARO, 2015; POLEN *et al.*, 2013).

A monoesterificação desse ácido com álcool permite reverter a formação dos ciclos, formando um composto final com um centro carbonila ativo. Essa conformação pode ser interessante para atuar como precursora de futuras sínteses.

A tabela 5 a seguir sumariza as principais propriedades físico-químicas do ácido adípico.

Tabela 5 - Propriedades do ácido adípico.

<b>Fórmula</b>	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> (Massa Molecular = 146,14 g/mol)
<b>Aparência</b>	Cristais brancos.
<b>Atividade Óptica</b>	Não apresenta
<b>Densidade</b>	1,36 g.cm <sup>-1</sup>
<b>Ponto de Fusão</b>	152 °C
<b>Ponto de Ebulição</b>	337 °C
<b>Solubilidade</b>	Pouco solúvel em água (a 20°C)
<b>pK<sub>a</sub></b>	4,43 e 5,41

(Fonte: DENG *et al.*, 2016)

### 3.3.3 Ácido Butírico

O ácido butírico é um ácido graxo de cadeia curta com apenas 4 carbonos. A figura 9 a seguir apresenta a sua fórmula estrutural.

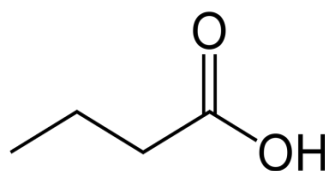


Figura 9 - Estrutura da molécula de ácido adípico

Estudos diferentes têm mostrado que esse composto é uma substância com potencial aplicação no tratamento da leucemia. Esse ácido ocorre naturalmente no corpo humano e é produto da hidrólise do etilbutirato (PRASADA, 1980; LEDER & LEDER, 1975;

BORYCKA-KICIAK, 2017). As principais propriedades físico-químicas do ácido butírico estão descritas na tabela 6 a seguir.

Tabela 6 - Propriedades do ácido butírico.

<b>Fórmula</b>	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> (Massa Molecular = 88,11 g/mol)
<b>Aparência</b>	Líquido incolor
<b>Densidade</b>	0,96 g.cm <sup>-1</sup> (a 20 °C)
<b>Ponto de Fusão</b>	-5 °C
<b>Ponto de Ebulição</b>	163 °C
<b>Solubilidade</b>	Totalmente solúvel em água
<b>pH</b>	2,5

(Fonte: IFA, 2017)

Uma vez reconhecida a importância dos monoésteres de ácidos graxos nos processos industriais de fármacos e alimentos, torna-se importante o estudo de metodologias para a obtenção dos mesmos de forma seletiva e ambientalmente amigável. A catálise enzimática torna-se uma via alternativa na produção destes monoésteres.

### 3.4 CATÁLISE ENZIMÁTICA

Classicamente os ésteres são produzidos por reações que empregam ácidos carboxílicos como substratos em reações de substituições. Um método genérico que emprega catálise ácida e leva a rendimentos razoáveis na produção de ésteres mais simples é a esterificação de Fischer. Outra via sintética descrita na literatura especializada e largamente explorada em processos industriais, capaz de levar a excelentes rendimentos empregando uma maior variedade de substratos prevê o uso de cloretos de acila derivados dos ácidos carboxílicos como precursores sintéticos (VOLHARDT, 2004). Essas sínteses, entretanto, pecam em vista os preceitos da química verde. Elas fazem emprego de altas temperaturas de aquecimento e grandes volumes de solventes ou uso de reagentes tipicamente agressivos tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente. Os resultados obtidos, apesar do bom rendimento sintético, ainda costumam necessitar de purificações tanto para a remoção dos substratos residuais quanto para a eliminação de subprodutos formados durante o processo. Essas etapas são dispendiosas em termos de tempo e material, podendo inclusive superar os gastos com a

etapa sintética. Com isso surge a necessidade de buscar novas metodologias alternativas de produção de ésteres (GUMEL *et al.*, 2011).

Uma das tecnologias que sofrem mais avanço no cenário científico atual é a catálise enzimática, que é capaz de promover reações químicas aliadas a diversos benefícios, todos eles conciliados com o desenvolvimento de uma química mais limpa e com a redução de impactos ao meio ambiente (RUFINO *et al.*, 2009). Desde o século XVII que a catálise de reações química por enzimas é conhecida pelo homem, graças aos estudos, em 1850, de Louis Pasteur, que concluiu que a fermentação de açúcares era promovida pelo que na época foi chamado de “fermentos” (LEHNINGER, 2002).

Os processos fermentativos, entretanto, são conhecidos da humanidade desde tempos imemoriais. O entendimento desses processos baseava-se na teoria vitalista e apenas quando Eduard Buchner foi capaz de obter extratos de leveduras fermentativas os olhares das ciências naturais voltaram-se para a busca de esclarecimento sobre esse fenômeno natural. Com o avanço da pesquisa, principalmente no campo da química e biologia, concebeu-se o conceito de enzima, compreendendo, no início, todas as moléculas extraídas de leveduras, para, posteriormente serem limitadas àquelas caracterizadas por suas estruturas proteicas (LEHNINGER, 2002).

Atualmente compreendem-se as enzimas como moléculas poliméricas capazes de promover reações bioquímicas nos organismos vivos, possibilitando o funcionamento dos organismos em condições suaves de temperaturas, pH e pressão (salvo casos excepcionais de enzimas encontradas em arqueas) e que conduzem à formação de produtos com alta especificidade. Esse último traço está sendo estudado pela comunidade científica e desperta muita curiosidade. Modelos largamente difundidos, como de chave-fechadura, buscam explicar essa atuação enzimática de forma simples e mais didática. Já nas publicações especializadas tem surgidos esboços de modelos mais complexos de funcionamento que propõe explicações mais detalhadas e precisas desses processos (BRUICE, 2002). Dentro da biologia, as enzimas costumam ser classificadas em seis principais grupos, categorizados segundo o tipo de reação que catalisam, conforme estão apresentados na tabela 7 (LEHNINGER, 2002).



Tabela 7 - Principais grupos enzimáticos.

Classe nº	Classe nome	Catálise
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (ou nas formas hidreto ou H)
2	Transferases	Transferências de grupos funcionais
3	Hidrolases	Hidrólises
4	Liases	Adição de grupos em olefinas, ou formação de olefinas por remoção de grupos.
5	Isomerases	Promoção de isomeria de grupo
6	Ligases	Condensações

(Fonte: LEHNINGER, 2002)

A esterificação de ácidos graxos com poliálcoois pode ser promovida com o uso das lipases, enzimas pertencentes a um subgrupo das hidrolases.

### 3.4.1 Lipases

As lipases são enzimas responsáveis pela catálise da hidrólise de ésteres de açúcares no organismo dos seres vivos, sendo sintetizadas na natureza por diversas espécies de plantas, mamíferos, leveduras, fungos, bactérias e arqueas. Seu mecanismo de atuação promove a hidratação de um triglicerídeo, liberando glicerol e ácidos graxos no meio reacional, conforme representado na figura 10 (PRIVE *et al.*, 2015; OKINO-DELGADO, 2014).

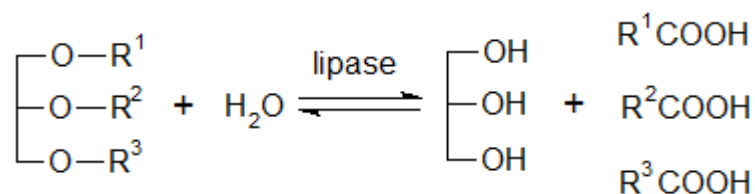


Figura 10 - Hidrólise de triglicerídeos por lipase (RUFINO, 2009)

Apesar de essa reação contar com moléculas de água como reagentes, em ambientes secos as lipases são capazes de realizar uma grande variedade de reações devido à sua estrutura característica. Dentre essas reações, essas enzimas são exploradas industrialmente em reações de esterificações, acidólises, alcoólises e transesterificações. Essa característica torna evidente a versatilidade desse tipo de proteínas, viabilizando o desenvolvimento de novas tecnologias que as empregue. A figura 11 ilustra algumas das reações catalisadas pelas lipases.

Uma característica crucial para o emprego dessa classe de enzimas é sua propriedade de atuar na zona interfacial entre substâncias polares e apolares. Devido a uma estrutura proteica chamada *lid* que protege o centro ativo da enzima, as lipases são capazes de promoverem o acesso seletivo do substrato ao seu interior (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Os derivados imobilizados a base de lipases possuem enzimas provenientes de bactérias extraídas de soja ou alimentos que contenham óleos vegetais. Essas lipases são majoritariamente glicoproteicas e tem função estrutural, com baixa especificidade quanto ao substrato. Atualmente, as principais bactérias empregadas na produção industrial de lipases são dos gêneros *Achromobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Chromobacterium sp.* (BERNAL *et al.*, 2014; MIYAZAWA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2011).

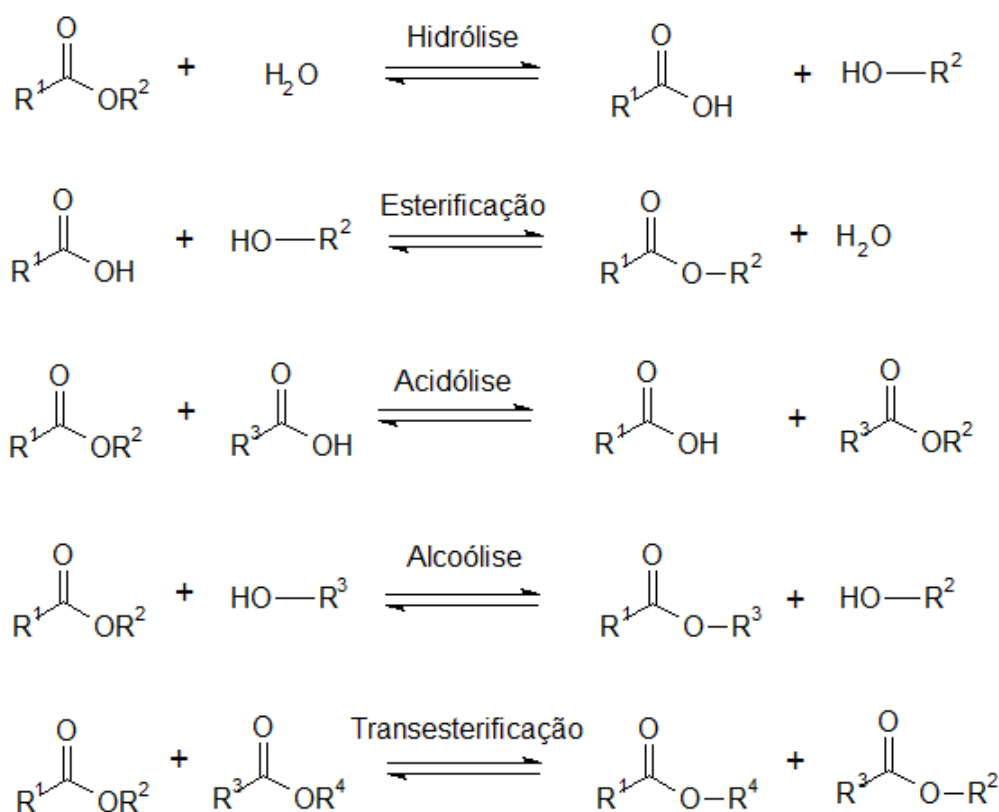


Figura 11 - Reações catalisadas por lipases (RUFINO *et al.*, 2009)

Outra fonte recorrente dessas substâncias são os fungos filamentosos e as leveduras. As espécies *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.* e *Rizhomucor sp* destacam-se dentre os fungos, enquanto que as principais leveduras pertencem aos gêneros *Geotrichum sp.*, *Yarrowia sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Pichia sp.*, *Saccharomycopsis*

sp., *Torulaspota* sp., e *Trichosporon* sp. Entretanto, as principais publicações acadêmicas têm mostrado resultados excelentes de conversões de extratos de leveduras do gênero *Candida* sp., especialmente com as lipases de *C. rugosa* e *C. antarctica* que já são extensivamente utilizadas em diversos campos industriais (SINGH, 2012). A Novozym 435, lipase B de *Candida antarctica*, imobilizada comercialmente é uma das lipases mais empregadas na catálise enzimática segundo a literatura revisada (CABRERA *et al.*, 2009). A tabela 8 a seguir apresenta suas principais características.

Tabela 8 - Propriedades da enzima Novozym 435.

Número catalográfico	06-3123
Atividade	10000 PLU/g
pH ótimo	5-9
Temperatura ótima	30-60 °C
Especificidade do substrato	Ésteres e álcoois
Suporte	Resina acrílica

FONTE: (STREM, 2017)

Esse interesse pelo emprego de lipases na indústria começa a se intensificar na década de 80, em grande parte por conta das pressões governamentais e populares em torno da busca de tecnologias limpas e mais sustentáveis típicas desse período histórico.

O uso das lipases mostrou-se vantajoso não só pela suavização das condições reacionais que beneficia principalmente o meio ambiente, mas por mostrar benefícios também para o processo produtivo. O alto desempenho catalítico enzimático aliado com a promoção de reações enantiosseletvas promoveu o aumento dos rendimentos reacionais e facilitou a obtenção de compostos enantiomericamente puros, de importância ímpar em indústrias como a alimentícia e a farmacêutica (GUPTA *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2001).

Uma grande variedade de segmentos biotecnológicos tem empregado lipases, incluindo essas indústrias já citadas. No mercado de enzimas em geral, as lipases tem conquistado uma fatia crescente de investimento. A tabela 9 sumariza algumas de suas principais aplicações (VERMA *et al.*, 2012).

As reações catalisadas por enzimas tradicionalmente conduzem a elevados tempos reacionais. Uma alternativa para a redução desses tempos reacionais é o emprego de fontes alternativas de aquecimento, dentre elas destacando-se o micro-ondas e o ultrassom.

Tabela 9 - Usos e aplicações das lipases.

Setor	Efeito Utilizado	Produto	Referência
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos	AÇIKEL <i>et al.</i> , 2011
Panificação	Melhoramento do sabor/qualidade prolongamento do tempo de prateleira	Confeitos e bolos	LEE <i>et al.</i> , 2012
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos.	Bebidas alcoólicas, ex: saque, vinho e outras	SINGH <i>et al.</i> , 2012
Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gorduras	Produtos embutidos	SINGH <i>et al.</i> , 2012
Manteigas	Interesterificação de óleos e gorduras.	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau, lipídeos estruturados, combustível).	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2010
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres aromatizantes, surfactantes.	SINGH <i>et al.</i> , 2012
Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gorduras	Formulação de detergentes para lavanderia e limpeza	CONTESINI <i>et al.</i> , 2010
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos	SINGH <i>et al.</i> , 2012
Análises Clínicas	Análise de triglicerídeos no sangue	Kit de diagnóstico	REDDY <i>et al.</i> , 2014; CHEN <i>et al.</i> , 2014
Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosmético em geral	ANSORGE-SCHUMACHER <i>et al.</i> , 2013
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro	SARAN <i>et al.</i> , 2013

Biorremediação	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes e outros.	HERMES <i>et al.</i> , 2013; KAUSHIK <i>et al.</i> , 2014
Têxtil	Remoção de gorduras da superfície dos tecidos	Tecidos em geral	CHEN <i>et al.</i> , 2012; LI <i>et al.</i> , 2011
Celulose	Degradação de triglicerídeos	Papel	KARN <i>et al.</i> , 2013
Polimerização	Síntese de ésteres através de transesterificações	Poliésteres diversos	XU <i>et al.</i> , 2013
Chá	Formação de flavorizantes e aumento do valor nutricional	Chá preto	SINGH <i>et al.</i> , 2012
Biossensores	Sensores de doenças pancreáticas	Kit de diagnóstico	FAN <i>et al.</i> , 2013
Combustível	Transesterificação de óleos em combustível	Biodiesel	MOUNGUENGUI <i>et al.</i> , 2013

### 3.5 MICRO-ONDAS

As publicações acadêmicas, nos últimos anos, vêm mostrando cada vez mais frequentemente a tecnologia de aquecimento de reações químicas empregando micro-ondas, revelando a capacidade dessa técnica de acelerar reações químicas.

As micro-ondas são emissões eletromagnéticas que correspondem a uma faixa característica de altos comprimentos de onda (entre 1 mm e 1 m) e baixas frequências, como pode ser identificado no campo eletromagnético na figura 12 a seguir (HALLIDAY *et al.*, 2012b).

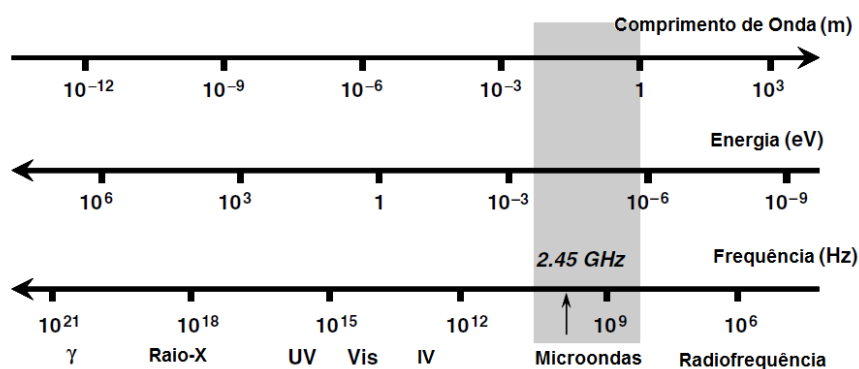


Figura 12 - O espectro eletromagnético (KAPPE *et al.*, 2009)

O uso de micro-ondas como fonte de aquecimento é conhecido pela popularização dos fornos domésticos, largamente comercializados, que empregam radiações de 12,25 cm de comprimento de onda. Ondas dessas ordens de frequências possuem energias baixas e por isso não são capazes de romper as ligações químicas, mas são capazes de promover fenômenos térmicos únicos com base nos efeitos dielétricos gerados pela rotação dos eixos de momento dipolar em moléculas polares ou deslocamento de carga em soluções iônicas. Os movimentos causados por esses efeitos promoverão atrito entre as espécies químicas do meio e a energia será dissipada na forma de aquecimento (WHATEY *et al.*, 2002). Entretanto esse método é restrito a líquidos e soluções, já que sólidos possuem um estado de agregamento intermolecular muito grande que impossibilita a movimentação dos seus componentes e os gases possuem um elevado distanciamento entre suas moléculas, que não sofrerão interferência entre si (HAYES, 2002).

A técnica também é limitada pelas propriedades dielétricas nas substâncias que sofrerão aquecimento, visto que a eficiência da sua aplicação depende da influência das ondas eletromagnéticas que provocarão movimentação e atrito (HAYES, 2002).

O efeito dielétrico também irá determinar as características do aquecimento de cada substância. Esse valor é aplicado no cálculo da tangente de perda,  $\text{tg } \sigma$ , calculado segundo a fórmula apresentada na eq. 2.5.1 (HAYES, 2002).

$$\text{tg } \sigma = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \therefore \epsilon' = \text{constante dielétrica e } \epsilon'' = \text{perda dielétrica} \quad (\text{Eq. 2.5.1})$$

Alguns valores da tangente de perda são apresentados na tabela 10. Esse valor não se relaciona com a eficiência da reação, mas ao efeito do aquecimento sobre tal solvente. A partir desses dados é possível determinar que, para solventes com maiores valores de  $\text{tg } \sigma$ , os efeitos de temperatura são mais intensos, e eles podem ser empregados em reações que exigem rápido aquecimento, enquanto que os solventes com menores  $\text{tg } \sigma$  são aquecidos de forma mais branda, sendo aplicados mais aconselhadamente quando trabalha-se com substratos suscetíveis aos efeitos de forte aquecimento (HAYES, 2002).

O aquecimento por micro-ondas é mais homogêneo que o aquecimento tradicional. Ele é promovido pelo fenômeno do atrito das moléculas do próprio solvente e assim torna-se mais eficiente, sem haver perdas de energia, já que o calor é gerado no interior do frasco reacional. As reações convencionalmente conduzidas por refluxo utilizam banho de óleo ou mantas de aquecimento que proporcionam muita perda de energia térmica durante os vários processos de

convecção. Além disso, essas técnicas são lentas e pouco eficientes levando a longos tempos reacionais e ao aquecimento irregular e heterogêneo (MAVANDADI *et al.*, 2006).

Tabela 10 - Fator de Perda para os principais solventes orgânicos.

<b>Solvente</b>	<b>tg <math>\sigma</math></b>	<b>Solvente</b>	<b>tg <math>\sigma</math></b>
<b>Etileno glicol</b>	1,350	<b>DMF</b>	0,161
<b>Etanol</b>	0,941	<b>Diclorometano</b>	0,127
<b>DMSO</b>	0,825	<b>Água</b>	0,123
<b>2-propanol</b>	0,799	<b>Clorobenzeno</b>	0,101
<b>Ácido metanoico</b>	0,722	<b>Triclorometano</b>	0,091
<b>Solvente</b>	<b>tg <math>\sigma</math></b>	<b>Solvente</b>	<b>tg <math>\sigma</math></b>
<b>Metanol</b>	0,659	<b>Acetonitrila</b>	0,062
<b>Nitrobenzeno</b>	0,589	<b>Acetato de etil</b>	0,059
<b>1-Butanol</b>	0,571	<b>Acetona</b>	0,054
<b>2-Butanol</b>	0,447	<b>THF</b>	0,047
<b>Diclorobenzeno</b>	0,280	<b>Diclorometano</b>	0,042
<b>NMP</b>	0,275	<b>Tolueno</b>	0,040
<b>Ácido etanoico</b>	0,174	<b>Hexano</b>	0,020

(Fonte: KREMSNER *et al.*, 2013)

Os primeiros reatores de micro-ondas empregados em síntese orgânica foram fornos domésticos adaptados, mas com o passar do tempo e com o aumento das publicações e da demanda na área, surgiram reatores específicos, que permitem maior segurança ao operador, possibilidade de super aquecimento de solventes, melhoria do controle de parâmetros, automatização das configurações, agitação, entre diversas outras que variam entre modelos de aparelhos (KREMSNER *et al.*, 2013).

### 3.6 ULTRASSOM

Outra forma de aquecimento encontrada nas publicações mais recentes, que vem sendo empregada de forma alternativa na química orgânica, baseia-se no uso de ondas mecânicas de frequência superior a 20 kHz, uma faixa chamada ultrassom. Curie, *apud* Richard e Loomis, (1929), foi capaz de elucidar esse efeito cinético através do estudo do efeito piezométrico. A técnica de emissões ultrassônicas é empregada atualmente em diversas tecnologias, sendo

talvez a mais popular nos dias atuais o uso do SONAR (*Sound Navigation Raging*, em inglês), técnica usada na exploração topográfica marítima desenvolvida em 1912 por Paul Langevin. Outra técnica que recorre ao uso dessas ondas mecânicas é para o aquecimento de líquidos, desenvolvido pelos estudos de Alfredo Loomis em 1927 (RICHARD e LOOMIS, 1929; RIESZ, 1992).

Esse aquecimento é permitido pelo fenômeno da cavitação ultrassônica, onde as ondas ultrassônicas de alta potência formam vibrações capazes de agitar intensamente microbolhas de ar que estejam dissolvidas no líquido empregado como solvente. Essa intensa movimentação gera a expansão da cavidade da bolha até sua ruptura e implosão, por conta da baixa densidade interna. Nesse fenômeno, que ocorre em microssegundos, bolhas de ar podem aumentar de 5 µm para 50 µm de diâmetro, atingindo temperaturas de 500 K a 15000 K no momento de sua explosão. Os diversos processos pontuais de expansão e implosão, no líquido, promoverá o aquecimento total da substância, de forma homogênea (EREN, 2012).

Schudhedar e Gogate (2013) observaram, em seus trabalhos, que o ultrassom favorece também a difusão das enzimas no meio, promovendo a desaglomeração das partículas. Isso contribui para aumentar a ocorrência de encontros enzima-substrato e, conseqüentemente, acelerar a reação e melhorar seu rendimento. Além disso, a melhoria da eficiência da reação pode ser combinada com a redução em massa do catalisador empregado (SHUBHEDAR e GOGATE, 2013).

Esses benefícios do uso de ultrassom estão também em concordância com os princípios estabelecidos no tratado da química verde. A redução do volume de solvente e o aumento da velocidade reacional promovem, respectivamente, menor gasto de material não incorporado no produto final e redução dos tempos de reação, que, mais curtas, necessitarão de menos investimento energético. Outra vantagem destacada na literatura é a possibilidade de substituição de componentes voláteis e tóxicos usuais nos processos de síntese clássica por água ou líquidos iônicos. Em alguns casos, com o uso do ultrassom, é possível até mesmo conduzir reações sem o uso de solvente. Outra característica importante do aquecimento ultrassônico é a eficiência energética promovida pelo aquecimento homogêneo e interno, que, à semelhança do reator de micro-ondas, reduzindo as perdas energéticas típicas dos fenômenos de convecção (PURI *et al.*, 2013).

#### 4. METODOLOGIA

Para o estudo de metodologias para obtenção de monoésteres de açúcares, neste trabalho foram combinadas técnicas de catálise enzimática e de aquecimento através de fontes



alternativas, reator de micro-ondas e banho com ultrassom, variando parâmetros reacionais distintos a fim de aumentar os rendimentos reacionais e otimizar o tempo do processo, preconizando os parâmetros da química verde.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioprocessos e Catálise Ambiental do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Fluminense (ICEX-UFF) em parceria com professores do Departamento de Engenharia Química - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL-USP).

Para a realização das reações foram empregados os seguintes reagentes: xilitol (Sigma-Aldrich), glicerol (ISO FAR), ácido oleico (Vetec Química), ácido adípico (Sigma-Aldrich) e ácido butírico (Sigma-Aldrich) como substrato das esterificações. Os poliálcoois de xilitol e glicerol foram utilizados também na forma de cetais cíclicos, obtidos após uma etapa de proteção das hidroxilas realizada pela reação dos mesmos com acetona (Vetec Química), na presença de éter de petróleo (Vetec Química) e ácido p-toluenossulfônico. Na catálise enzimática foi utilizada a lipase comercial Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica*), que, segundo dados da literatura, leva a maiores rendimentos quando comparada a outras enzimas em reações de hidrólises e esterificações (LERIN *et al.*, 2014; GIUNTA *et al.*, 2015). Demais substâncias foram utilizadas em etapas intermediárias ou de purificação: hexano, éter dietílico, metanol, ácido acético, heptano, hidróxido de potássio e t-BuOH.

Como fontes de aquecimento foram utilizados o banho de ultrassom Eco-Sonics Ultronique Q1.8/40A de 40kHz (figura 13) e um reator de micro-ondas Anton Paar modelo Monowave 300 MAS 24 *software* versão 3.20 (figura 14).



Figura 13 - Banho de ultrassom Eco-Sonics Ultronique Q1.8/40A



Figura 14 - Reator de micro-ondas Anton Paar modelo Monowave 300 MAS 24

#### 4.1 SÍNTESE DE CETAIS (REAÇÕES DE PROTEÇÃO)

Poliálcoois como o xilitol e o glicerol podem ser empregados na formação de cetais cíclicos envolvendo quatro ou duas de suas hidroxilas, respectivamente. Com uma única hidroxila disponível nas reações de esterificação, a formação do monoéster é favorecida. As reações de proteção do xilitol e do glicerol foram realizadas segundo metodologia proposta por Suriyaprapadilok e colaboradores (2011), empregando o poliálcool correspondente e acetona (Vetec Química) como substratos. A acetona foi tratada com sulfato de sódio anidro e posteriormente destilada.

*Procedimento Experimental:* Em um balão de fundo redondo de 150 mL, foram adicionados 0,16 mols do poliálcool (15 g para o glicerol e 25 g para o xilitol, aproximadamente), 0,9 mols de acetona, 50 mL de hexano, empregado como solvente, e 0,45 g de PPTS, catalisador ácido da reação. Um aparelho Dean Stark, preenchido com hexano foi acoplado para remoção da água formada no meio reacional, deslocando o equilíbrio para a formação dos produtos. A aparelhagem utilizada é apresentada na figura 15. A reação correu por 20 h com temperatura do meio mantida em torno de 60°C. A reação foi interrompida adicionando-se cerca de 0,15 mL de piridina. O produto foi colocado em evaporador rotativo para a remoção completa do hexano e do excesso de acetona e foi extraído em clorofórmio. A purificação foi feita em coluna cromatográfica empregando uma mistura clorofórmio/metanol 98:2 como eluente e o produto final foi caracterizado por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A tabela 10 a seguir sumariza as condições reacionais empregadas nessa síntese.

Tabela 11 - Condições reacionais para as reações de proteção de poliálcoois

Reagentes	Poliálcool/Acetona (1:4)
Catalisador	PPTS
Solvente	Éter etílico
Temperatura	70 °C
Tempo	44 h

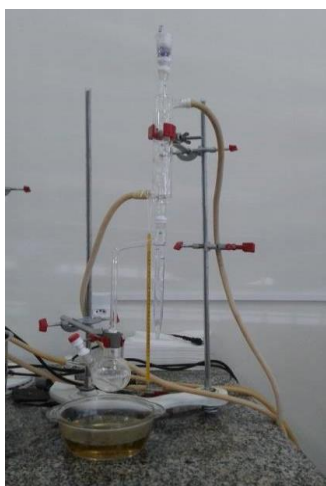


Figura 15 - Aparelhagem para proteção do xilitol

## 4.2 SÍNTESE DE ÉSTERES DE AÇÚCARES VIA QUÍMICA

As análises dos produtos de esterificação enzimática foram realizadas por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e, para fins comparativos, foi necessária a preparação de padrões dos compostos mono-oleato de xilitol e mono-oleato de glicerol. Na preparação desses materiais foram empregadas as vias clássicas de síntese, que são largamente descritas e conduzem a resultados com elevados rendimentos e alta pureza. Essa síntese foi desenvolvida em duas etapas, a primeira consistiu na preparação do cloreto de ácido graxo e a segunda na esterificação do cloreto de ácido com o poliálcool protegido.

### 4.2.1 Síntese do cloreto de ácido oleico

Os cloretos de ácido são compostos muito reativos e úteis na produção de ésteres, permitindo o ataque do álcool na carbonila com liberação do íon de cloro. Sua preparação é feita através de reação entre um ácido carboxílico e cloreto de tionila, com liberação de ácido clorídrico e óxido de enxofre, subprodutos tóxicos e nocivos à saúde humana e ao ambiente.

*Procedimento Experimental:* As reações foram realizadas em balão de fundo redondo de 50 mL empregando aproximadamente 4,65g de ácido oleico (16,5 mmol) e 1,8 mL de cloreto de tionila (24,7 mmol). A mistura foi deixada em agitação por 18 horas à temperatura ambiente. Na purificação do produto final foi adicionado tolueno para a extração do cloreto de ácido. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo. A tabela 12 apresenta as principais condições reacionais para a síntese de cloretos de ácido oleico

Tabela 12 - Condições reacionais para a síntese de cloretos de ácido oleico

Reagentes	Ácido oleico/Cloreto de tionila (1:2)
Catalisador	--
Solvente	--
Temperatura	Ambiente
Tempo	18 h

#### 4.2.2 Síntese do mono-oleato de xilitol

A obtenção via química do éster de xilitol é baseada nos métodos clássicos de esterificação que consiste na reação direta entre um álcool e um cloreto de ácido carboxílico.

*Procedimento Experimental:* Em balão de fundo redondo de 50 mL, foram adicionados 0,5 g de xilitol protegido e 1,28 g de cloreto de ácido oléico. As reações foram realizadas pelo período de 5 horas em frasco fechado à temperatura ambiente com agitação de 200 rpm. A reação ocorreu na ausência de solvente, sendo acompanhada por cromatografia de camada fina utilizando clorofórmio/metanol (9:1) como fase móvel. O produto foi purificado em coluna filtrante com areia, carvão ativado e sílica 73 – 230 nm e em seguida em uma coluna cromatográfica em sílica utilizando clorofórmio como eluente.

#### 4.2.3 Síntese de mono-oleato de glicerol

De forma semelhante, o éster de glicerol foi produzido, inicialmente, por via química, baseada nas reações clássicas de esterificação.

*Procedimento Experimental:* As reações foram realizadas em balão de fundo redondo de 50 mL, fechado, onde foram adicionados 0,417g de xilitol protegido, 0,1g de sódio metálico e 1,90g de cloreto de ácido oleico, empregando 10 mL de benzeno como solvente. A mistura reacional foi colocada sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. O produto foi

purificado em coluna cromatográfica com sílica 70-230 mm utilizando clorofórmio como eluente.

A tabela 13 resume as condições reacionais para as reações de esterificação através da via química.

Tabela 13 - Condições reacionais para síntese dos ésteres de xilitol e glicerol via química.

Reagentes	Xilitol protegido/Cloreto de ácido oleico (1:2)	Sal de glicerol protegido*/Cloreto de ácido oleico (1:4)
Catalisador	--	--
Solvente	--	Benzeno
Temperatura	Ambiente	Ambiente
Tempo	5 h	2 h

\*O sal do glicerol protegido foi produzido no próprio meio reacional pela adição de sódio metálico

#### 4.3 ESTERIFICAÇÃO POR CATÁLISE ENZIMÁTICA

As reações enzimáticas são caracterizadas por sua seletividade. Na formação de ésteres empregando poliálcoois, a lipase de *Candida antarctica* favorece a formação de produtos mono-substituídos por ser estereoespecífica (MORAES, 2016). A lipase B comercializada pela Novodisk (*Candida antarctica* - Novozym 435) é descrita na literatura como extremamente versátil e eficiente na formação de ésteres (GIUNTA et al., 2015), mas as reações promovidas por catálise enzimática são caracterizadas por demandar longos tempos reacionais. Dada a eficiência do aquecimento por radiação de micro-ondas e por banho de ultrassom, propôs-se a realização de esterificação dos poliálcoois com ácidos graxos empregando uma combinação destas duas técnicas alternativas de aquecimento.

##### 4.3.1 Avaliação do rendimento da esterificação com catálise enzimática em diferentes fontes de aquecimento

Para determinar a seletividade da enzima, juntamente com o estudo do uso de fontes alternativas de aquecimento, foram realizadas reações de esterificações do ácido oleico por metodologia descrita na literatura (RUFINO et al., 2010).

*Procedimento Experimental:* A esterificação consistiu na reação de 4 mmol de ácido oleico com 1 mmol do poliálcool xilitol, utilizando 10 mL de terc-butanol como solvente e empregando como catalisador 200 mg da enzima Novozym 435. Foram avaliadas as duas fontes de aquecimentos. No estudo do emprego do reator de micro-ondas a reação foi acompanhada por 5 h à 55 °C, com retiradas de amostras a cada 1 hora e análise através de titulação empregando fenolftaleína em triplicata. O banho de ultrassom foi empregado em um período de 2,5 horas em 55 °C e análise através de titulação potenciométrica para a dosagem da concentração do ácido graxo feita em duplicata a cada meia hora. Os produtos reacionais foram purificados em coluna cromatográfica com hexano/éter etílico/metanol/ácido acético (78:17:2:3) como eluente e o monoéster foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A tabela 14 apresenta, em resumo, as condições reacionais e de análise empregadas.

Tabela 14 - Condições reacionais para síntese via enzimática dos ésteres de xilitol com diferentes fontes de aquecimento.

<b>Fonte de Aquecimento</b>	<b>Micro-ondas</b>	<b>Ultrassom</b>
Reagentes	Ácido oleico/Xilitol (4:1)	Ácido oleico/Xilitol (4:1)
Catalisador	Novozym 435	Novozym 435
Solvente	<b>2,5 mL</b> <i>t</i> -BuOH	<b>2,5 mL</b> <i>t</i> -BuOH
Temperatura	55 °C	55 °C
Tempo	5 h	2,5 h
Acompanhamento	Titulação a cada hora	Titulação potenciométrica a cada meia hora

#### 4.3.2 Avaliação do rendimento da esterificação com catálise enzimática em ciclos consecutivos de reuso da enzima

A catálise enzimática é um método de conduzir reações orgânicas que traz diversos benefícios, principalmente relacionados às questões ambientais, mas um dos empecilhos na aplicação industrial desta técnica encontra-se nos elevados preços comerciais dos derivados imobilizados.

A reação de esterificação do ácido oleico, descrita anteriormente, foi realizada empregando o mesmo catalisador, a enzima Novozym 435 (200 mg), em reações

consecutivas, a fim de analisar a redução da atividade enzimática, através dos rendimentos reacionais obtidos, para cada ciclo de reuso da enzima.

*Procedimento Experimental:* Foram feitas cinco reações empregando-se terc-butanol (10 mL; Sigma Aldrich) como solvente em reator de micro-ondas por períodos de 5 horas à 55 °C. Para a dosagem da concentração do ácido oléico, foram realizadas titulações de neutralização com KOH (0,005M) em duplicata a cada hora. A formação dos produtos no decorrer da reação foi verificada por cromatografia de camada fina, utilizando como eluente a mistura hexano/éter etílico/metanol/ácido acético (78:17:2:3). A tabela 15 sumariza as condições reacionais aplicadas. Ao fim de cada ciclo reacional, o derivado imobilizado foi coletado por filtração e lavado e armazenado com heptano em geladeira (em aproximadamente 10 °C)

Tabela 15 - Condições reacionais para síntese enzimática dos ésteres de xilitol empregada em 5 ciclos consecutivos da reação.

Fonte de Aquecimento	Micro-ondas
Reagentes	Ácido oleico/Xilitol (4:1)
Catalisador	Novozym 435
Solvente	<i>t</i> -BuOH
Temperatura	55 °C
Tempo	5 h
Acompanhamento	Titulação a cada hora

#### 4.3.3 Obtenção de ésteres de xilitol com diferentes ácidos graxos

A fim de analisar a versatilidade da Novozym 435 e obter novos monoésteres de açúcares, foram realizadas reações de esterificação com o xilitol protegido em terc-butanol como solvente empregando o ácido adípico e o ácido butírico (Vetec Química) como doador do grupo acila.

*Procedimento Experimental:* As reações para o ácido adípico, um diácido, foram acompanhadas apenas qualitativamente por cromatografia em camada fina empregando hexano/éter etílico/metanol/ácido acético (78:17:2:3) e os produtos reacionais foram purificados em coluna cromatográfica com o mesmo eluente. A esterificação com ácido butírico foi realizada por 2 horas, acompanhadas por titulação potenciométrica empregando

um potenciômetro TS-Tecnopon MS-150 com eletrodo de platina de alíquotas em duplicata dos tempos de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 2,5 horas reacionais. As condições reacionais empregadas nas sínteses estão apresentadas na tabela 16.

Tabela 16 - Condições reacionais para síntese via enzimática dos ésteres de xilitol com diferentes ácidos graxos.

Reagentes	Ácido adípico/Xilitol (4:1)	Ácido butírico/Xilitol (4:1)
Fonte de Aquecimento	Micro-ondas	Ultrassom
Catalisador	Novozym 435	Novozym 435
Solvente	t-BuOH	t-BuOH
Temperatura	55 °C	55 °C
Tempo	5 h	2,5 h
Acompanhamento	Cromatografia em camada fina	Titulação potenciométrica em diferentes tempos

#### 4.3.4 Avaliação da seletividade na obtenção de monoésteres de ácido oleico com diferentes poliálcoois e poliálcoois protegidos

Na formação de ésteres empregando poliálcoois, a lipase Novozym 435 é favorável à formação dos produtos monossustituídos (KIM *et al.*, 2011).

*Procedimento Experimental:* Para determinar a eficácia de seletividade da enzima foram realizadas reações de esterificação com ácido oleico empregando a Novozym 435 em terc-butanol por meio de banho de ultrassom por uma hora e meia e acompanhadas por CLAE. Alíquotas foram retiradas nos tempos de 5, 10, 20, 30, 60 e 90 minutos e a análise foi feita empregando-se acetonitrila/metanol (80:20) como fase móvel em uma coluna Phenomenex HyoerClone 5u C18 130A de 100 x 4,60 mm e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Foram empregados como poliálcoois o xilitol e o glicerol e seus derivados protegidos. A tabela 17 a seguir sumariza todas as condições reacionais empregadas nessa avaliação.



Tabela 17 - Condições reacionais para síntese via enzimática dos ésteres de xilitol com diferentes poliálcoois.

Reagentes	Ác. oleico/Xilitol (4:1)	Ác. oleico/Xilitol protegido (4:1)	Ác. oleico/Glicerol (4:1)	Ác. oleico/Glicerol protegido (4:1)
Fonte de Aquecimento	Ultrassom	Ultrassom	Ultrassom	Ultrassom
Catalisador	Novozym 435	Novozym 435	Novozym 435	Novozym 435
Solvente	<i>t</i> -BuOH	<i>t</i> -BuOH	<i>t</i> -BuOH	<i>t</i> -BuOH
Temperatura	55 °C	55 °C	55 °C	55 °C
Tempo	2,5 h	2,5 h	2,5 h	2,5 h
Acompanhamento	CLAE	CLAE	CLAE	CLAE

#### 4.3.5 Avaliação do rendimento reacional da esterificação com catálise enzimática em diferentes solventes

Em um estudo desenvolvido por Rufino e colaboradores (2009) foi realizada uma investigação na qual diversos solventes foram empregados em reações conservando os demais parâmetros reacionais. Nessa pesquisa citada o terc-butanol apresentou os melhores resultados de rendimento. Em outro trabalho foram apontadas dificuldades no emprego de alcoóis como solvente em reações de esterificação (FU *et al.*, 2009). Para determinar o melhor solvente na esterificação de monoésteres de açúcares foram realizadas esterificações com ácido oleico e xilitol empregando a lipase Novozym 435.

*Procedimento Experimental:* Os solventes estudados foram o terc-butanol (Sigma Aldrich) e o iso-octano (Sigma Aldrich). As reações foram feitas em banho de ultrassom por 2,5 h horas e acompanhadas por titulação potenciométrica empregando um potenciômetro TS-Tecnopon MS-150 com eletrodo de platina. Os produtos reacionais foram purificados em coluna cromatográfica com cloroformio/metanol (8:2) como eluente. A tabela 18 a seguir apresenta resumidamente as condições reacionais empregadas para essa síntese.

Tabela 18 - Condições reacionais para síntese via enzimática dos ésteres de xilitol empregando iso-octano como solvente reacional.

Fonte de Aquecimento	Ultrassom
Reagentes	Ácido oleico/Xilitol (4:1)
Catalisador	Novozym 435
Solvente	<i>Iso-octano</i>
Temperatura	55 °C
Tempo	2,5 h
Acompanhamento	Titulação potenciométrica a cada meia hora

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram realizados os estudos dos rendimentos reacionais na síntese laboratorial de ésteres de açúcares, buscando a obtenção de ésteres monossustituídos e com suavização das condições reacionais em comparação com as metodologias clássicas de síntese, de forma orientada pelos preceitos da Química Verde. Para atingir esses resultados foi empregada a catálise enzimática com a enzima comercial Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica*) utilizando dois métodos diferentes de aquecimento: através de banho de ultrassom e do reator de micro-ondas. Para a obtenção do produto final, o xilitol e o glicerol empregados como substratos passaram por uma etapa de proteção via química para favorecer a formação do monoéster.

### 5.1 SÍNTESE DE CETAIS (REAÇÕES DE PROTEÇÃO)

Na formação de cetais cíclicos com o xilitol e acetona, quatro dos cinco grupos –OH foram protegidos evitando assim o acoplamento dos grupos acilas dos ácidos graxos empregados, deixando apenas uma hidroxila livre capaz de esterificar o ácido graxo. O grupo protegido permaneceu estável em ambientes com pH maior que sete e pôde ser facilmente hidrolisado em meio ácido (HCl diluído, 50 °C, 20 h).

Na figura 16 está descrito o mecanismo de proteção das hidroxilas do xilitol empregando acetona proposto na literatura (SOLOMONS e FRYHLE, 2011).

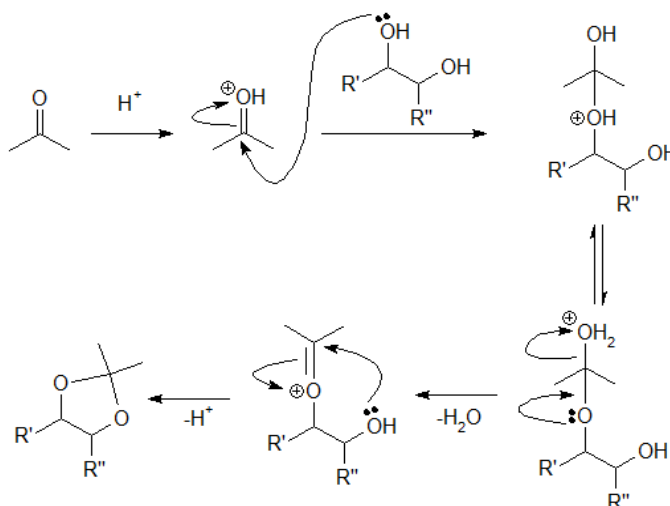


Figura 16 - Mecanismo proposto para a proteção do xilitol

Na primeira etapa dessa reação ocorre a protonação do oxigênio da acetona devido ao meio acidificado pelo PPTS, catalisador. Ao fim da reação haverá um cetel cíclico formado e liberação de água, que no processo foi removida do meio com auxílio do Dean Stark, favorecendo o rendimento final e impedindo a hidrólise do cetel formado.

A reação global é apresentada na figura 17. A proporção entre acetona e xilitol é de 2:1 acetona/xilitol. Empregou-se, na reação descrita, uma quantidade excessiva de acetona para deslocar o equilíbrio químico e favorecer o rendimento final, garantindo ainda a proteção da totalidade do xilitol. Considerando então os 0,16 mols de xilitol iniciais como reagente limitante, o rendimento para as 22,0748 g do produto final obtido foi de 58,96%.

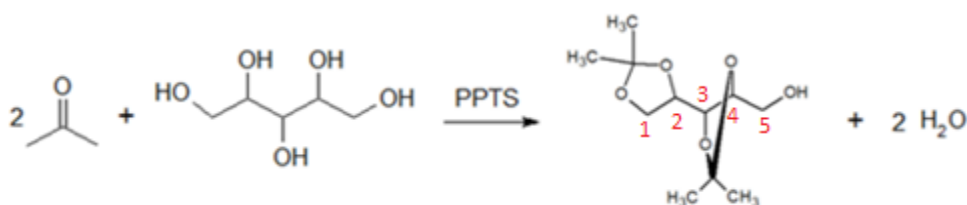


Figura 17 - Reação global proteção do xilitol

O produto foi caracterizado em  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O espectro é descrito a seguir.

RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 4,30-3,60(m, 7H,  $\text{C}_{1-5}$ ); 2,59(sl, 1H, OH), 1,45 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ); 1,35 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$ : 109,8-110,3( $\text{C}_{6-7}$ ); 78,2( $\text{C}_4$ ); 75,4( $\text{C}_3$ ); 73,7( $\text{C}_2$ ); 66,70( $\text{C}_5$ ); 61,8( $\text{C}_1$ ); 24,5-27,6( $\text{C}_{8-11}$ ).

Os hidrogênios ligados aos carbonos da cadeia principal, com átomos de oxigênio vizinhos, apresentam deslocamentos entre 4,30-3,60. Os carbonos quaternários dos cetais cíclicos também pôde ser observado no espectro em 109,8-110,3 sendo encontrados em campo mais baixo por estarem entre dois átomos de oxigênios. A análise do espectro completo revela a obtenção do xilitol protegido puro.

O glicerol também foi protegido com acetona por mecanismo semelhante àquele apresentado na figura 16 e descrito para o xilitol. O resultado, em massa, do produto final obtido foi de 13,6815 g, correspondente à um rendimento de 64,78%. A reação global para a síntese do glicerol protegido é apresentada na figura 18 a seguir. O produto foi caracterizado por RMN. Os resultados da análise foram:

RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 3,95-3,52(m, 5H,  $\text{C}_{1-3}$ ); 3,92(sl, 1H, OH), 1,24 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$ : 109,2( $\text{C}_4$ ); 74,1( $\text{C}_2$ ); 65,6( $\text{C}_1$ ); 62,8( $\text{C}_3$ ); 24,1-26,8( $\text{C}_{5-6}$ ).

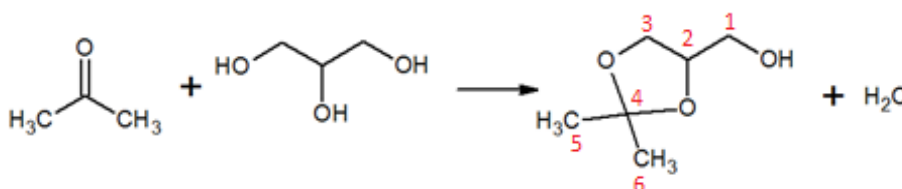


Figura 18 - Reação global proteção do glicerol

A literatura consultada apresenta resultados da ordem de 70,9% de conversão para 10 h de reação, estando em conformidade com os resultados obtidos nas proteções realizadas (SURIYAPRAPADILOK *et al.*, 2011)

## 5.2 SÍNTESE DE ÉSTERES DE AÇÚCARES VIA QUÍMICA

Foram, inicialmente, preparadas amostras contendo padrões de mono-oleatos de xilitol e glicerol através de via química para serem usados posteriormente em análises comparativas de espectroscopia de IV. Empregaram-se os métodos clássicos nessa preparação, visto que são métodos amplamente estudados na literatura e possuem etapas de purificação eficientes já descritas.

### 5.2.1 Síntese do cloreto de ácido oleico

Na primeira etapa da síntese do mono-oleato de açúcares foi sintetizado o cloreto de oleíla, empregando ácido oleico e cloreto de tionila. A figura 19 a seguir apresenta a proposta de mecanismo para esse tipo de reação proposta na literatura (SOLOMONS e FRYHLE, 2011).

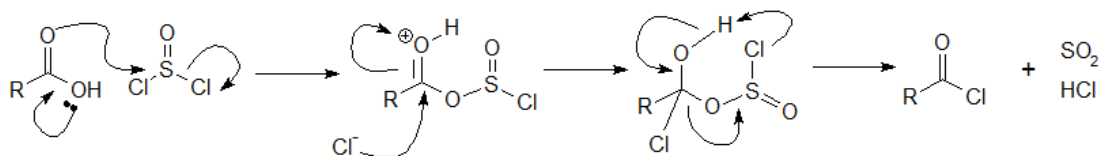


Figura 19 - Mecanismo proposto para a síntese de cloretos de ácido (SOLOMONS e FRYHLE, 2011)

A síntese de cloretos de ácido é uma técnica sintética tradicional na química orgânica, capaz de tornar a carbonila do grupo ácido carboxílico mais susceptível ao ataque de nucleófilos.

O oxigênio carbonílico do ácido é capaz de atuar como nucleófilo e atacar o enxofre do cloreto de tionila, que desloca a carga negativa para o oxigênio e, por ressonância, elimina um átomo de cloro. O íon cloreto formado, por sua vez, ataca o centro eletrofílico da estrutura do ácido e em seguida há um rearranjo, eliminando  $\text{SO}_2$  e  $\text{HCl}$  e formando o cloreto de ácido (SOLOMONS e FRYHLE, 2011).

### 5.2.2 Síntese do mono-oleato de xilitol

A esterificação do mono-oleato de xilitol foi realizada sem solvente e à temperatura ambiente. Entretanto, como é característico das rotas sintéticas tradicionais, fez uso de diversas etapas anteriores, nomeadamente a proteção das hidroxilas do xilitol e o preparo do cloreto de tionila, conforme apresentado no esquema da figura 20 a seguir.

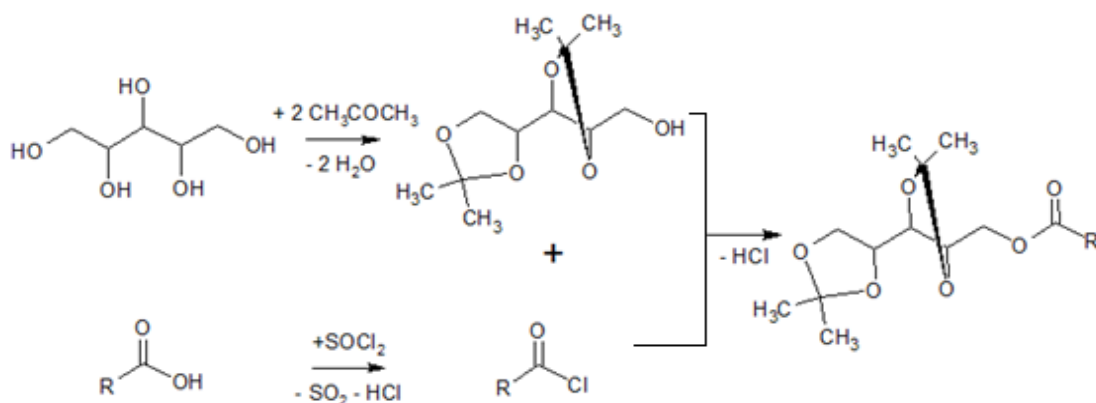


Figura 20 - Rota sintética para a formação do mono-oleato de xilitol protegido via química

Essa rota sintética faz uso de solventes e reagentes tóxicos (benzeno e cloreto de tionila), além de promover a formação de ácidos como subprodutos (HCl), ressaltando a necessidade de buscar vias menos agressivas de síntese, como a catálise enzimática.

O produto foi caracterizado em  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  após a desproteção das hidroxilas por acidificação do meio. A fórmula do produto final é apresentada na figura 21 e o espectro é descrito a seguir.

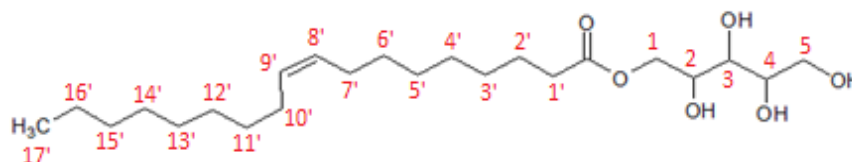


Figura 21 - Mono-oleato de xilitol

RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 5.45(m,2H,  $\text{H}_{8'-9'}$ ); 4,25(dd, 2H,  $\text{H}_{1a-1b}$ ); 1.87(m, 4H,  $\text{H}_{7' \text{ e } 10'}$ ); 1.39(m, 22H,  $\text{H}_{2'-6'}$  e  $\text{H}_{11'-16'}$ ); 0.98(t, 3H,  $\text{H}_{17'}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 175.6(C = O); 131.0-128.5( $\text{C}_{8'=\text{C}_{9'}}$ ); 71.4( $\text{C}_3$ ); 69.2( $\text{C}_2$ ); 71.1( $\text{C}_4$ ); 64.4( $\text{C}_1$ ); 64.1( $\text{C}_5$ ); 35.1( $\text{C}_{1'}$ ); 32.8( $\text{C}_{7'}$ ,  $10'$  e  $15'$ ); 29.7-29.1( $\text{C}_{3'-6'}$  e  $\text{C}_{11'-15'}$ ); 25,1( $\text{C}_2$ ); 22,9( $\text{C}_{16'}$ ) e 14.50( $\text{C}_{17'}$ ).

Na análise de RMN  $^1\text{H}$  os hidrogênios ligados aos carbonos da ligação dupla que aparecem no espectro em campo mais baixo deslocamento de 5,45. Para os carbonos  $\text{C}_{8'}$  e  $\text{C}_{9'}$ , foram encontrados deslocamento químico característico de carbonos insaturados (131,0-128,5). O carbono da carbonila foi determinado pelo deslocamento 175,6, característico de  $\text{C}=\text{O}$ . Os deslocamentos dos carbonos encontrados em campo mais alto (14,50) bem como seus hidrogênios (0,98) foram identificados como sendo a metila da extremidade da cadeia do grupo acila. A análise do espectro completo revela a obtenção do mono-oleato de xilitol puro.

### 5.2.3 Síntese de mono-oleato de glicerol

O monoéster do glicerol foi obtido de forma semelhante, e sua rota sintética está apresentada no esquema da figura 22 abaixo. Para sua síntese, entretanto, foi empregado sódio metálico, que no meio reacional é capaz de formar um sal do glicerol protegido, favorecendo sua atuação como nucleófilo.

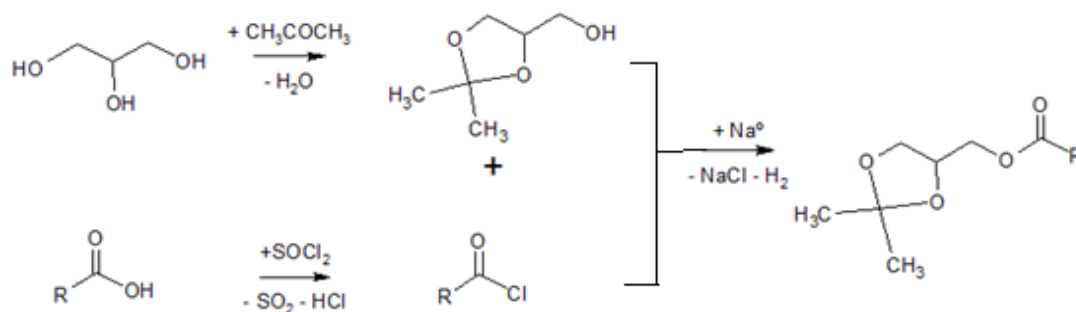


Figura 22 - Rota sintética para a formação do mono-oleato de glicerol protegido via química

Através da observação da rota sintética e a metodologia empregada nota-se a necessidade de prevenir a utilização de solventes e reagentes tóxicos, além dos subprodutos inflamáveis (gás hidrogênio) e do sódio metálico, explosivo. O produto final, após desproteção das hidroxilas, é apresentado na figura 23 a seguir, junto com sua respectiva caracterização.

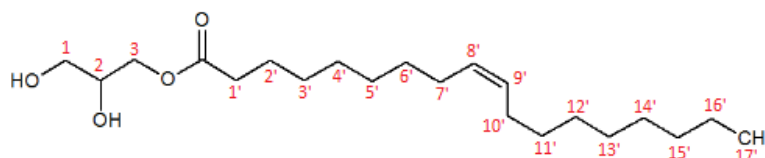


Figura 23 - Fórmula estrutural do mono-oleato de glicerol

RMN  $^1\text{H}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 5,79(sl, 1H, OH); 5,40(m, 2H,  $\text{H}_{8'-9'}$ ); 4,32(dd, 2H,  $\text{H}_{3a-3b}$ ); 4,20-3,52(m, 3H,  $\text{H}_{1-2}$ ); 3,94(sl, 1H, OH); 2,11(m, 4H,  $\text{H}_{7'}$  e  $\text{H}_{10'}$ ); 1,29(m, 22H,  $\text{H}_{1'-6'}$  e  $\text{H}_{11'-16'}$ ); 0,92(t, 3H,  $\text{H}_{17'}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 173,9(C = O); 130,55( $\text{C}_9=\text{C}_{10}$ ); 65,3( $\text{C}_3$ ); 71,1( $\text{C}_2$ ); 64,4( $\text{C}_1$ ); 34,3( $\text{C}_{1'}$ ); 27,8,8( $\text{C}_{7'}$  e  $\text{C}_{10'}$ ); 29,9-29,0( $\text{C}_{3'-6'}$  e  $\text{C}_{11'-15'}$ ); 25,1( $\text{C}_{2'}$ ); 22,9( $\text{C}_{16'}$ ) e 14,50( $\text{C}_{17'}$ ).

### 5.3 ESTERIFICAÇÃO POR CATÁLISE ENZIMÁTICA

A partir dos resultados alcançados no uso da lipase comercial, Novozym 435, em estudos anteriores (RUFINO *et al.*, 2010) e na literatura (KIM *et al.*, 2009), foi proposto o uso dessa enzima na síntese de ésteres de açúcares, visando a suavização das condições reacionais em comparação com as vias químicas tradicionais abordadas até o momento.

O emprego da lipase melhora os rendimentos reacionais em comparação às sínteses via química, já que essa subclasse de enzimas é capaz de atuar na interface entre substâncias polares e apolares e a maioria dos açúcares é insolúvel em solventes orgânicos. Além disso, o uso de enzimas aumenta a seletividade, favorecendo a obtenção do monoéster. A catálise enzimática, entretanto, aumenta os tempos reacionais (RUFINO *et al.*, 2009), tornando o processo desfavorável do ponto de vista econômico para os processos industriais. Rufino e col. (2009) obtiveram em 24 horas reacionais, conversões de 88% do xilitol na sua reação de esterificação com ácido oleico. A fim de garantir a competitividade dessas metodologias, foi proposto o uso de fontes alternativas de aquecimento, com a utilização de reatores de micro-ondas e banhos de ultrassom para reduzir o tempo reacional das reações de esterificação via catálise enzimática. Além disso, devido ao alto custo dos derivados enzimáticos imobilizados, outra proposta de estudo foi a reutilização do catalisador em ciclos consecutivos, avaliando assim a quantidade de ciclos possíveis que permitam o reuso da enzima sem perda pronunciada da sua atividade, reduzindo o custo final do processo.

### 5.3.1 Avaliação do rendimento da esterificação com catálise enzimática em diferentes fontes de aquecimento

#### 5.3.1.1 Esterificação do ácido oleico com xilitol via catálise enzimática em reator de micro-ondas

O emprego do reator de micro-ondas e do banho de ultrassom apresentam resultados positivos registrados na literatura para a redução dos tempos reacionais (MAVANDADI e PILOTTI, 2006; LERIN *et al.*, 2014). O reator de micro-ondas foi empregado na esterificação do xilitol com ácido oleico. Não foi utilizado o xilitol protegido, para possibilitar a análise da seletividade da lipase Novozym-435 na catálise enzimática para obtenção do mono-oleato de xilitol. A reação global é apresentada na figura 24.

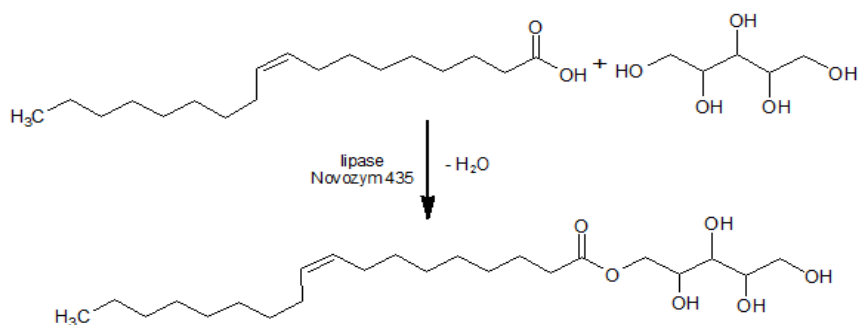


Figura 24 - Reação global de esterificação enzimática do ácido oleico e xilitol empregando Novozym 435



Essas reações foram acompanhadas empregando titulação de neutralização, do ácido oleico remanescente no meio reacional, com hidróxido de potássio  $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$  e indicador fenolftaleína. Foram retiradas alíquotas do meio reacional a cada hora e a titulação das mesmas foram realizadas em triplicata. Pela concentração de ácido oleico no meio (ácido não consumido no processo reacional), foi possível calcular o rendimento reacional. Os resultados estão apresentados na tabela 19 e em forma de gráfico na figura 25.

Tabela 19 - Concentrações ( $\text{mol.L}^{-1}$ ) de ácido oleico consumido por hora de reação e rendimento correspondente na esterificação do ácido oleico com xilitol em micro-ondas, empregando Novozym 435.

	Tempo					
	t = 0 h	t = 1 h	t = 2 h	t = 3 h	t = 4 h	t = 5 h
Concentração de ácido oleico consumido ( $\text{mol.L}^{-1}$ )	0,430	0,347	0,323	0,315	0,355	0,369
Rendimento (%)	0	76,8	96,5	70,1	56,7	23,1

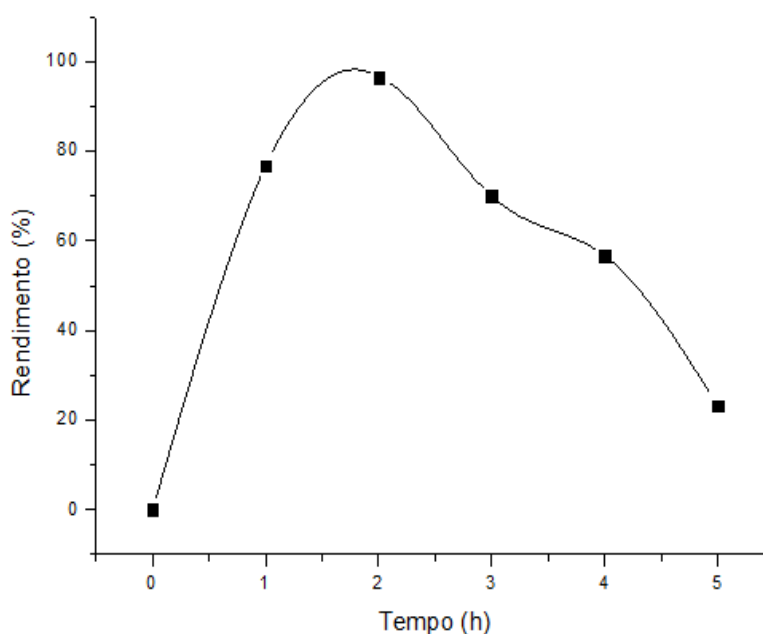


Figura 25 - Rendimento (%) por hora de reação na esterificação do ácido oleico com xilitol em micro-ondas empregando Novozym 435

Pelo gráfico da figura 25 é possível notar um aumento gradual no rendimento reacional, atingindo um máximo de 96,5% em torno de duas horas reacionais para esse sistema. Na literatura, os resultados das análises para essa síntese possuem rendimentos de

97%, semelhante aos resultados obtidos, em cerca de 24 h de reação. O emprego do micro-ondas permitiu a redução desse tempo reacional para 2 h obtendo rendimentos semelhantes, conforme previsto pela análise dos resultados da literatura (KIM *et al.*, 2004).

A queda observada para o rendimento reacional em tempos superiores a 2 horas é atribuída a fenômenos de hidrólise que se iniciam no meio reacional. A reação de esterificação libera moléculas de água no meio reacional gradativamente e as lipases são enzimas que, naturalmente, catalisam a hidrólise de ésteres quando estão em presença de água.

Após a purificação em coluna cromatográfica com hexano/éter etílico/metanol/ácido acético (78:17:2:3), o produto monossustituído foi identificado por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

A massa final de mono-oleato de xilitol foi de 0,116 g. Considerando a estequiometria da reação e a massa de xilitol adicionada (152 mg), o rendimento reacional para a obtenção do éster monossustituído foi de 27,89%. Esse rendimento alcançado indica uma seletividade enzimática na síntese de monoésteres com a Novozym 435 comparável àquela dos processos em esterificação com catálise enzimática em aquecimento tradicional. A seletividade de síntese aumenta a formação do produto de interesse e viabiliza o processo por remover etapas possivelmente mais complexas de purificação. Além disso, essas técnicas reduzem os custos com as etapas pós-sintéticas de purificação, que são facilitadas. Do ponto da química verde, a economia atômica, promovida aqui pela melhor seletividade do processo, e a redução de etapas de purificação são ambas características que atendem aos seus preceitos. Além disso, a técnica empregada conta com o uso do reator de micro-ondas, que promove redução do consumo de energia por conta da eficiência do aquecimento característico da técnica, visto que esse é uma consequência direta do tempo de reação.

Nos experimentos realizados ainda houve uma redução de 50% no volume do solvente em comparação com trabalhos publicados anteriormente (RUFINO *et al.*, 2009). Essa redução no volume do solvente é consequência da técnica de aquecimento por irradiação de micro-ondas, devido ao aquecimento promovido no interior do frasco reacional, que diminui a necessidade de promover fenômenos de convecção.

Considerando que o rendimento global da reação, calculado pelo consumo do ácido graxo, foi de 96,5% de mistura contendo mono e poliésteres, a massa destes equivale a 0,403 g, indicando que a obtenção de 0,116 g do  $\alpha$ -monoéster purificado representa uma seletividade de 28,78% do rendimento e evidenciando a seletividade já prevista para a enzima Novozym 435 nestas reações.

### 5.3.1.2 Esterificação do ácido oleico com xilitol via catálise enzimática em banho de ultrassom

Em função dos resultados promissores obtidos com o emprego de micro-ondas na catálise enzimática, as condições reacionais foram mantidas no estudo do aquecimento por ultrassom. A análise das condições reacionais, entretanto, foi feita com a retirada de alíquotas a cada 30 minutos e titulação, em duplicata, empregando um potenciômetro MS-Tecnonon MS-150 a fim de reduzir-se os erros associados à metodologia de análise com indicador visual. Os gráficos no Apêndice I mostram as curvas de titulação obtidas. Os pontos de equivalência foram obtidos pelo método da segunda derivada. Novamente foi possível, pela concentração de ácido oleico no meio, calcular o rendimento reacional. Os resultados estão apresentados na tabela 20 e com eles foi gerado o gráfico na figura 26.

Tabela 20 - Concentrações (mol.L<sup>-1</sup>) de ácido oleico consumido por hora de reação e rendimento correspondente na esterificação do ácido oleico com xilitol em ultrassom, empregando Novozym 435.

	Tempo					
	t = 0 h	t = 0,5 h	t = 1,0 h	t = 1,5 h	t = 2,0 h	t = 2,5 h
Concentração de ácido oleico consumido (mol.L <sup>-1</sup> )	0,000	0,035	0,101	0,149	0,143	0,127
Rendimento (%)	0,0	17,6	50,7	74,6	71,5	63,7

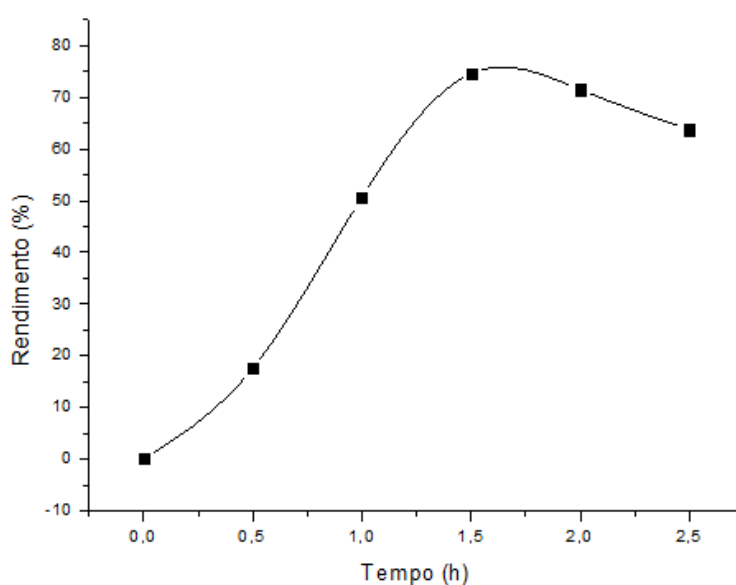


Figura 26 - Rendimento (%) por hora de reação na esterificação do ácido oleico com xilitol em ultrassom empregando Novozym 435

A conversão máxima alcançada (74,6%) ocorreu em uma hora e meia de reação, indicando uma redução em comparação com os tempos reacionais de 15 h registrados na literatura, apesar da perda de 21,9% em rendimento (KIM *et al.*, 2004)

Após a purificação, feita em coluna cromatográfica empregando hexano/éter etílico/metanol/ácido acético (78:17:2:3), a massa do monoéster obtida na esterificação com banho de ultrassom foi de 92,7 mg. Considerando o rendimento reacional de 74,6% para a formação dos produtos (mono e poliésteres) esta massa correspondeu a uma seletividade em torno de 30% para a formação de monoésteres, valor comparável aos resultados anteriores com o micro-ondas (27,89%).

Em alguns estudos, observou-se que na formação de ésteres de poliálcoois, o rendimento no tempo máximo constitui-se de uma mistura de monoésteres e poliésteres, enquanto que alíquotas analisadas antes que o tempo máximo fosse alcançado apresentam uma maior proporção do monoéster presente no meio. Com essas análises, foi possível identificar seletividades de quase 100% na formação de monoésteres em tempos reduzidos para a catálise enzimática em aquecimento tradicional (ARCOS *et al.*, 1998a; ARCOS *et al.*, 1998b; OTERO *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2015). Esses resultados apontam que seletividades ainda melhores podem ser obtidas também durante o emprego de tecnologias de aquecimento alternativas.

A melhoria nos tempos reacionais alcançada mostra um avanço na busca por métodos sintéticos alternativos, conduzindo reações com menores impactos ambientais, nomeadamente a suavização das condições reacionais, redução das etapas de purificação e eliminação da necessidade de etapas sintéticas anteriores.

Ao se manterem as condições reacionais exploradas na reação com o reator de micro-ondas, o banho de ultrassom também apresentou a possibilidade de redução do volume de solvente em 50% se comparado com resultados da literatura (RUFINO *et al.*, 2009)

### 5.3.2 Avaliação do rendimento da esterificação com catálise enzimática em ciclos consecutivos de reuso da enzima

No estudo do reuso da enzima, a mesma matéria enzimática foi empregada em 5 reações consecutivas. Nessas reações foi empregada a técnica de aquecimento por micro-ondas, visto que publicações anteriores consideram que a agitação mecânica promovida pelo ultrassom danifica o suporte imobilizado, reduzindo a eficiência do catalisador em usos posteriores. Foram repetidas as condições reacionais empregadas na esterificação do ácido oleico com xilitol em reator de micro-ondas e as análises realizadas por titulação com

fenolftaleína de alíquotas em triplicatas a cada hora. Os resultados, em termo de concentração de ácido oleico remanescente, estão apresentados na tabela 21 a seguir.

Os resultados foram corrigidos, considerando-se a redução do volume reacional e com isso calcularam-se os rendimentos para a reação a cada hora baseando-se no consumo de ácido oleico, conforme os valores apresentados na tabela 22 adiante.

Tabela 21 - Resultados em concentração molar por hora para 5 ciclos de uso da Novozym 435 nas esterificações do ácido oleico com xilitol em reator de micro-ondas.

Ciclo de uso	Concentração do ácido oleico (mol.L <sup>-1</sup> )					
	t = 0 h	t = 1 h	t = 2 h	t = 3 h	t = 4 h	t = 5 h
1º	0,430	0,337	0,313	0,344	0,358	0,393
2º	0,385	0,302	0,281	0,315	0,341	0,362
3º	0,382	0,308	0,290	0,328	0,333	0,373
4º	0,412	0,386	0,381	0,361	0,369	0,407
5º	0,423	0,398	0,393	0,387	0,417	0,422

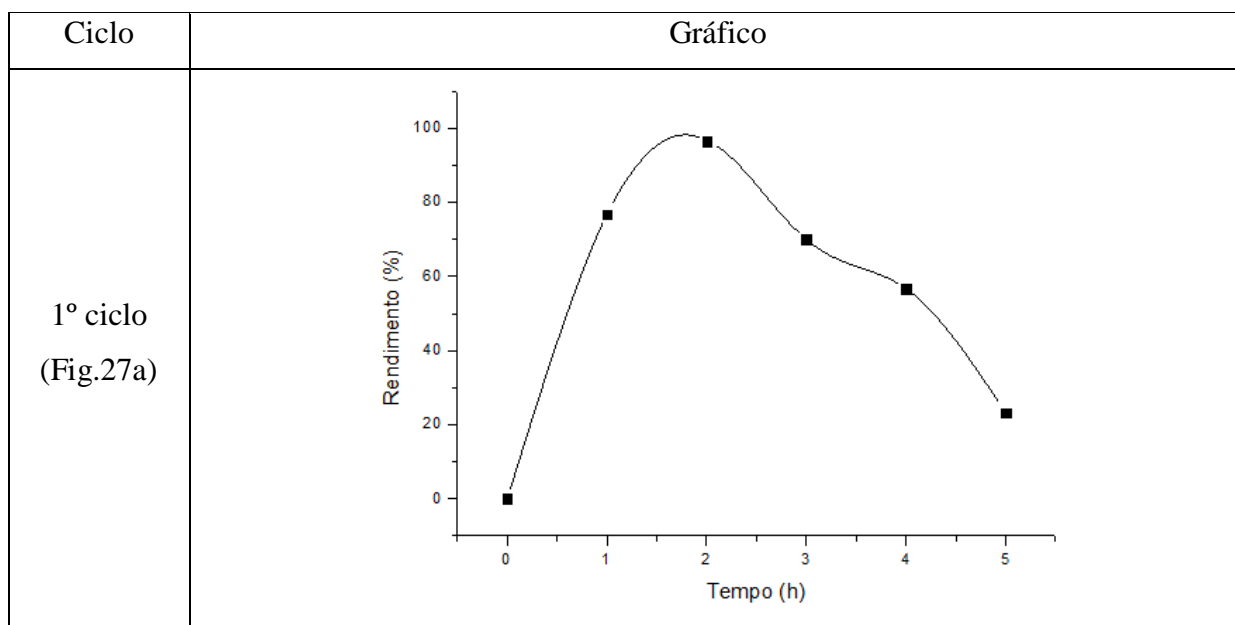
Tabela 22 - Conversão percentual da concentração de ácido oleico para 5 ciclos de uso da Novozym 435 na esterificação com aquecimento por micro-ondas por hora.

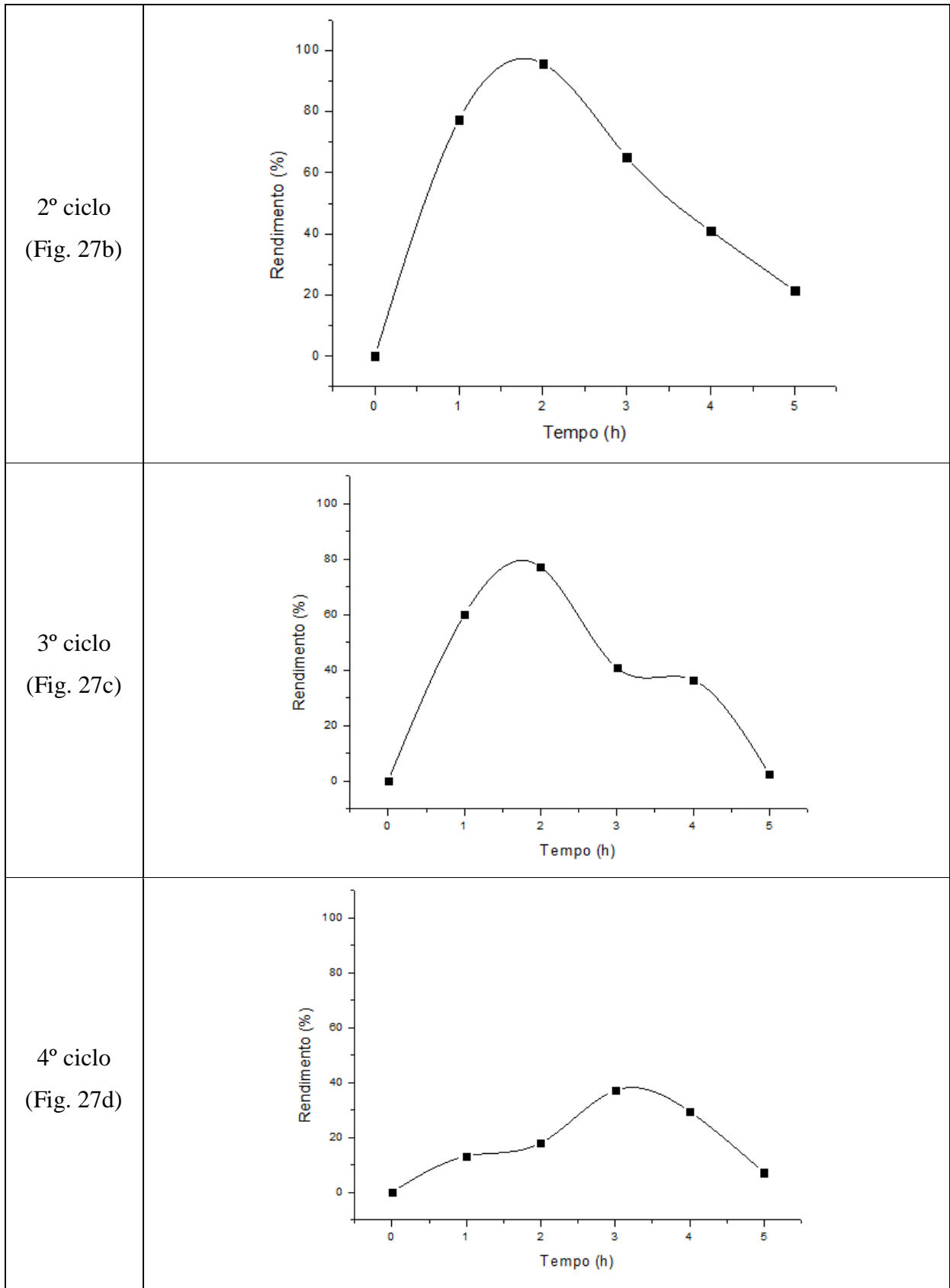
Ciclo de uso	Rendimento (%)					
	t = 0 h	t = 1 h	t = 2 h	t = 3 h	t = 4 h	t = 5 h
1º	0,0	76,8	96,5	70,1	56,7	23,1
2º	0,0	77,2	95,7	65,1	40,9	21,4
3º	0,0	60,0	77,2	40,8	36,4	2,4
4º	0,0	13,1	17,9	37,1	29,4	7,1
5º	0,0	23,3	27,9	33,5	5,6	0,9

O maior rendimento obtido foi de 96,5% para 2 horas reacionais no primeiro uso da enzima, seguido pelo rendimento de 95,7% para 2 horas reacionais no segundo ciclo reacional. A redução de apenas 0,8% do rendimento deixa claro que o derivado enzimático imobilizado pode ser empregado mais de uma vez em reações de esterificação com aquecimento micro-ondas sem que haja perdas consideráveis para o processo.

No terceiro ciclo o rendimento máximo ainda é obtido em 2 horas de reação (77,2%), mas apresentou queda considerável. No quarto e quinto ciclos o rendimento máximo é em torno de 35%, mostrando uma redução drástica. Além disso, há um aumento no tempo reacional para a obtenção do rendimento máximo, indicando uma perda de atividade do derivado imobilizado, que, após muitos ciclos de uso, perde a atividade em alguns de seus sítios ativos e passa a levar mais tempo para promover o consumo e conversão dos reagentes (KIM *et al.*, 2004). Reações posteriores ao quinto ciclo podem indicar ainda rendimento reacional mensurável. Apesar de baixos em relação ao primeiro rendimento apresentado, esses valores revelam que ainda há atividade enzimática e que o catalisador pode ter uso, reduzindo sua necessidade de descarte, fator ambientalmente favorável, e permitindo seu reuso para diferentes fins, economicamente vantajoso.

Os gráficos na figura 27 mostram claramente o rendimento reacional em função do tempo. A queda apresentada após o rendimento máximo pode estar relacionada com o aumento da concentração de água no meio e hidrólise dos produtos obtidos.





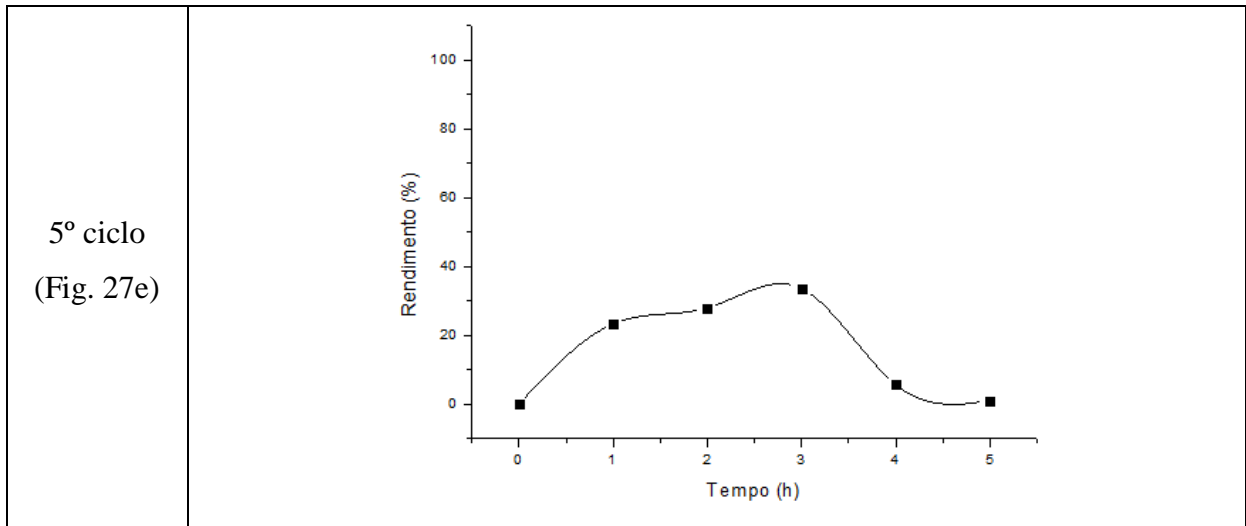


Figura 27 - Acompanhamento por consumo percentual de ácido oleico de cinco ciclos de utilização da lipase Novozym 435

Pelos gráficos é fácil notar a perda de atividade da lipase nos usos posteriores. O gráfico 28 a seguir apresenta os cinco gráficos anteriores sobrepostos. A diferença de eficiência perdida entre o primeiro e segundo ciclo é desprezível. Ela se torna mais aparente no terceiro ciclo reacional e nos quarto e quinto ciclos é evidente a baixa atividade, com alteração no perfil da curva e resultados máximos obtidos 1 hora após os máximos do primeiro ciclo.

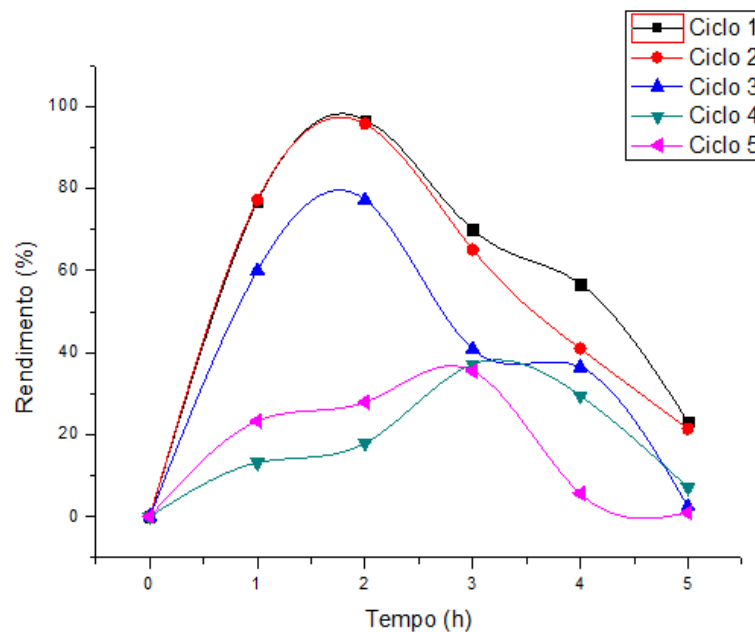


Figura 28 - Acompanhamento por consumo percentual de ácido oleico para cinco ciclos de utilização da lipase Novozym 435

Mesmo com a perda de atividade, é relevante ressaltar que as conversões, mesmo em tempos mais longos, são significativas, nos valores em torno de 35%.



Trabalhos divulgados por Stamatis e colaboradores (1998) relataram a reutilização de uma lipase extraída de *Fusarium oxysporum* na síntese de ésteres de gerânio em 5 ciclos consecutivos, registrando apenas uma leve perda da eficiência enzimática, cerca de 10%. As maiores conversões obtidas estavam entre 70% e 80% de rendimento em tempos longos de incubação de 96 h.

Kim e colaboradores (2004) também relatam o emprego da lipase de *Candida antarctica* em até 9 ciclos consecutivos de esterificações do ácido oleico, relatando perda de metade da atividade enzimática nesse período, registrando rendimentos de 97% no primeiro ciclo. É possível concluir ainda, a partir desses trabalhos, que novos ciclos além do quinto podem apresentar resultados de conversão consideráveis na síntese desses surfactantes, mesmo que reduzida em comparação aos valores alcançados no primeiro ciclo.

### 5.3.3 Obtenção de ésteres de xilitol com diferentes ácidos graxos

Com o objetivo de obter novos ésteres de açúcares através da metodologia de catálise enzimática e aquecimento em reator de micro-ondas, foi realizada uma esterificação empregando xilitol protegido e diferentes ácidos graxos.

#### 5.3.3.1 Esterificação do ácido adípico com xilitol através de catálise enzimática em banho de ultrassom

Na esterificação do xilitol com ácido adípico, as condições empregadas na síntese do mono-oleato de xilitol foram mantidas, porém o acompanhamento da reação foi realizado apenas qualitativamente através de cromatografia de camada fina (TLC) com a mistura hexano/éter etílico/metanol/ácido acético (78:17:2:3) empregada como fase móvel. A figura 29 a seguir apresenta a reação global.

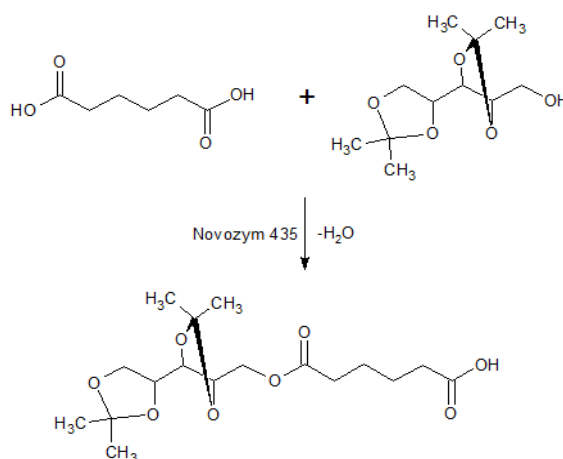


Figura 29 - Reação global de esterificação enzimática do ácido adípico e xilitol protegido empregando Novozym 435

Destaca-se que a síntese de monoésteres de xilitol empregando catálise enzimática e aquecimentos por micro-ondas é uma metodologia inédita na literatura, havendo poucos parâmetros de comparação em termos de eficiência reacional.

O produto dessa síntese foi purificado em uma coluna cromatográfica com hexano/éter etílico/metanol/ácido acético (78:17:2:3) e posteriormente pesado. A massa final de monoéster de xilitol foi de 55 mg, correspondente a 19,62% do rendimento na obtenção do éster monossustituído, considerando a massa inicial de xilitol protegido adicionado.

### 5.3.3.2 Esterificação do ácido butírico com xilitol através de catálise enzimática em banho de ultrassom

Também foi realizada a esterificação empregando como substrato o ácido butírico. Em trabalhos anteriores (RUFINO *et al.*, 2009) a esterificação do xilitol com ácido butírico foi realizada empregando a catálise enzimática e conduzindo a rendimentos de cerca de 74% em 24 horas reacionais. No presente trabalho a esterificação do ácido butírico foi realizada através de metodologia semelhante, porém empregando o aquecimento em banho de ultrassom. A reação foi acompanhada por titulação potenciométrica. As curvas de titulação são apresentadas no Apêndice I e os resultados de conversão estão sumarizados na tabela 23 a seguir.

Tabela 23 - Concentrações (mol.L<sup>-1</sup>) de ácido butírico consumido por hora de reação e rendimento correspondente na esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom, empregando Novozym 435.

	Tempo					
	t = 0 h	t = 0,25 h	t = 0,5 h	t = 1,0 h	t = 1,5 h	t = 2,0 h
Concentração de ácido oleico consumido (mol.L <sup>-1</sup> )	0,000	0,004	0,013	0,0298	0,013	0,005
Rendimento (%)	0,0	6,43	20,03	44,99	19,72	8,07

Os rendimentos reacionais para a esterificação do xilitol com o ácido butírico foram de aproximadamente 45% em apenas 1 hora de reação, empregando catálise enzimática e o banho de ultrassom, o que representa uma redução de 90% do tempo reacional para as metodologias e resultados encontrados na literatura para essa síntese em aquecimento convencional e com catálise enzimática (RUFINO *et al.*, 2008).

Como era esperado a partir da análise dos resultados presentes na literatura, os rendimentos da esterificação com o ácido butírico foram inferiores aos da esterificação com o ácido oleico. Os resultados do estudo de Rufino e colaboradores (2008) corroboram essa observação. Isso se deve, principalmente, à uma propriedade da Novozym 435 possuir sítios onde o ácido oleico consegue se complexar com mais eficiência que o butírico. O produto foi purificado coluna cromatográfica com hexano/éter etílico/metanol/ácido acético (78:17:2:3) e foram obtidas 39,8 mg do monoéster, correspondente a cerca de 27% de rendimento reacional, indicando a boa seletividade da enzima Novozym 435 na esterificação do xilitol.

#### 5.3.4 Avaliação da seletividade na obtenção de monoésteres de ácido oleico com diferentes poliálcoois e poliálcoois protegidos

A Novozym 435 é uma enzima que apresenta grande seletividade no sentido de formação de ésteres monossustituídos (RUFINO *et al.*, 2008). Segundo os trabalhos de Arcos e col. (2017), a seletividade na formação do monoéster é ainda maior em tempos inferiores ao tempo do rendimento máximo da reação. Segundo a pesquisa realizada pelos autores, foi possível observar, através da análise em CLAE, que a formação do monoéster é crescente até atingir máximo de rendimento e, a partir desse ponto o monoéster passa a ser consumido através de dois mecanismos diferentes possíveis: i) ocorre hidrólise do monoéster, tornando o ácido graxo disponível novamente no meio reacional para ser empregado na formação de diésteres ou ii) o monoéster sofre nova esterificação, tornando-se um diéster. Em ambos os casos, a concentração de monoésteres no meio reacional reduz enquanto que a formação de poliésteres cresce. Observados esses resultados, é interessante para o presente trabalho que tal estudo seja realizado e que se conheça o comportamento dos monoésteres de ácido oleico e diferentes poliálcoois durante a esterificação com a lipase Novozym 435.

A separação em CLAE, segundo a metodologia descrita, levou aos resultados tabelados no apêndice IV. Para a análise dos resultados de formação do monoéster, foram empregados os valores das integrações das bandas referentes ao tempo de retenção do monoéster de xilitol, identificado para cada substrato empregado. A tabela 24 a seguir lista os valores de referência utilizados.

Tabela 24 - Tempos de retenção de referência para as análises em CLAE deste trabalho para os monoésteres formados por ácido oleico e poliálcoois diversos.

Poliálcool empregado como substrato para o éster analisado	Tempo de retenção de referência (min)
Glicerol	1,196
Glicerol Protegido	1,193
Xilitol	1,201
Xilitol Protegido	1,200

As análises foram feitas para alíquotas retiradas nos tempos de 5, 10, 20, 30, 60 e 90 minutos de reação. Para uma análise comparativa dos resultados, a banda de maior valor de integração foi selecionada como o rendimento máximo (100%) na formação de monoéster possível para a dada esterificação.

Para a reação empregando o xilitol e o ácido oleico, os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 25 a seguir. Em 20 minutos, o valor da integração da banda do monoéster foi o superior nos tempos analisados, e, para a análise nesse trabalho, foi considerado como 100% de rendimento possível para o monoéster. Com base nisso, os outros valores de rendimentos obtidos em relação ao rendimento superior foram calculados e o gráfico na figura 30 apresenta uma curva indicativa do comportamento dessa reação.

Tabela 25 - Conversão relativa do monoéster de xilitol empregando ácido oleico, calculada com base na área de integração dos picos do espectro obtido por CLAE para diferentes tempos reacionais.

Tempo (min)	Área	Conversão relativa (%)
5	107923	11,9
10	311050	34,4
20	904917	100,0
30	887798	98,1
60	404964	44,8
90	387790	42,9

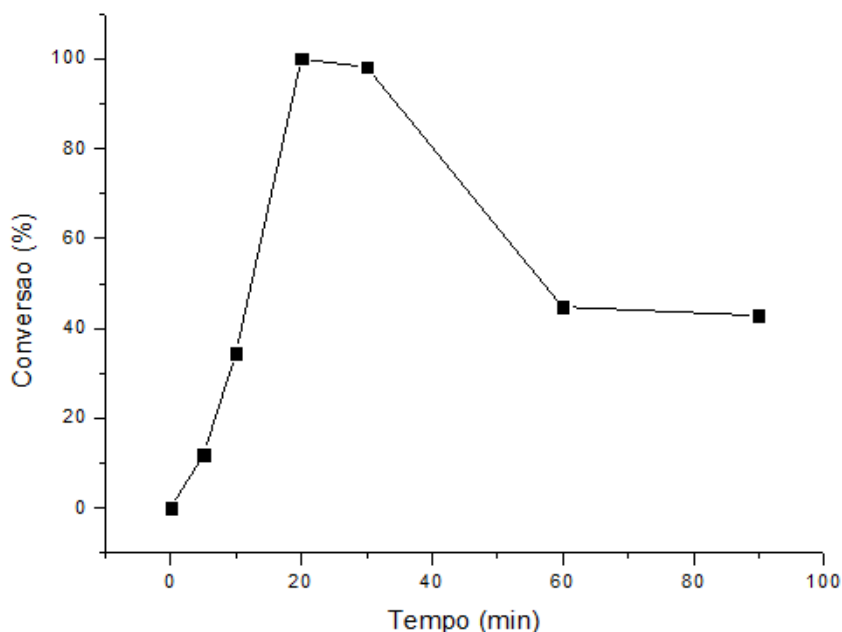


Figura 30 - Gráfico da conversão relativa do monoéster de xilitol empregando ácido oleico para diferentes tempos reacionais

No gráfico da figura 30 é possível observar que entre 20 e 30 minutos reacionais, a formação do monoéster de xilitol empregando ácido oleico é a máxima possível com a metodologia de catálise enzimática utilizando a Novozym 435 e banho de ultrassom. Nesse trabalho foi possível observar que o rendimento reacional máximo só é alcançado em tempos reacionais de 1h30min. Confirmando que a seletividade da reação é maior para tempos reacionais inferiores ao do rendimento máximo. Esse resultado é condizente com os resultados obtidos por Arcos e col. (1998a, 1998b) em dois estudos diferentes sobre a esterificação de poliálcoois empregando a lipase Novozym 435, nos quais aponta que análises de alíquotas de tempos inferiores ao tempo máximo reacional possuem a tendência de registrarem maior proporção do monoéster.

O xilitol protegido também apresentou esse comportamento. A tabela 26 a seguir apresenta os valores de área de integração para a banda do monoéster e a área relativa à produção máxima desse produto em porcentagem. A figura 31 apresenta esses valores de conversão relativa em relação ao tempo em um gráfico.

Tabela 26 - Conversão relativa do monoéster de xilitol protegido empregando ácido oleico, calculada com base na área de integração dos picos do espectro obtido por CLAE para diferentes tempos reacionais.

Tempo (min)	Área	Conversão relativa (%)
5	67859	4,9
10	371490	27,0
20	1373876	100,0
30	1311847	95,5
60	349331	25,4
90	101190	7,4

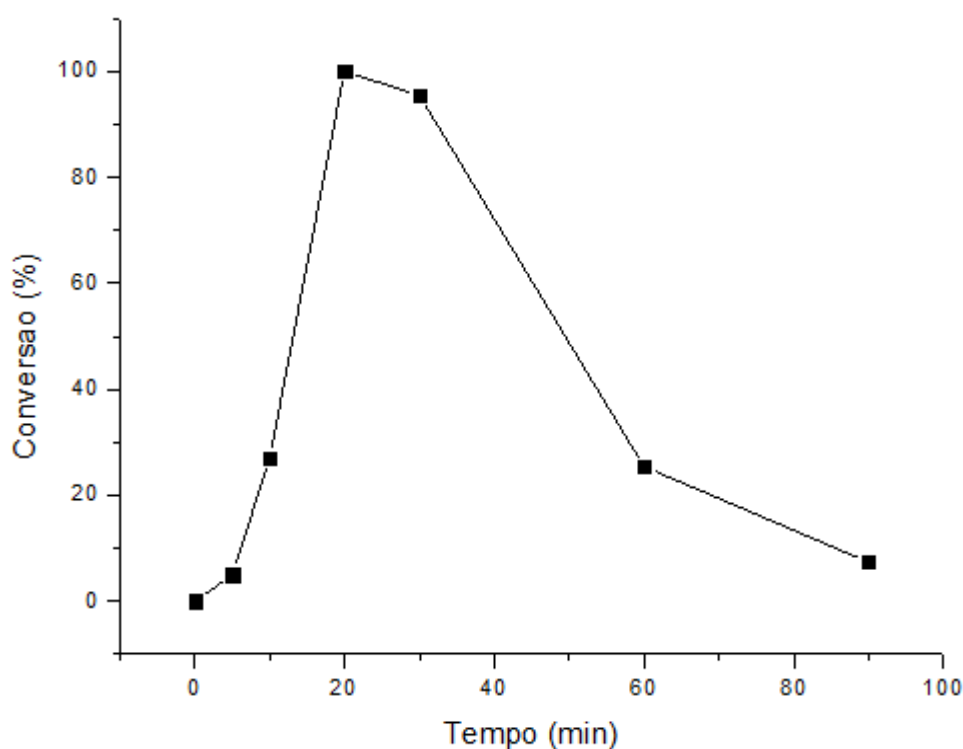


Figura 31 - Gráfico da conversão relativa do monoéster de xilitol protegido empregando ácido oleico para diferentes tempos reacionais

Novamente, para o xilitol protegido, a conversão máxima foi obtida em torno de 20 minutos reacionais.

Os dados de integração do CLAE também fornecem a área relativa entre as bandas do monoéster, dos poliésteres e do ácido graxo empregado. Considerando a área da integração proporcional à concentração, temos o valor do rendimento reacional. Dessa forma na tabela

27 abaixo são apresentados os valores de rendimento reacional para o monoéster de xilitol e de xilitol protegido nos tempos de 20 minutos de esterificação em banho de ultrassom, já calculados em face ao excesso de ácido graxo adicionado.

Tabela 27 - Rendimento reacional no tempo máximo para o monoéster obtido empregando ácido oleico e, como substrato, o xilitol e o xilitol protegido.

Substrato empregado	Rendimento (%)
Xilitol	63,2476
Xilitol protegido	83,1321

Comparando-se os resultados obtidos, observa-se um melhor rendimento para a formação de monoésteres empregando-se o xilitol protegido, como já era esperado, visto que a poliesterificação nas hidroxilas protegidas só ocorre quando há hidrólise dos grupos cetais formados na etapa de proteção. Além disso o rendimento de cerca de 63% na síntese do monoéster de xilitol sem proteção mostra uma seletividade muito maior do que aquela observada para o tempo da conversão máxima do ácido oleico observada anteriormente nesse trabalho. Com isso é possível identificar que seletividades melhores são obtidas em menores tempos reacionais para a monoesterificação do que aquelas observadas de cerca de 30% nos tempos máximos de 1,5 h de reação em ultrassom.

O mesmo estudo foi feito para os substratos de glicerol e glicerol protegido. A tabela 28 a seguir apresenta os resultados da integração das bandas do monoésteres de glicerol identificadas pelo CLAE para os tempos reacionais diferentes.

Tabela 28 - Conversão relativa do monoéster de glicerol empregando ácido oleico, calculada com base na área de integração dos picos do espectro obtido por CLAE para diferentes tempos reacionais.

Tempo (min)	Área	Conversão relativa (%)
5	153403	19,2
10	625191	78,2
20	799620	100,0
30	790341	98,8
60	543506	68,0
90	556811	69,6

A figura 32 apresenta os dados da tabela anterior em um gráfico. Nele é possível observar que o rendimento máximo de formação do monoéster de glicerol é atingido em cerca de 20 minutos de reação.

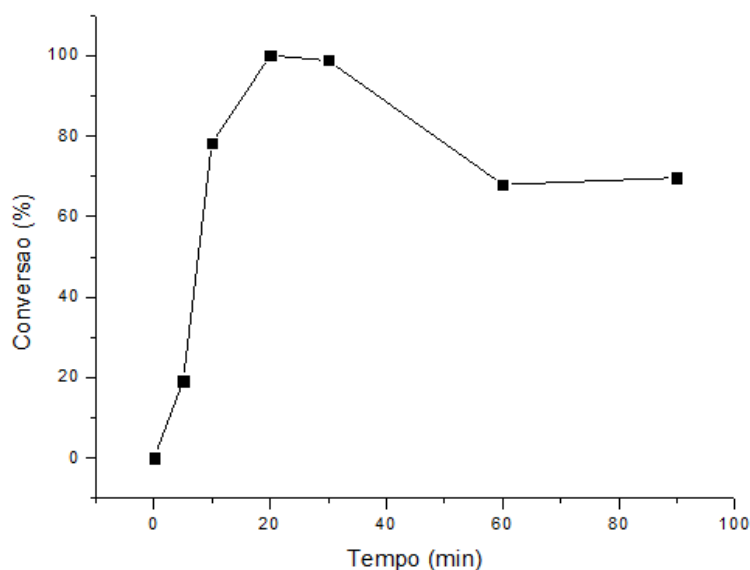


Figura 32 - Gráfico da conversão relativa do monoéster de glicerol empregando ácido oleico para diferentes tempos reacionais

Esse comportamento, já esperado, foi similar ao da esterificação empregando o xilitol. Segundo a literatura (WANG *et al.*, 2013) os rendimentos máximos, de aproximadamente 93%, para a esterificação do glicerol com ácido oleico empregando catálise enzimática são atingidos em torno de 8h de reação, com seletividade em torno de 73% do monoéster.

Para o glicerol protegido os resultados possuem o mesmo comportamento. Os dados obtidos para essa reação estão sumarizados na tabela 29 e no gráfico da figura 33 a seguir.

Tabela 29 - Conversão relativa do monoéster de glicerol protegido empregando ácido oleico, calculada com base na área de integração dos picos do espectro obtido por CLAE para diferentes tempos reacionais.

Tempo (min)	Área	Conversão relativa (%)
5	129914	6,6
10	1078746	54,8
20	1298523	65,9
30	1969160	100,0
60	296762	15,1
90	221218	11,2



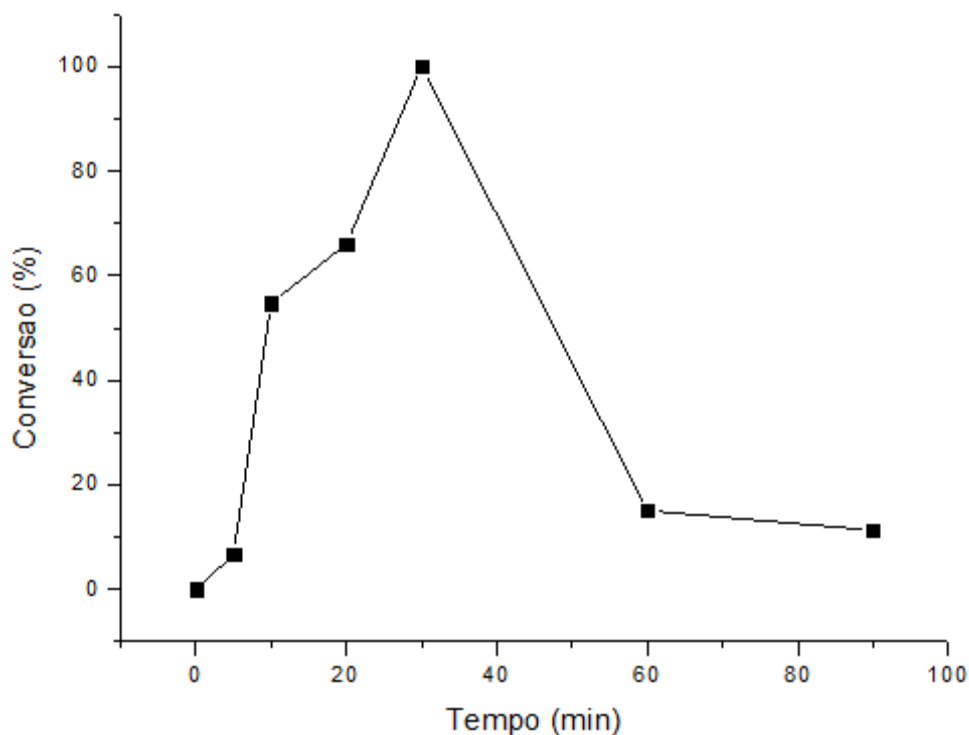


Figura 33 - Gráfico da conversão relativa do monoéster de glicerol protegido empregando ácido oleico para diferentes tempos reacionais

Novamente, os resultados de rendimentos superiores na síntese do monoéster para tempos reacionais menores já eram esperados. Diferentemente dos resultados anteriores, o rendimento máximo foi obtido em cerca de 30 minutos de reação. Baseado na área porcentual da banda do monoéster em relação a todos os produtos presentes na alíquota retirada aos 20 minutos para a reação empregando o glicerol e 30 minutos para àquela com o glicerol protegido, foi possível obter os rendimentos para a síntese, conforme estão apresentados na tabela 30 a seguir.

Tabela 30 - Rendimento reacional no tempo máximo para o monoéster obtido empregando ácido oleico e, como substrato, o glicerol e o glicerol protegido.

Substrato empregado	Rendimento (%)
Glicerol	76,7260
Glicerol protegido	86,6859

Novamente, o protegido conduziu a rendimentos superiores de monoesterificação em relação ao glicerol não-protegido, visto a indisponibilidade maior das hidroxilas do poliálcool, que estão envolvidas em cetais formados durante a etapa de proteção.

### 5.3.5 Avaliação do rendimento reacional da esterificação com catálise enzimática em diferentes solventes

Segundo os estudos apresentado por Rufino (2008), o terc-butanol é o solvente mais adequado para as esterificações do xilitol com ácidos graxos, conduzindo a conversões molares da ordem de 80%. Fu e Vasudevan (2009) discutem o papel do terc-butanol como solvente nas reações de esterificação, e, em seus resultados, apresentam o iso-octano como o melhor solvente para conduzir estas sínteses.

Foi realizado então as esterificações do xilitol com ácido oleico empregando catálise enzimática através da enzima comercial Novozym 435 em aquecimento por banho de ultrassom empregando o iso-octano como solvente reacional, visto que ele é apontado como o solvente reacional mais apropriado para conduzir a melhores resultados. Alíquotas foram tituladas em duplicata a cada 30 minutos de reação, quantificando-se a concentração de ácido oleico consumida. Os resultados calculados para a conversão de ácido oleico estão apresentados na tabela 15 a seguir para o terc-butanol e o iso-octano. O gráfico na figura 34 adiante deixa claro as tendências apresentadas no uso desses dois solventes.

Tabela 31 - Rendimento calculado com base no consumo de ácido oleico para a reação de esterificação do xilitol empregando a Novozym 435 e banho de ultrassom em diferentes solventes.

Tempo (h)	Rendimento (%)	
	Terc-butanol	Iso-octano
0,0	0	0
0,5	17,6	0,5
1,0	50,7	15,3
1,5	74,6	13,9
2,0	71,5	12,4
2,5	63,7	7,3

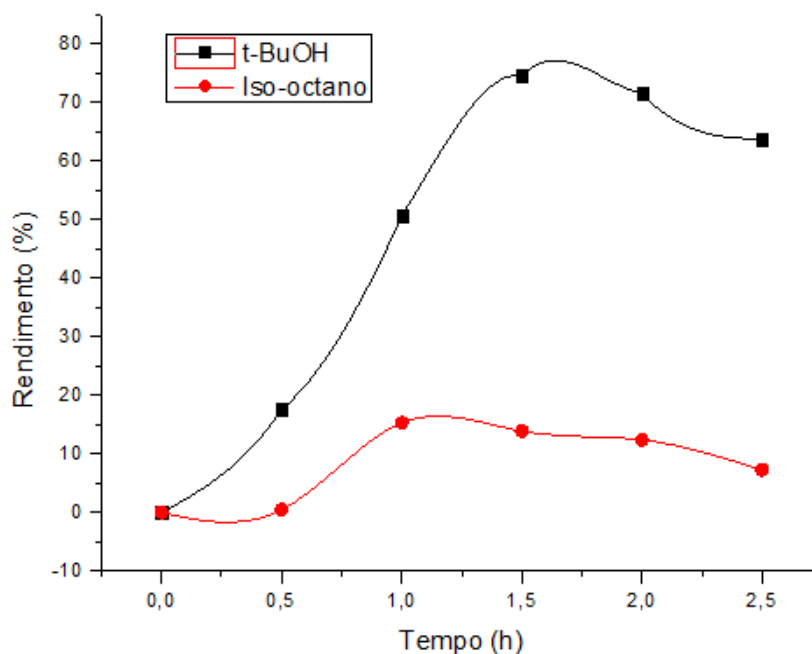


Figura 34 - Rendimento (%) por hora de reação na esterificação do ácido oleico com xilitol em ultrassom empregando Novozym 435 com t-BuOH e iso-octano

Os resultados de rendimento reacional para as reações desenvolvidas empregando o terc-butanol como solvente atingiram valores acima de 70% em 1,5 hora reacional. Já para o iso-octano, o maior rendimento foi de apenas 15,3% de rendimento em 1 hora de reação. Rufino e col. (2008) já haviam apontado o terc-butanol como um solvente mais adequado, principalmente por promover uma solubilização eficiente do poliálcool. Resultados das análises de CLAE para alíquotas dessa reação (apresentados a seguir) mostraram também que o terc-butanol é inerte no meio para essas condições reacionais e não há evidências da presença do produto de esterificação entre esse álcool terciário e o ácido graxo empregado.

A tabela 32 a seguir mostra, vistas as vias sintéticas químicas e enzimáticas presentes nesse trabalho, algumas das principais diferenças metodológicas entre elas, com ênfase no impacto ambiental que podem causar. Destaca-se que a via clássica (química) de síntese faz uso de reagentes e subprodutos perigosos, tanto ao meio ambiente quanto à segurança humana, enquanto que a via enzimática possui uma metodologia muito mais suave. Não está representado na tabela, mas também é importante notar que as vias enzimáticas geralmente possuem temperaturas de operação muito mais suaves que as vias clássicas e trabalha com ambientes em pH moderado.

Tabela 32 - Condições reacionais nas sínteses via clássica e via enzimática empregadas no presente trabalho.

<b>Via clássica</b>	<b>Via enzimática</b>
Reagentes perigosos (Na <sup>o</sup> ; SOCl <sub>2</sub> )	--
Subprodutos poluentes (HCl; SO <sub>2</sub> )	Água como subproduto
Solventes tóxicos (benzeno)	Solventes menos tóxicos ( <i>t</i> -BuOH; iso-octano)
Etapas intermediárias (proteção do xilitol; preparação do cloreto de ácido)	--

## 6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi estudado o emprego de técnicas de aquecimento utilizando reator de micro-ondas e banho de ultrassom em concomitância com a catálise enzimática empregando a lipase Novozym 435 na esterificação de poliálcoois com ácidos graxos.

Na síntese do mono-oleato de xilitol a catálise enzimática com o aquecimento por micro-ondas e por ultrassom forneceu, respectivamente, rendimentos de 96,5% em 2 horas e de 74% em 1,5 horas de reação, similares aos valores encontrados na literatura, porém com redução do tempo reacional em até 87%, o que comprova a eficiência do método que alcançou ótimos rendimentos em baixo tempos reacionais. A economia de energia proporcionada pela redução do tempo reacional atende à uma das principais demandas da Química Verde.

A catálise enzimática apresentou-se como uma alternativa viável com relação à seletividade para obtenção de monoésteres, fornecendo o produto monossustituído com 30% de rendimento, dispensando a etapa intermediária de proteção, atendendo assim mais um dos preceitos da Química Verde, que consiste em evitar etapas intermediárias nos processos sintéticos.

As fontes alternativas de aquecimento possibilitaram a redução do volume de solvente em 75%, comparado com as metodologias que fazem uso do aquecimento tradicional.

Mostrando ser uma alternativa mais viável do ponto de vista ambiental e atendendo outra demanda da Química Verde, que se trata da redução e/ou eliminação do solvente reacional.

Na análise do uso em ciclos seguidos da enzima Novozym 435 os resultados mostraram, para o primeiro e segundo ciclos, valores de rendimento em torno de 96%. O rendimento foi de 77% para o terceiro ciclo e de aproximadamente 35% para os quarto e quinto ciclos. A partir desses resultados, conclui-se que essa enzima pode ser empregada em até cinco ciclos reacionais.

A metodologia empregada mostrou-se eficiente também para as reações de obtenção dos ésteres de ácido adípico e butírico com xilitol através da catálise enzimática em tempos reacionais reduzidos de 2 horas e 1 hora, respectivamente.

Os resultados das esterificações do ácido oleico com os poliálcoois xilitol e glicerol e seus derivados protegidos mostraram que, apesar da maior seletividade ser observada para as vias quimioenzimáticas, onde são empregadas etapas intermediárias de proteção, é possível também obter altas seletividades nas reações com os poliálcoois desprotegidos. A partir dos resultados encontrados, pode-se concluir que maiores concentrações de monoésteres são observadas nos primeiros 20 minutos de reação, alcançando, respectivamente, 60 e 80% de seletividade para as esterificações empregando o xilitol e o glicerol.

Os resultados dessa pesquisa foram, de maneira geral, promissores, principalmente tendo em vista o estado da arte no campo de aplicação da catálise enzimática em reatores de micro-ondas e banhos de ultrassom, atendendo, sempre que possível, as demandas da química verde.

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

ABDELKADER, M. B.; AZIZI, N.; CHEMLI, M.; CHEVALIER, Y.; BOYRON, O.; MAJDOUB, M.; *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*; v. 492, p.1-11; 2016

AÇIKEL, Ü.; ERSAN, M.; AÇIKEL, Y.; The Effects of the Composition of Growth Medium and Fermentation Conditions on the Production of Lipase by *R. delemar*; *Turkey Journal of Biology*; v.35, p. 35-44; 2011

ALBURQUEQUE, T. L.; SILVA JR., I. J., MACEDO, G. R.; ROCHA, M. V.; Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Wastes: A Review; *Process Biochemistry*; v.49, p.1779-1789; 2014

ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O.; Immobilised Lipases in the Cosmetics Industry; *Chemical Society Reviews*; v.42, p.6475-6490; 2013

ARCOS, J. A.; BERNABÉ, M.; OTERO, C.; Different Strategies for Selective Monoacylation of Hexoaldoses in Acetone; *Journal of Surfactants and Detergents*; v.1, n.3, p.345-352; 1998a

ARCOS, J. A.; BERNABÉ, M.; OTERO, C.; Quantitative Enzymatic Production of 6-*O*-Acylglucose Esters; *Biotechnology and Bioengineering*; v.57, n.5, p.505-509; 1998b

BART, J. C.; CAVALLARO, S.; Transiting from Adipic Acid to Bioadipic Acid. Part II. Biosynthetic Pathways; *Industrial & Engineering Chemistry Research*; v.54, p.567-576; 2015

BENKOVIC, S. J.; HAMMES-SCHIFFER, S.; A Perspective on Enzyme Catalysis; *Science*; v.301, p.1196-1202; 2003

BERMUDEZ, B.; LOPEZ, S.; ORTEGA, A.; VARELA, L. M.; PACHECO, Y. M.; ABIA, R.; MURIANA, F. J.; Oleic Acid in Olive Oil: From a Metabolic Framework Toward a Clinical Perspective; *Current Pharmaceutical Design*; v.17; p.831-843; 2011

BERNAL, C.; ESCOBAR, S.; WILSON, L.; ILLANES, A.; MESA, M.; Carbonaceous-Siliceous Composite Materials as Immobilization Support for Lipase from *Alcaligenes sp.*: Application to the Synthesis of Antioxidants; *Carbon*; v.74, p.96-103; 2014

BORYCKA-KICIAK, K.; BANASIEWICZ, T.; RYDZESKA, G.; Butyric Acid: A Well-Known Molecule Revisited; *Gastroenterology Review*, v.12, n.2, p.83-89; 2017

BRUICE, T. C.; A View at the Millennium: the Efficiency of Enzymatic Catalysis; *Accounts of Chemical Research*; v.35, n.3, p.193-148; 2002

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

CARRILLO, C.; CAVIA, M. M.; ALONSO-TORRE, S. R.; Antitumor effect of oleic acid; mechanism of action. A review; *Nutrición Hospitalaria*; v.27, n.5, p.1860-1865; 2012

CHEN, Y.; XIAO, L.; LIU, Y.; LI, X.; ZHANG J.; SHU, Y.; A Lipase-Based Electrochemical Biosensor for Target DNA; *Microchim Acta*; v.181, p.615-621; 2014

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O.; *Aspergillus sp.* Lipase: Potential Biocatalyst for Industrial Use; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; v.67, p.163-171; 2010

CUNICO, L.; Modelagem de Equilíbrio Líquido-Líquido, Líquido-Vapor e Líquido-Líquido-Vapor para Sistemas Binários, Ternários, Quaternários e Pseudo-Quaternários, Envolvendo a Produção de Biodiesel; *Universidade Estadual de Campinas*; Dissertação; 2012

DENG, Y.; MA, L.; MAO, Y.; Biological Production of Adipic Acid From Renewable Substrates: Current and Future Methods; *Biochemical Engineering Journal*; v.105, p.16-26; 2016

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F.; From Plant Biomass to Bio-based Chemicals: Latest Developments in Xylan Research; *Biotechnology Advances*; v.30, p.1627-1640; 2012

DHALIWAL, S. S.; OBEROI, H. S.; SANDHU S.; NANDA, D.; KUMAR, D.; UPPAL, S. K.; Enhanced Ethanol Production from Sugar Cane Juice by galactose Adaptation of a Newly Isolated Thermotolerant Strain of *Pichia kudravzevii*; *Bioresource Technology*; v.102, p.5968-5975; 2011

EREN Z.; Ultrasound as a Basic and Auxiliary Process for Dye Remediation: A Review; *Journal of Environmental Management*; v.104, p.127-141; 2012

FAN, H.; ZHAO, Y.; SONG, F. C.; Acute Pancreatitis Associated With Hemorrhagic Fever With Renal Syndrome: Clinical Analysis of 12 Cases; *Renal Failure*; v.35, i.10, p.1330-1333; 2013

FIGUEREDO, A. L.; Determinação e Modelagem de Dados de Equilíbrio Líquido-Vapor para o Sistema Ácido Oleico e Etanol; *Universidade Federal do Rio Grande do Norte*; Trabalho de Conclusão de Curso; 2013

FU, B.; VASUDEVAN, P. T.; Effect Of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel; *Energy & Fuels*; v.23, n.8, p.4105-4111; 2009

FURUKAWA, S.; AKIYOSHI, Y.; O'TOOLE, G. A.; OGIHARA, H.; MORINAGA, Y.; Sugar Fatty Acid Esters Inhibit Biofilm Formation by Food-Borne Pathogenic Bacteria; *Internacional Journal of Food Microbiology*; v.138, p.176-180; 2010

GHAMGUI, H.; MILED, N.; REBAI, A.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y.; Production of Mono-olein by Immobilized *Staphylococcus simulans* Lipase in a Solvent-free System: Optimization by Response Surface Methodology; *Enzyme and Microbial Technology*; v.39, p.717-723; 2006

GIUNTA, D.; SECHI, B.; SOLINAS, M.; Novozym-435 as Efficient Catalyst for the Synthesis of Benzoic and (Hetero)aromatic Carboxylic Acid Esters; *Tetrahedron*; v.71, p.2692-2697; 2015

GREMBECKA, M.; Sugar Alcohols – Their Role in the Modern World of Sweeteners: A Review; *European Food Research Technology*; v.241, p.1-14; 2015

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S.; HEIDELBERG, T.; CHISTI, Y.; Lipase Mediated Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters; *Process Biochemistry*; v.46, p.2079-2090; 2011

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y.; Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology; *Progress in Lipid Research*; v.57, p.40-54; 2015

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J.; Fundamentos de Física, vol. 2: Gravitação, Ondas e Termodinâmica; tradução Ronaldo Sérgio de Biasi; LTC; Rio de Janeiro; 2012a

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J.; Fundamentos de Física, vol. 4: Ótica e Física Moderna; tradução Ronaldo Sérgio de Biasi; LTC; Rio de Janeiro; 2012b

HASANBEIGI, A.; PRICE, L.; A Technical Review of Emerging Technologies for Energy and Water Efficiency and Pollution Reduction in the Textile Industry; *Journal of Cleaner Production*; v.95, p.30-44; 2015

HAYES, B. L.; Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light; U.S.A.: CEM Publishing, 2002

HERMES, E.; da ROCHA, D. C.; ORSSATTO, F.; LUCAS, J. F.; GOMES, S. D.; SENE, L.; Isolation of Microorganisms of Cheese Whey with Lipolytic Activity for Removal of COD; *Engenharia Agrícola de Jaboticabal*, v.33, n.2, p.379-387; 2013

IBARGUREN, M.; LÓPEZ, D.; ESCRIBÁ, P. V.; The Effect of Natural and Synthetic Fatty Acids on Membrane Structure, Microdomain Organization, Cellular Functions and Human Health; *Biochimica et Biophysica Acta*; v.1838, p.1518-1528; 2014

IFA, Institution For Occupation Safety And Health Of The German Society Accidental Insurance; *GESTIS Substance Database: CAS 107-92-6*; Acesso em 02/08/2017

JENA, S. D.; POGGI, M; Haverst Planning in the Brazilian Sugar Cane Industry via Mized Integer Programming; *European Journal of Operational Research*; v.230, p.374-384; 2013

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D., MURPHREE, S. S.; Practical Microwave Synthesis for Organic Chemistry: Strategies, Instruments and Protocols; Germany: WILEY-VCH, 2009

KARN, S.; KUMAR, P.; PAN, X.; Extraction of Lipase and Protease and Characterization of Activated Sludge from Pulp and Paper Industry; *Preparative Biochemistry & Biotechnology*; v.43, p.152-162; 2013



KAUSHIK, R.; PARSHETTI, G. K.; LIU, Z.; BALASUBRAMANIAN, R.; Enzyme-Assisted Hydrothermal Treatment of Food Waste for Co-Production of Hydrochar and Bio-Oil; *Bioresource Technology*; v.168, p.267-274; 2014

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K.; Enzyme Catalyzed Synthesis of Cosmetic Esters and its Intensification: A Review; *Process Biochemistry*; v.50, p.1793-1806; 2015

KIM, S. J.; LEE, H. K.; DO, J. S.; HONG, Y. S.; YOO, I. S.; YOO, H. H.; Enzymatic Sugar Ester Production; *Asia and the Pacific Ocean Chemical Engineering Conference*; v.2004, p.797-803; 2004

KREMSTER, J. M.; STADLER, A.; A Chemist's Guide to Microwave Synthesis: Basics, Equipment & Application Examples; Austria: Anton Paar, 2013

LEDER, A.; LEDER, P.; Butyric Acid, A Potent Inducer Of Erythroid Differentiation In Cultured Erythroleukemic Cells; *Cell*; v.5, p.319-322; 1975

LEE, Y. Y.; TANG, T. K.; LAI, O. M.; Health Benefits, Enzymatic Production, and Application of Medium- and Long-Chain Triacylglycerol (MLCT) in Food Industries: A Review; *Journal of Food Science*; v.77, i.8, p. 137-144; 2012

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; Lehninger Princípios de Bioquímica, 3 ed.; tradução Arnaldo Antônio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi, São Paulo: W.H. Freeman and Company, 2002

LERIN, L. A.; LOSS, R. A.; REMONATTO, D.; ZENEVIEZ, M. C.; BALEN, M.; NETTO, V. O.; NINOW, J. L.; TRENTIN, C. M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems; *Bioprocess Biosystem Engineering*; v.37, p.2381-2394; 2014

LIN, L. H.; LAI, Y. C.; CHEN, K. M.; CHANG, H. M.; Oxyethylene Chain Length Affects the Physicochemical Properties of Sugar-based Anionic Surfactants with Phosphates Groups; *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*; v.485, p.18-124; 2015

LONG, J. A.; RANKIN, B. M.; BEN-AMOTZ, D.; Micelle Structure and Hydrophobic Hydration; *Journal of the American Chemical Society*; v.137, p.10809-10815; 2015

MACROM QUÍMICA LTDA; *Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico: Glicerina Bidestilada*; 2015

MAKINEN, K. K.; Gastrointestinal Disturbances Associated with the Consumption of Sugar Alcohols with Special Consideration of Xylitol: Scientific Review and Instructions for Dentists and Other Health-Care Professionals; *International Journal of Dentistry*; article ID 5967907, 16 pages, 2016

MARTIN, A.; RICHTER, M.; Oligomerization Of Glycerol: A Critical Review; *European Journal Lipideos Technology*, v.113, p.100-117; 2011

MAVANDADI, F.; PILOTTI, A.; The Impact of Microwave-Assisted Organic Synthesis in Drug Discovery; *Drug Discovery Today*; v.11, n.3/4, p.165-174; 2006

MIYAZAWA, T.; YAMAMOTO, M.; Chemoselective acylation of (Hydroxyalkyl)phenols Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B; *Biotechnological Letters*; v.35, p.625-630; 2013

MOUNGUENGUI, R. W.; BRUNSCHWIG, C.; BARÉA, B.; VILLENEUVE, P.; BLIN, J.; Are Plant Lipases a Promising Alternative to Catalyze Transesterification for Biodiesel Production?; *Progress in Energy and Combustion Science*; v.39, p.441-456; 2013

NAKAYAMA, S.; KIMURA, Y. MIKI, S.; OSHITANI, J.; KOBAYASHI, T.; ADACHI, S.; MATSUURA, T.; IMANAKA, H.; ISHIDA, N.; TADA, H.; NAKANISHI, K.; IMANURA, K.; Influence of Sugar Surfactant Structure on the Encapsulation of Oil Droplets in an Amorphous Sugar Matrix During Freeze-drying; *Food Research International*; v.70, p.143-149; 2015

OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F.; Obtaining Lipases from Byproducts of Orange Juice Processing; *Food Chemistry*; v.163, p.103-107; 2014

OLAJIRE, A. A.; Review of ASP EOR (Alkaline Surfactant Polymer Enhanced Oil Recovery) Technology in the Petroleum Industry: Prospects and Challenges; *Energy*; v.77, p.963-982; 2014

OTERO, C.; ARCOS, J. A.; BERRENDERO, M. A.; TORRES, C.; Emulsifiers from Solid and Liquid Polyols: Different Strategies for Obtaining Optimum Conversions and Selectivities; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; v.11, p.883-892; 2001

PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C.; CASTRO, H. F.; Estudo da Influência do Solvente, Carboidrato e Ácido Graxo na Síntese Enzimática de Ésteres de Açúcares; *Química Nova*; v.28, n.5, p.792-796; 2005

POLEN, T.; SPELBERG, M.; BOTT, M.; Toward Biotechnological Production of Adipic Acid and Precursors from Biorenewables; *Journal of Biotechnology*; v.167, p.75-44; 2013

PRASAD, K. N.; Butyric Acid: A Small Fatty Acid With Diverse Biological Functions; *Life Sciences*, v. 27, n.15 , p.1351-1358; 1980

PRIVÉ, F.; NEWBOLD, C. J.; KADERBHAI, N. N.; GIRDWOOD, S. G.; GOLYSHINA, O. V.; GOLYSHIN, P. N.; SCOLLAN, N. D.; HUWS, S. A.; Isolation and Characterization of Novel Lipases/Esterases from a Bovine Rumen Metagenome; *Applied Microbiological Biotechnology*; v.99, p.5475-5485; 2015

PURI, S.; KAUR, B.; PARMAR, A.; KUMAR, H.; Applications of Ultrasound in Organic Synthesis – A Green Approach; *Current Organic Chemistry*; v.17, p.1790-1828; 2013

QUENEAU, Y.; CHAMBERT, S.; BESSEL, C.; CHEAIB, R.; Recent Progress in the Synthesis of Carbohydrate-based Amphiphilic Materials: the Examples of Sucrose and Isomaltulose; *Carbohydrate Research*; v.343, p.1999-2009; 2008

RATHI, A. K.; GAWANDE, M. B.; ZBORIL, R.; VARMA, R. S.; Microwave-Assisted Synthesis – Catalytic Applications in Aqueous Media; *Coordination Chemistry Reviews*; v.291, p.68-94; 2015

REDDY, K. G.; MADHAVI, G.; SWAMY, B. E.; Mobilized Lipase Enzymatic Biosensor for the Determination of Chlorfenvinphos and Malathion in Contaminated Water Samples: A Voltammetric Study; *Journal of Molecular Liquids*; v.198, p.181-186; 2014

RICHARDS, W. T.; LOOMIS, A. L.; The Chemical Effects of High Frequency Sound Waves II. A Study of Emulsifying Action; *High Frequency Sound Waves*; v.51, p.1724-1729, 1929

RIESZ, P.; KONDO, T.; Free Radical Formation Induced by Ultrasound and its Biological Implications; *Free Radical Biology & Medicine*; v.13, p.247-270; 1992;

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; Lipase from *Rhizomucor miehei* as an Industrial Biocatalyst in Chemical Process; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; v.64, p.1-22; 2010

RUFINO, A. R.; BIAGGIO, F. C.; SANTOS, J. C.; de CASTRO, H. F.; Chemoenzymatic synthesis: a strategy to obtain xylitol monoesters; *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*; v.84, p.957-960; 2009

RUFINO, A. R.; BIAGGIO, F. C.; SANTOS, J. C.; de CASTRO, H. F.; Screening of lipases for the synthesis of xylitol monoesters by chemoenzymatic esterification and the potential of microwave and ultrasound irradiations to enhance the reaction rate; *International Journal of Biological Macromolecules*; v.47, p.5-9; 2010

SARAN, S.; MAHAJAN, R. V.; KAUSHIK, R.; ISAR, J.; SAXENA, R.; K.; Enzyme Mediated Beam House Operations of Leather Industry: a Needed Step Towards Greener Technology; *Journal of Cleaner Production*; v.54, p.315-322; 2013

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; SYDNEY, E. B.; BIHAN, Y. L.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. R.; Microbial Hydrogen Production By Bioconversion Of Crude Glycerol: A Review; *International Journal Of Hydrogen Energy*, v.37, p.6473-6490; 2012

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K.; Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review; *Biotechnology*; v.10, p.23-40; 2011

SIGMA-ALDRICH; Product Specification, CAS number: 87-99-0; E.U.A.; 2016

SINGH A. K.; MUKHOPADHYAY, M.; Overview of Fungal Lipase: A Review; *Applied Biochemical Biotechnology*; v.166, p.486-520; 2012

SOLOMONS, T. W.; FRYHLE, C. B.; Organic Chemistry; 10 ed; Danvers: John Wiley & Sons; 2011

STAMATIS, H.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; KOLISIS, F. N.; Studies on the Synthesis of Short-chain Geranyl Esters Catalysed by *Fusarium oxysporum* Esterase in Organic Solvents; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; v.4, p.229-236; 1998

STREM CHEMICALS INC., Technical Notes, Catalog #06-3123, acesso em 21/08/2017

SUBHEDAR P. B.; GOGATE, P. R.; Intensification of Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose Using Ultrasound for Efficient Bioethanol Production: A Review; *Industrial & Engineering Chemistry Research*; v.52, p.11816-11828; 2013

SURIYAPRAPADILOK, N.; KITIYANAN, B.; Synthesis of Soketal from Glycerol and Its Reaction with Benzyl Alcohol; *Energy Procedia*; v.9, p.63-69; 2011

SZÜTS, A.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P.; Sucrose Esters as Natural Surfactants in Drug Delivery Systems – A Mini-review; *International Journal of Pharmaceutics*; v.433, p.1-9; 2012

TREICHEL H.; de OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; di LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; A Review on Microbial Lipases Production; *Food Bioprocess Technology*; v.3, p.182-196; 2010

VERMA, N.; THAKUR, S.; BHATT, A. K.; Microbial Lipases: Industrial Applications And Properties (A Review); *Internacional Research Journal of Biological Sciences*; v.1, i.2, p.88-92; 2012

VOLHARDT, K.; PETER C.; SCHORE, N.; Química Orgânica: estrutura e função, 4ed.; tradução Ricardo Bicca de Alencastro; Porto Alegre: Bookman, 2004

WANG, H. K.; SHAO, J.; WEI, Y. J.; ZHANG, J. QI, W.; A Novel Low-Temperature Alkaline Lipase from *Acinetobacter johnsonii* LP28 Suitable for Detergent Formulation; *Food Technological Biotechnology*, v.49, i.1, p.96-102; 2011

WANG, X.; JIN, Q.; WANG, T.; HUANG, J.; WANG, X.; An Improved Method For The Synthesis Of 1-Monoolein; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; v.97, p.130-136; 2013

WHATEY, B.; TIERNEY, J.; LIDSTRÖM, P.; WESTMAN, J.; The Impact of Microwave-Assisted Organic Chemistry on Drug Discovery; *Drug Discovery Today*; v.7, n.6, p.373-380; 2002

XU, F.; ZHONG, J.; QUIAN, X.; LI, Y.; LIN, X.; WU, Q.; Multifunctional poly(amine-ester)-type Hyperbranched Polymers: Lipase-Catalyzed Green Synthesis, Characterization, Biocompatibility, Drug Loading and Anticancer Activity; *Polymer Chemistry*; v.4, p. 3480-3490; 2013

ZHANG, X.; NIE, K.; ZHENG, Y.; WANG, F.; DENG, L.; TAN, T.; Enzymatic Production and Functional Characterization of D-Sorbitol Monoesters with Various Fatty Acids; *Catalysis Communications*; v.72, p.138-141; 2015

## APÊNDICE I

As reações de esterificação do ácido oleico com xilitol protegido em banho de ultrassom foram acompanhadas por titulação potenciométrica, a fim de otimizar a precisão dos resultados, comparativamente com a titrimetria empregando indicador fenolftaleína. Os gráficos nesse apêndice foram gerados com os resultados de pH medidos em um potenciômetro MS-Tecnopon MS-150 empregando eletrodo de platina. A metodologia empregada nas sínteses encontra-se descrita no capítulo 3 – METODOLOGIA – desta dissertação.

Figura 1.1 - Curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol protegido em banho de ultrassom em 0,5 hora (em duplicata)

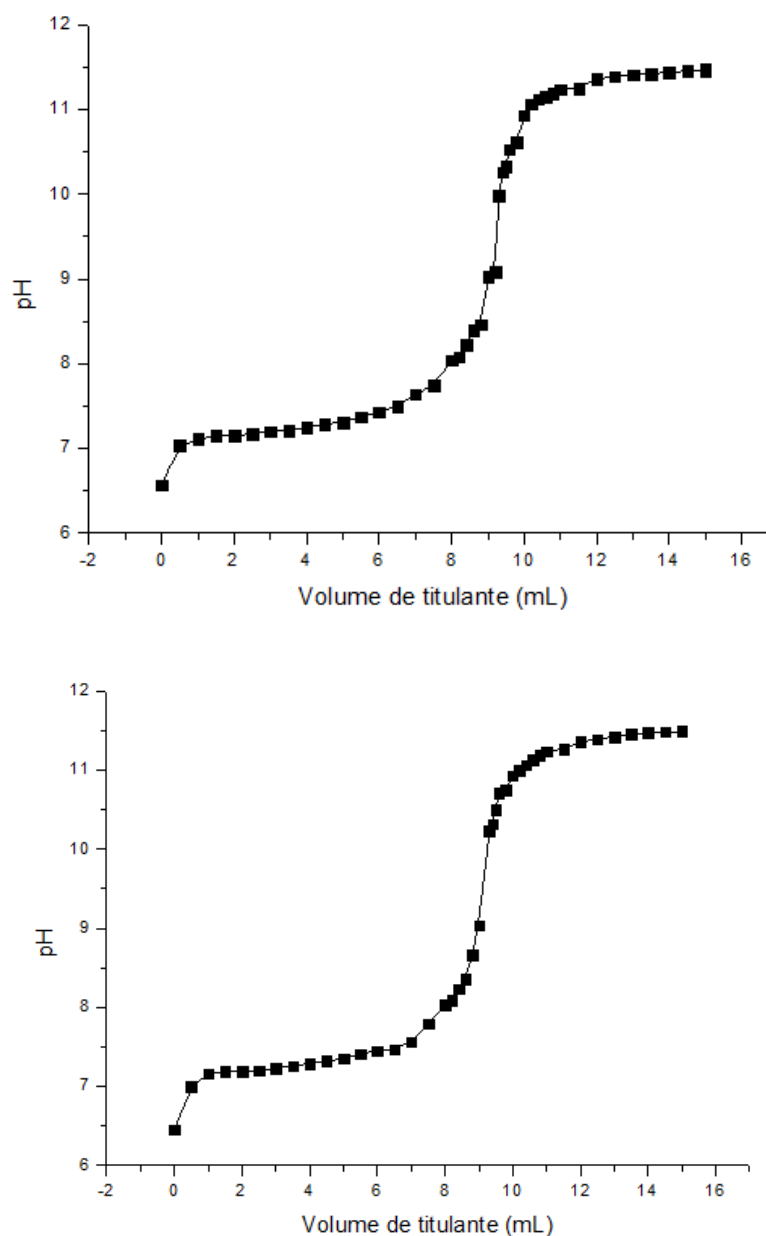


Figura 1.2 - Derivadas das curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol protegido em banho de ultrassom em 0,5 hora (em duplicata)

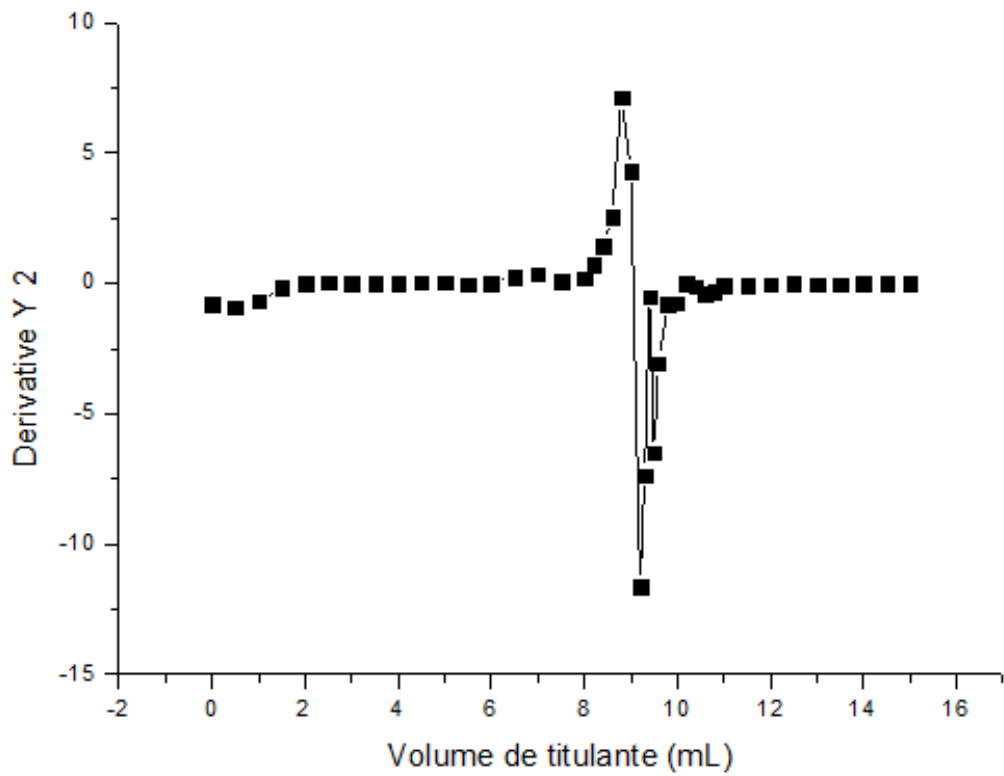
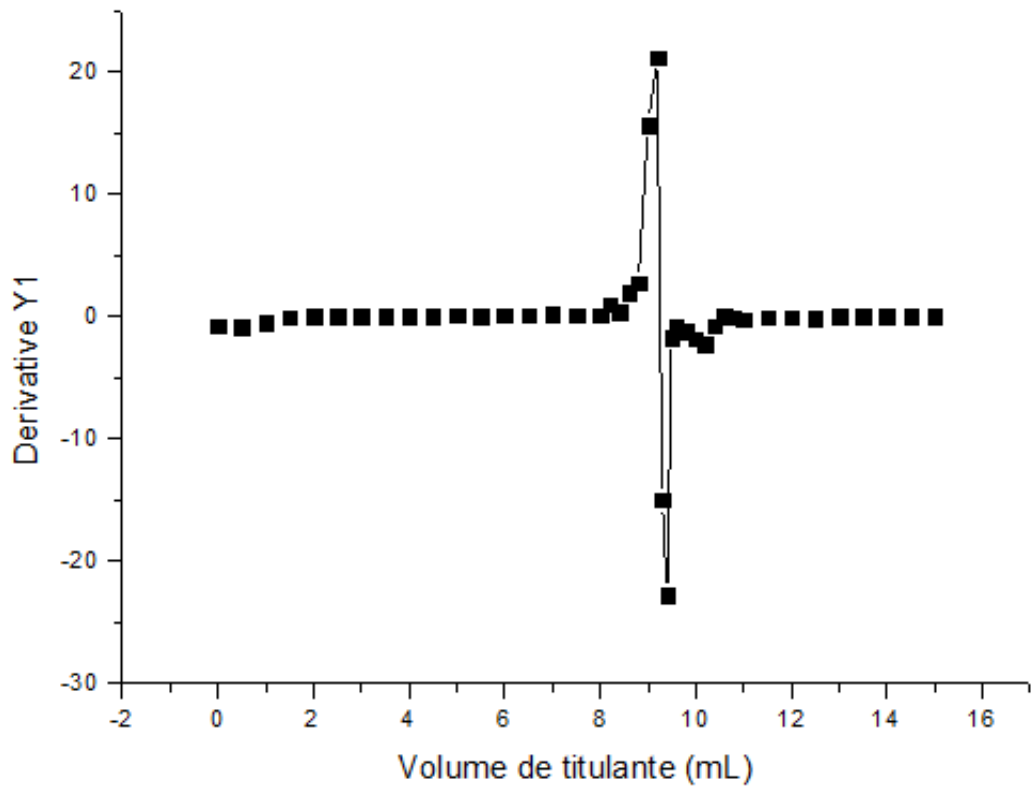


Figura 1.3 - Curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol protegido em banho de ultrassom em 1,0 hora (em duplicata)

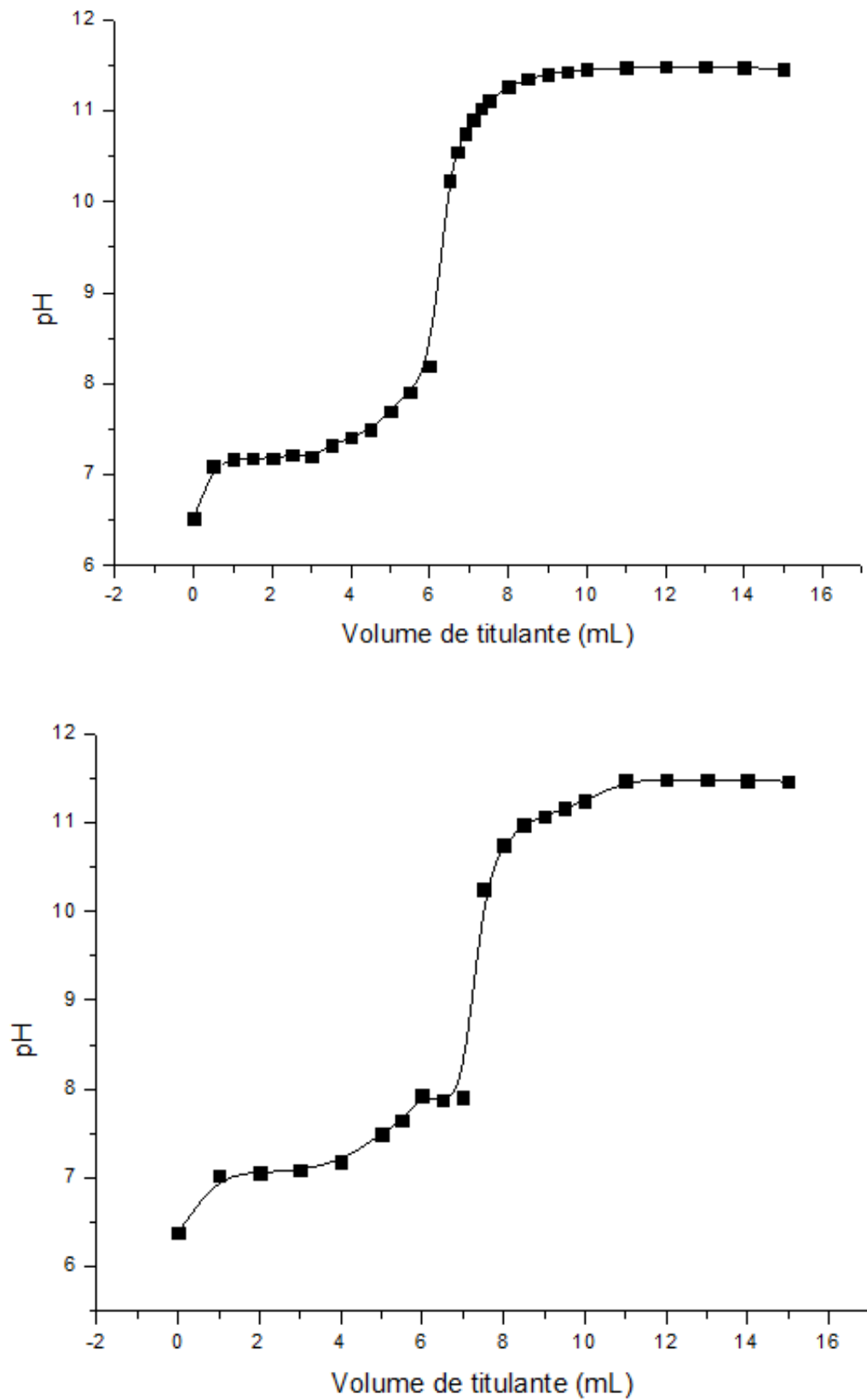


Figura 1.4 - Derivadas das curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol protegido em banho de ultrassom em 1,0 hora (em duplicata)

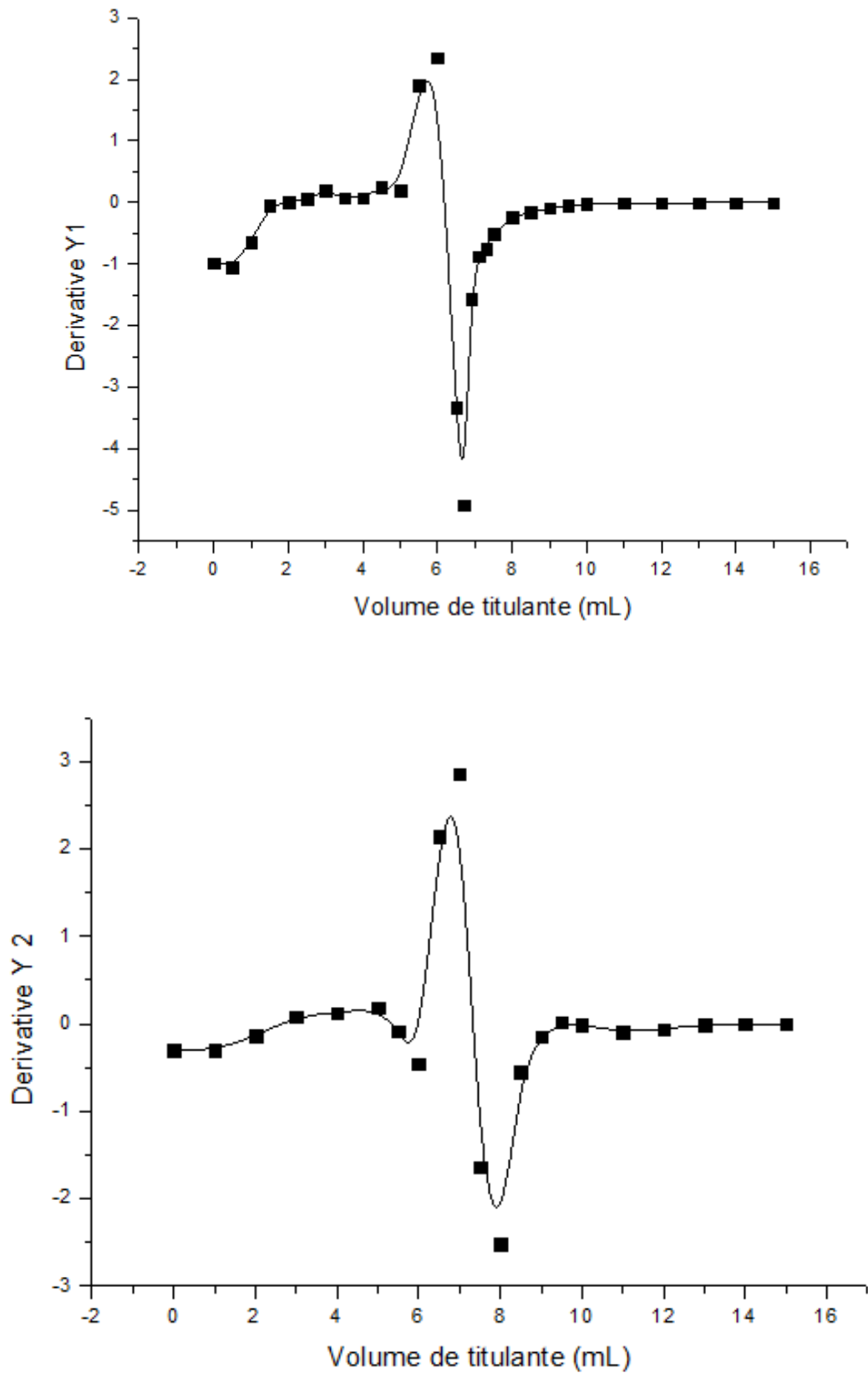




Figura 1.5 - Curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol protegido em banho de ultrassom em 1,5 horas (em duplicata)

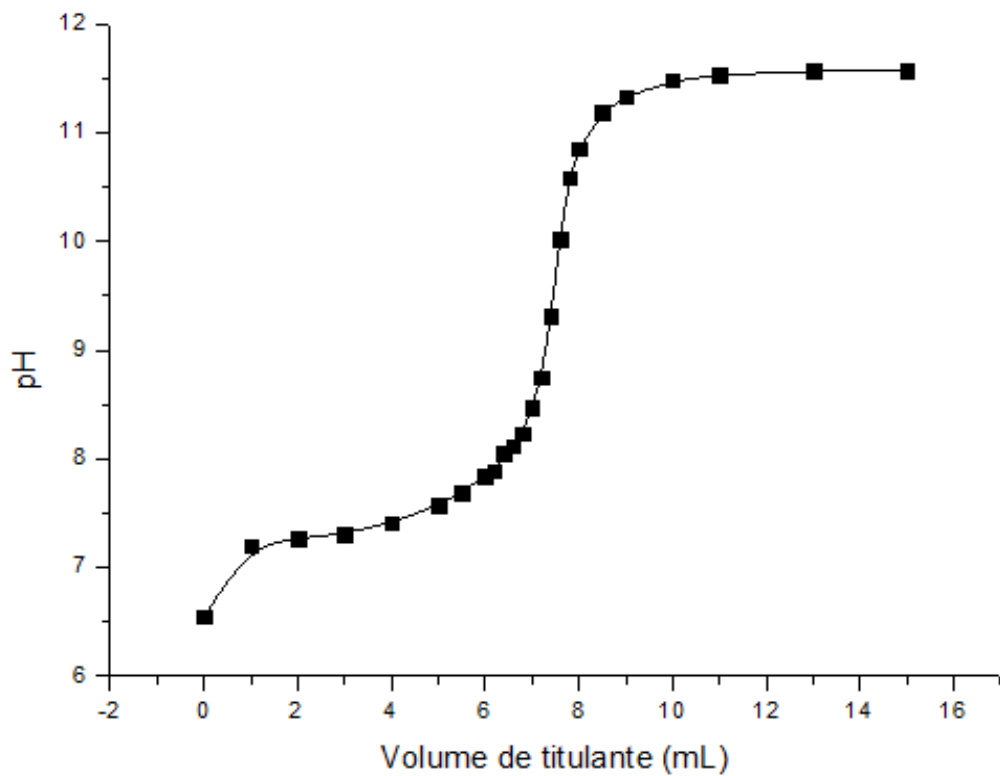
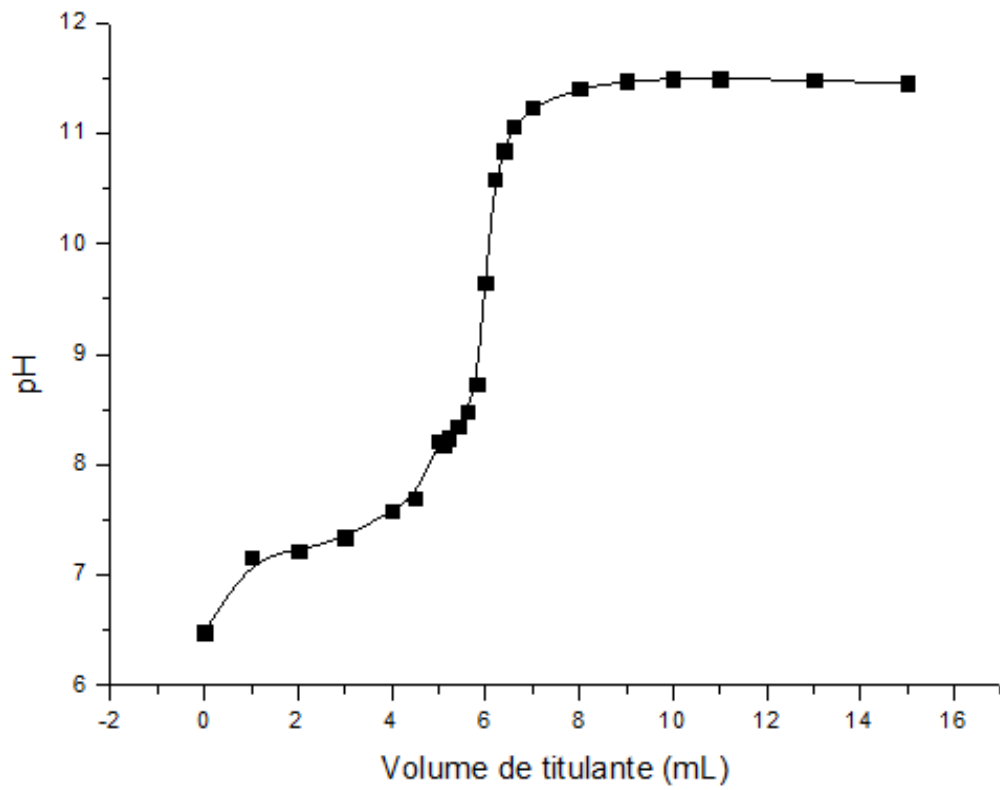


Figura 1.6 - Derivadas das curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol protegido em banho de ultrassom em 1,5 horas em duplicata)

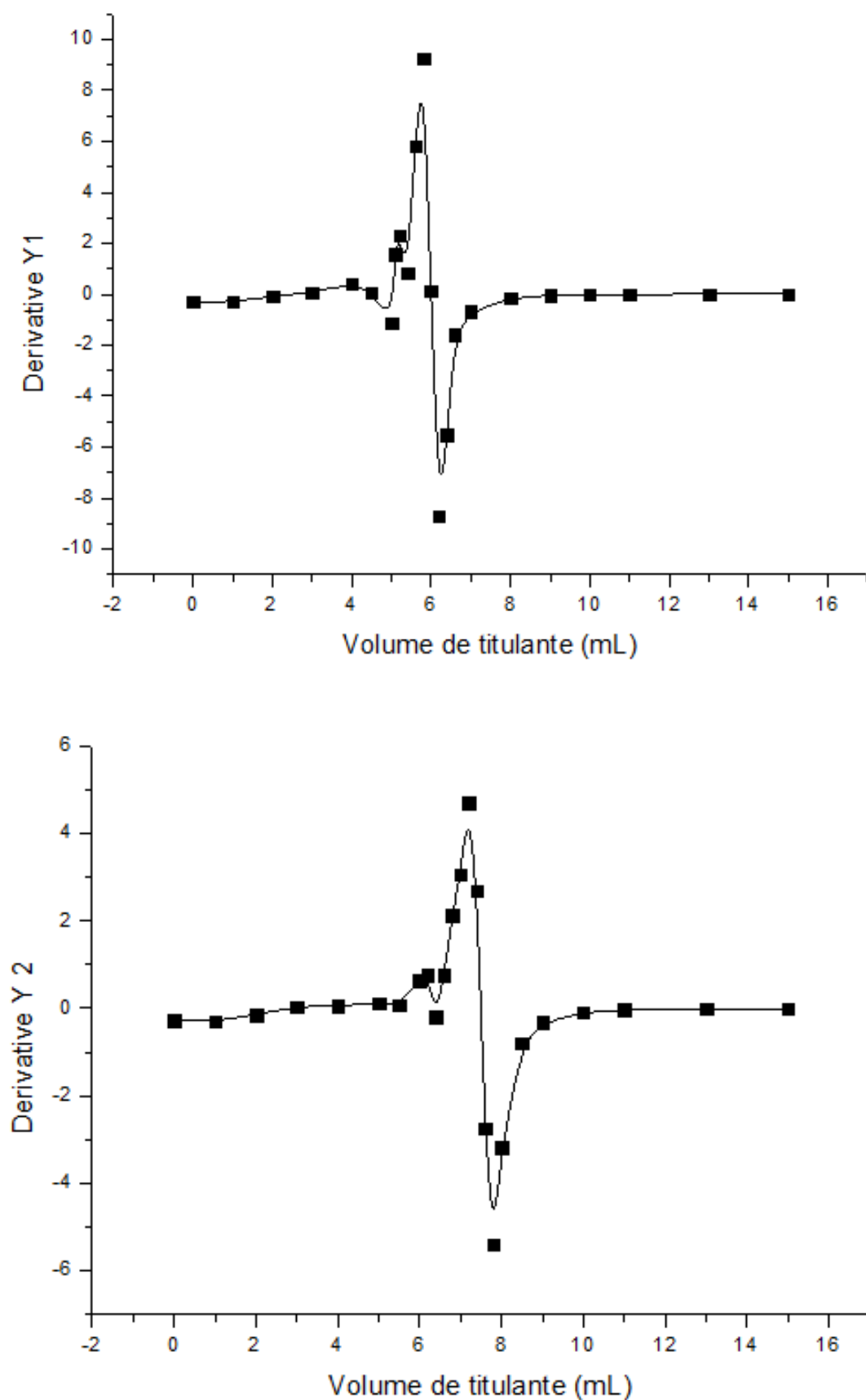


Figura 1.7 - Curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol protegido em banho de ultrassom em 2,0 horas (em duplicata)

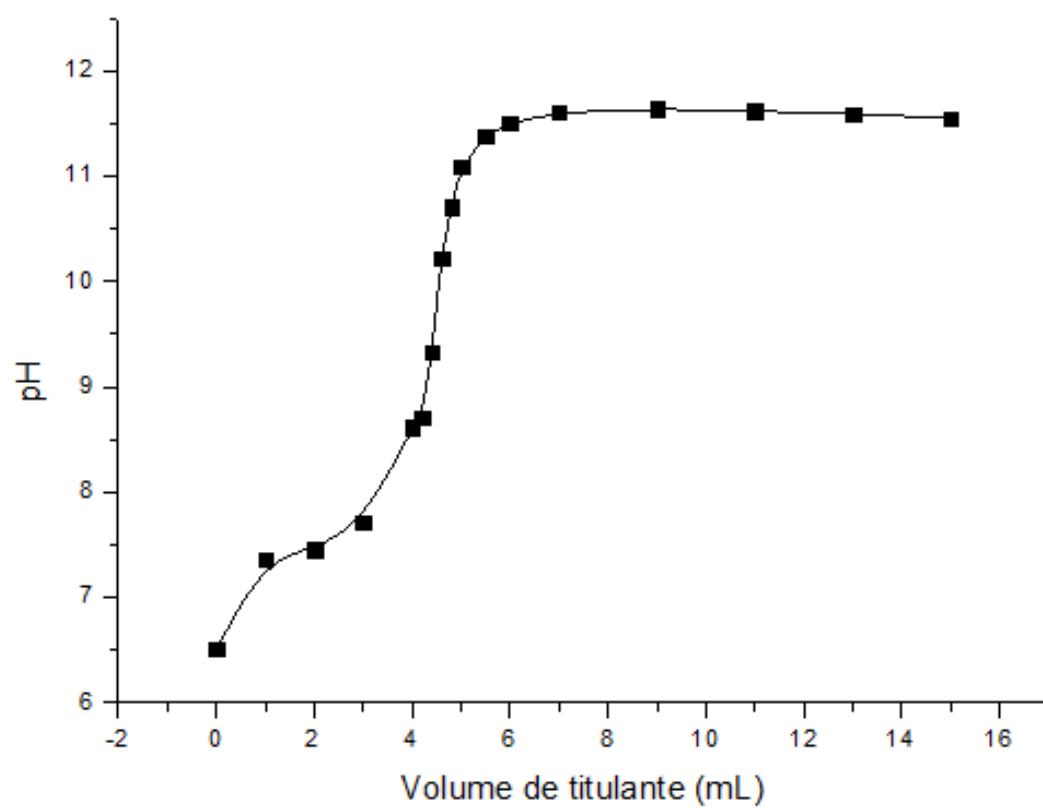
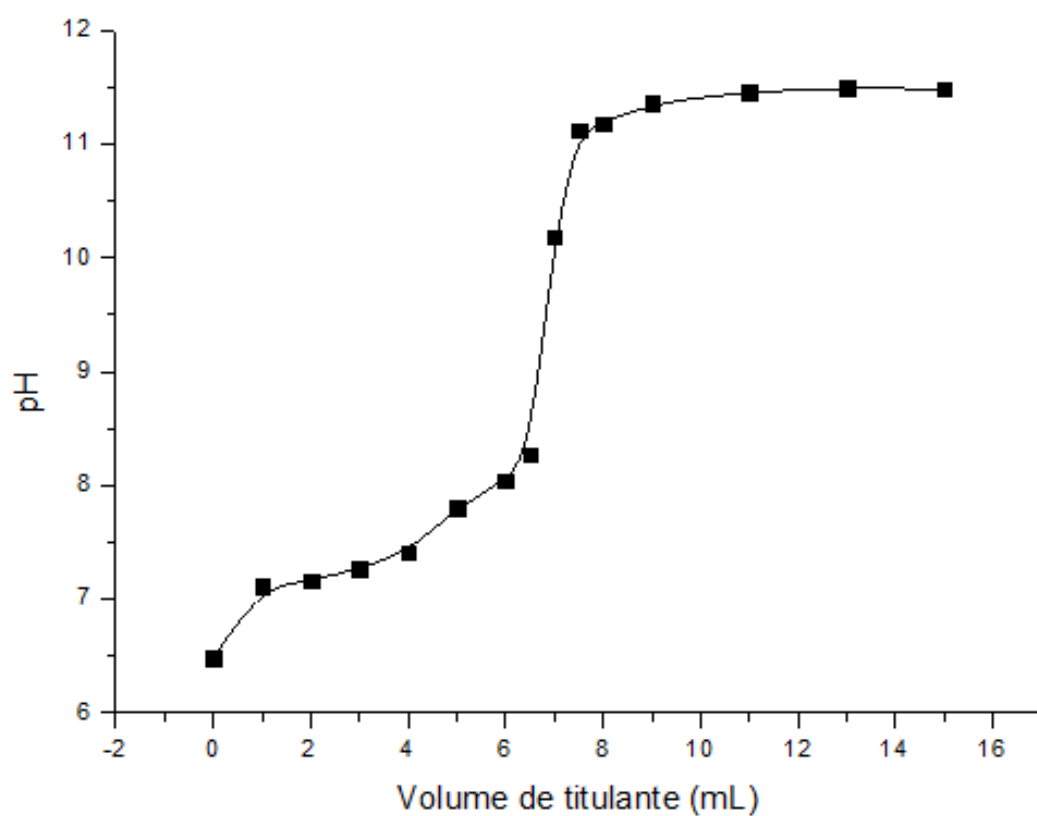


Figura 1.8 - Derivadas das curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol protegido em banho de ultrassom em 2,0 horas (em duplicata)

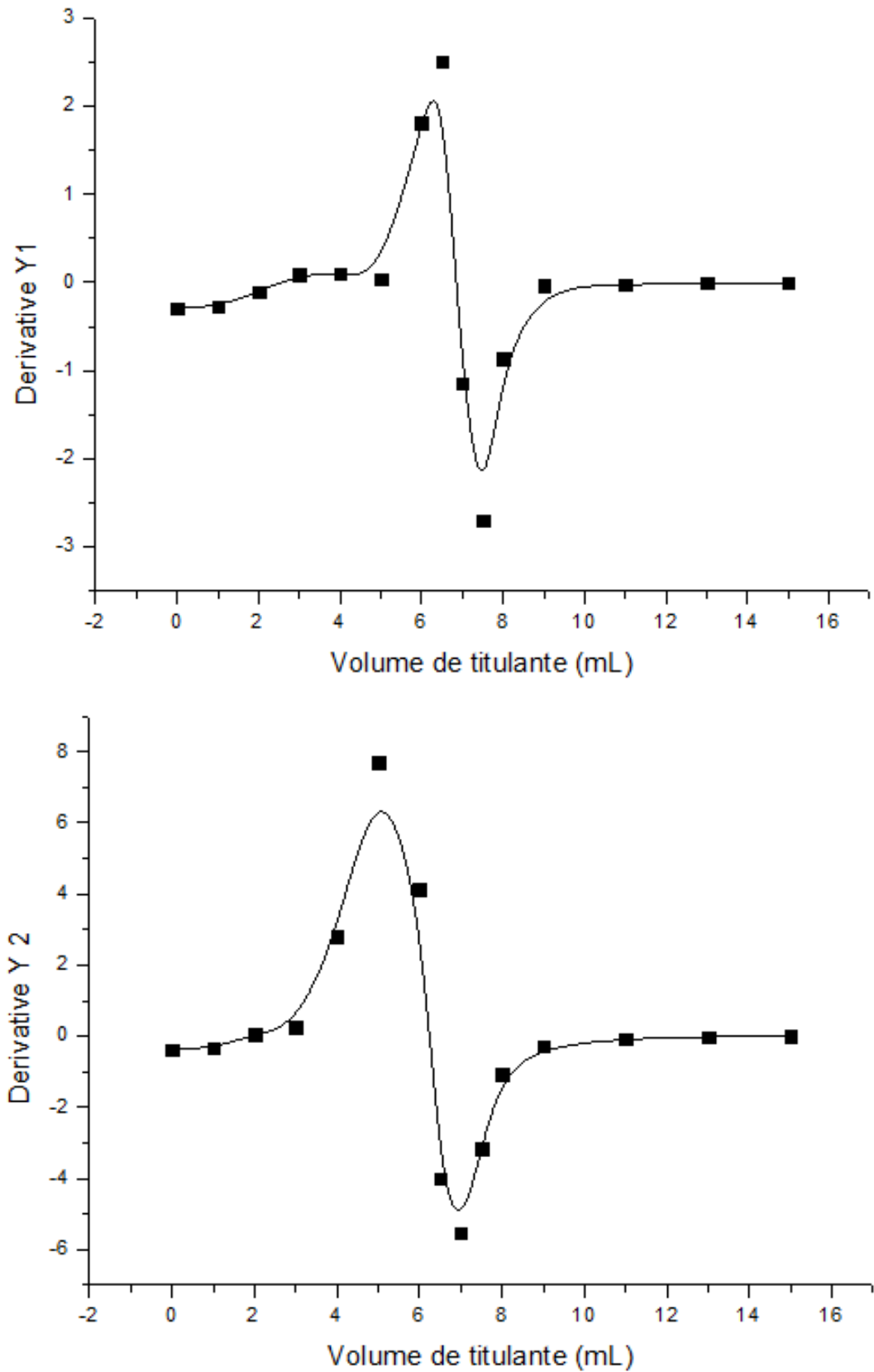


Figura 1.9 - Curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol protegido em banho de ultrassom em 2,5 horas (em duplicata)

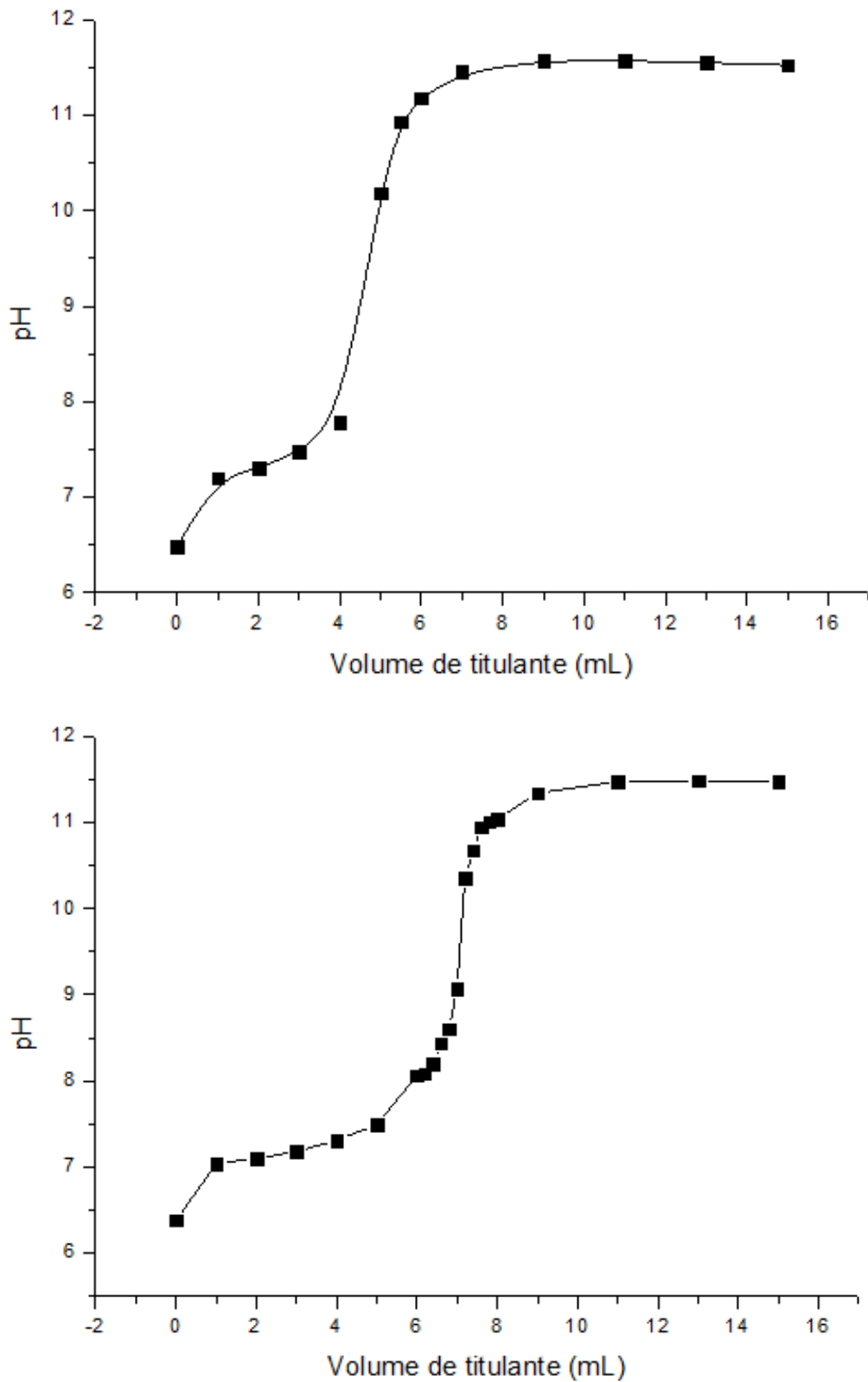
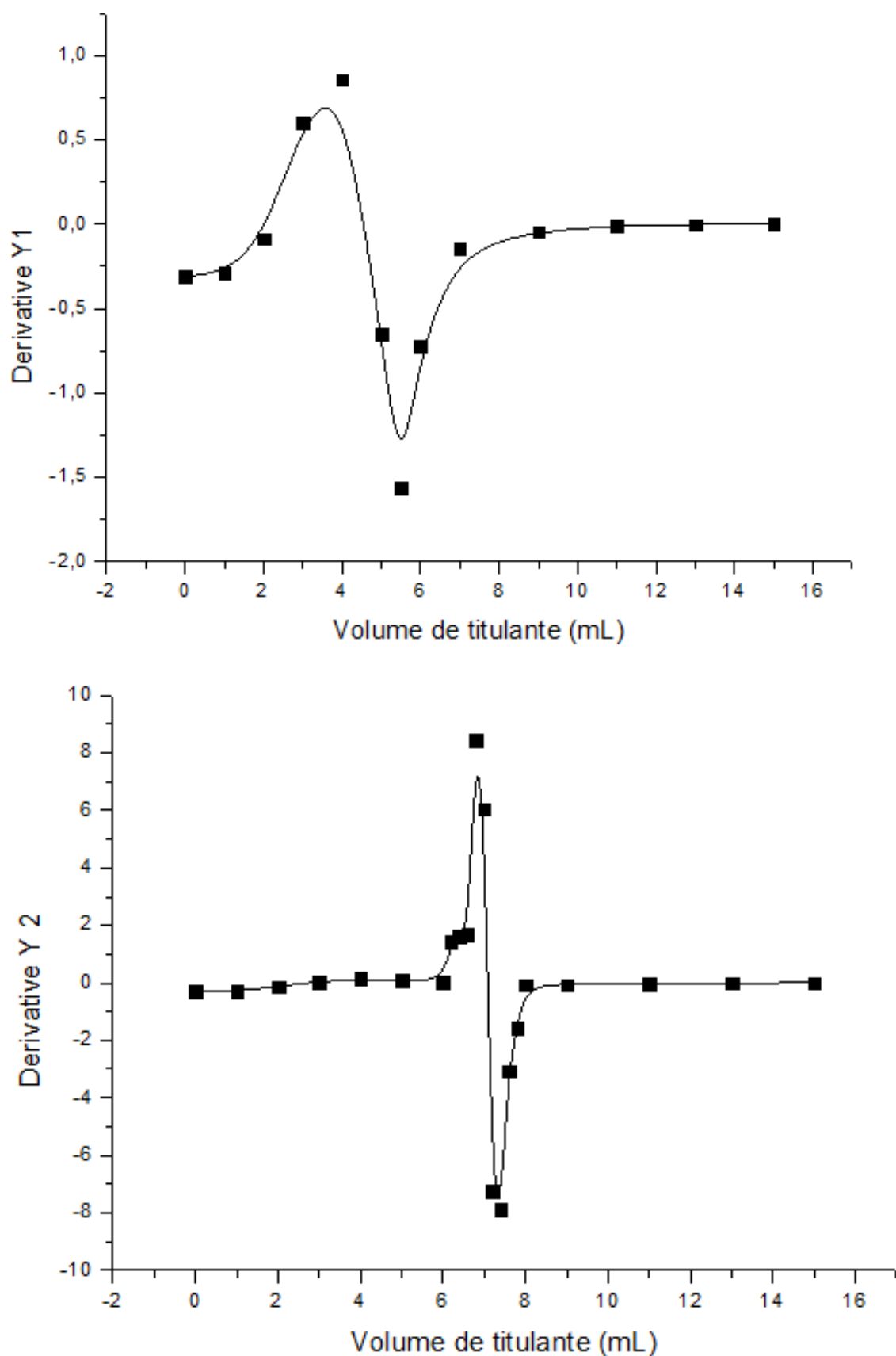


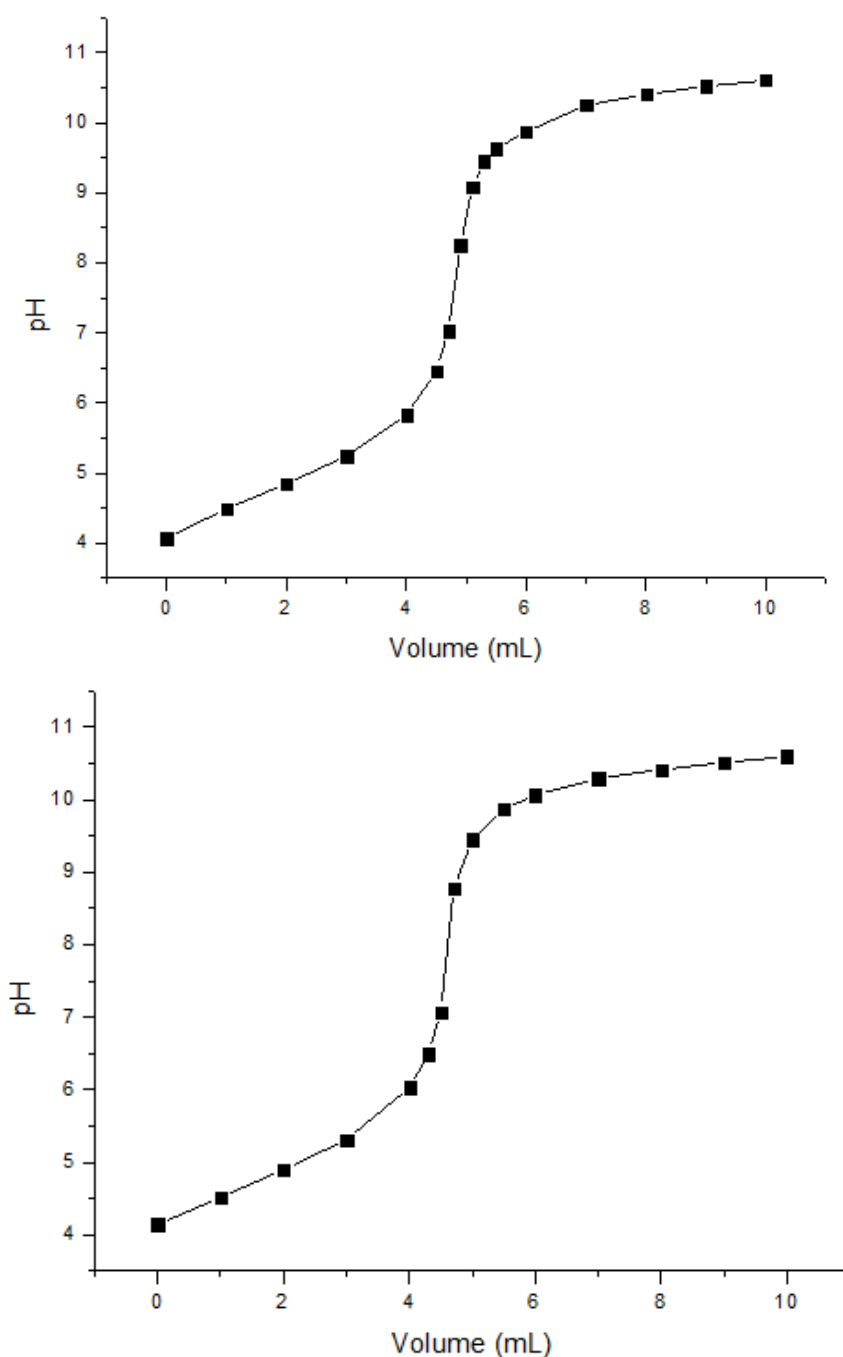
Figura 1.10 - Derivadas das curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol protegido em banho de ultrassom em 2,5 horas (em duplicata)



## APÊNDICE II

As reações de esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom foram acompanhadas por titulação potenciométrica. Os gráficos nesse apêndice foram gerados com os resultados de pH medidos em um potenciômetro MS-Tecnopon MS-150 empregando eletrodo de platina. A metodologia empregada nas sínteses encontra-se descrita no capítulo 3 – METODOLOGIA – desta dissertação.

Figura 2.1 - Curvas de titulação da esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom em 0,25 h (em triplicata)



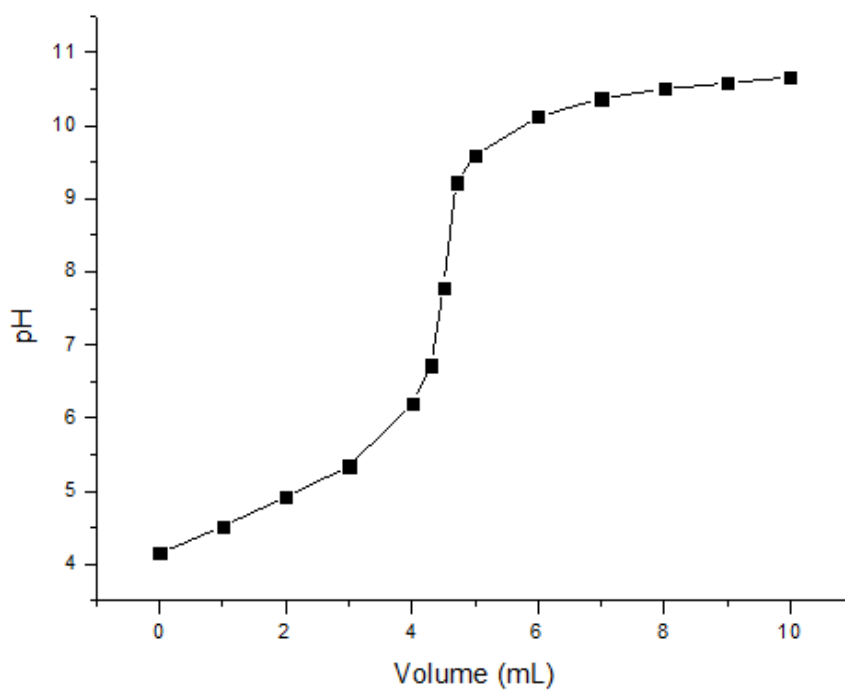
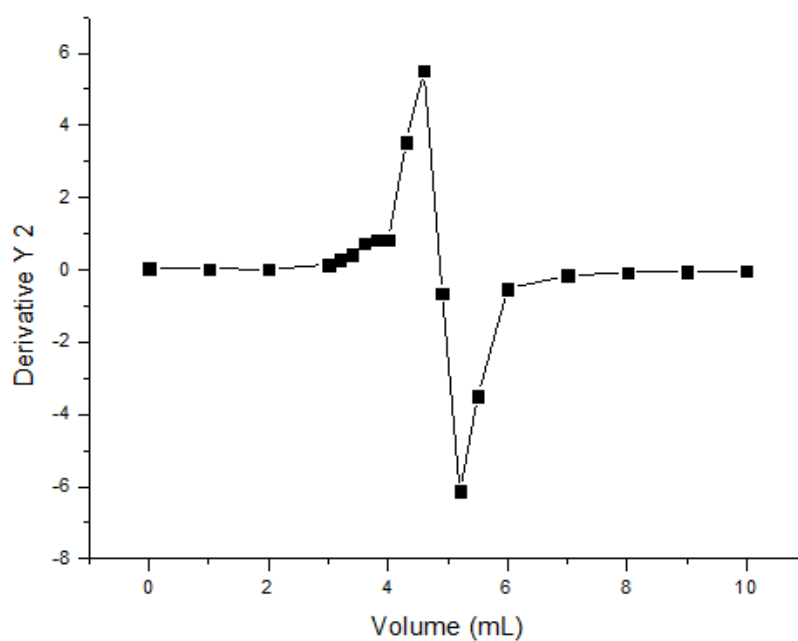


Figura 2.2 - Derivadas segundas das curvas de titulação da esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom em 0,25 h (em triplicata)





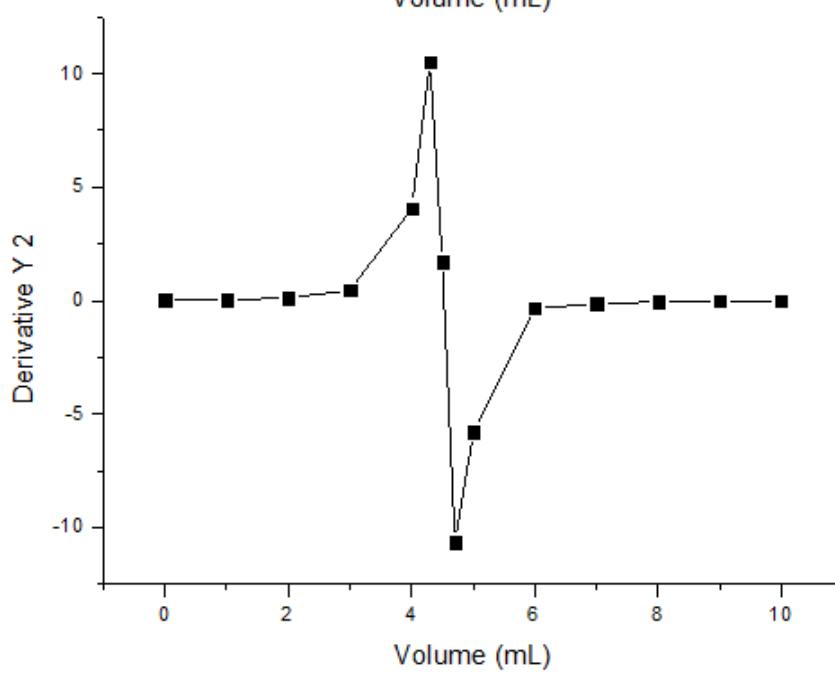
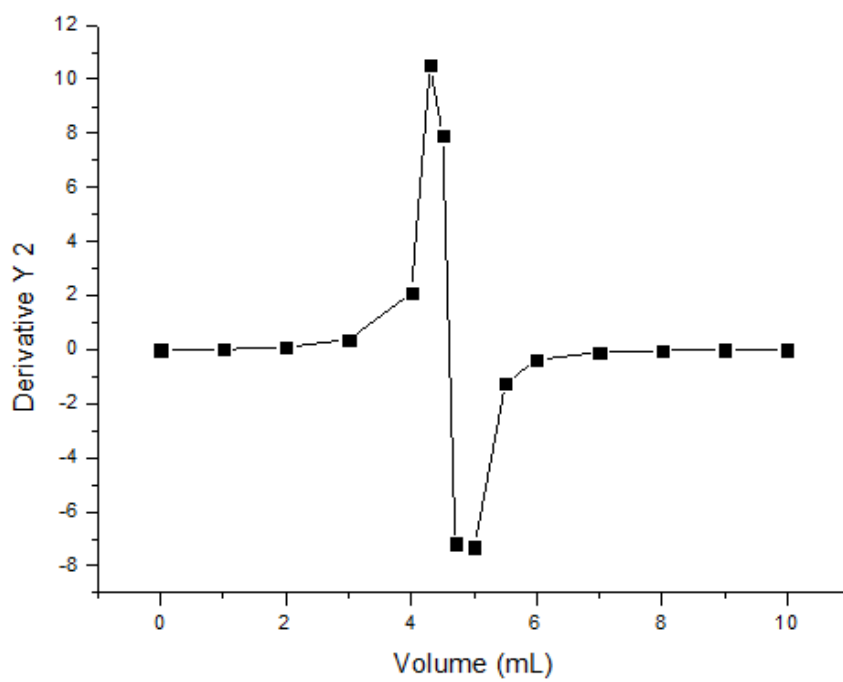
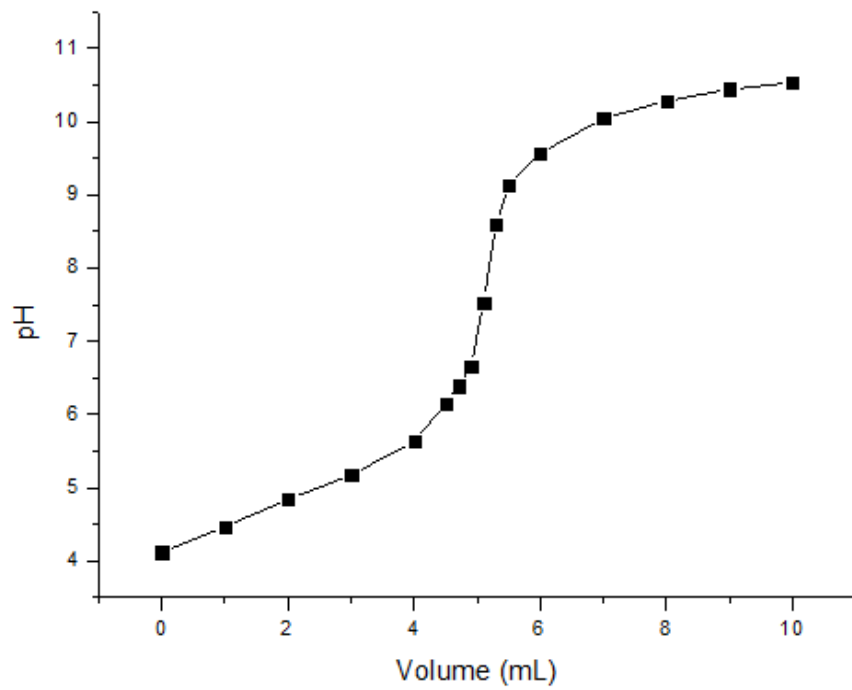
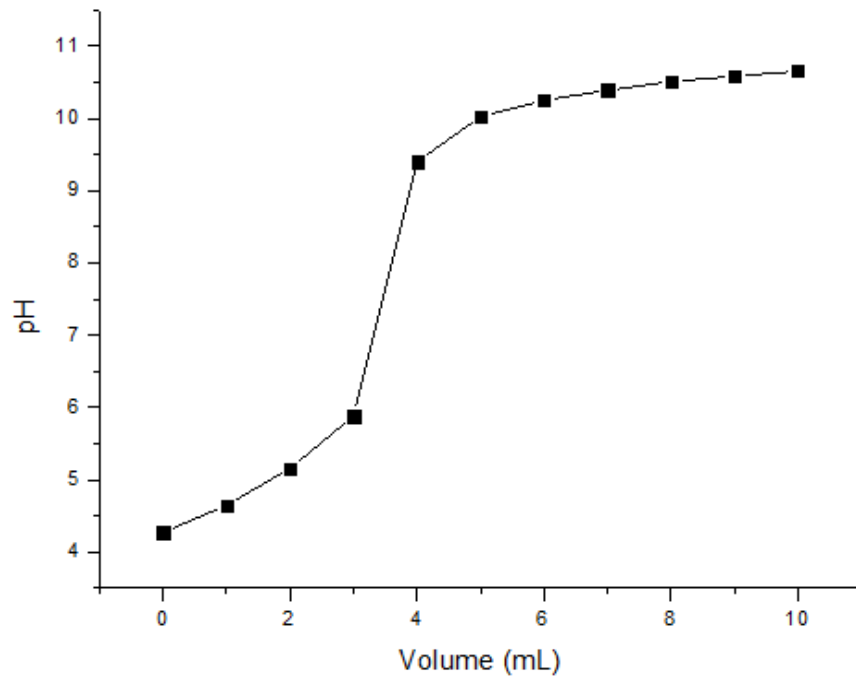


Figura 2.3 - Curvas de titulação da esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom em 0,5 h (em triplicata)



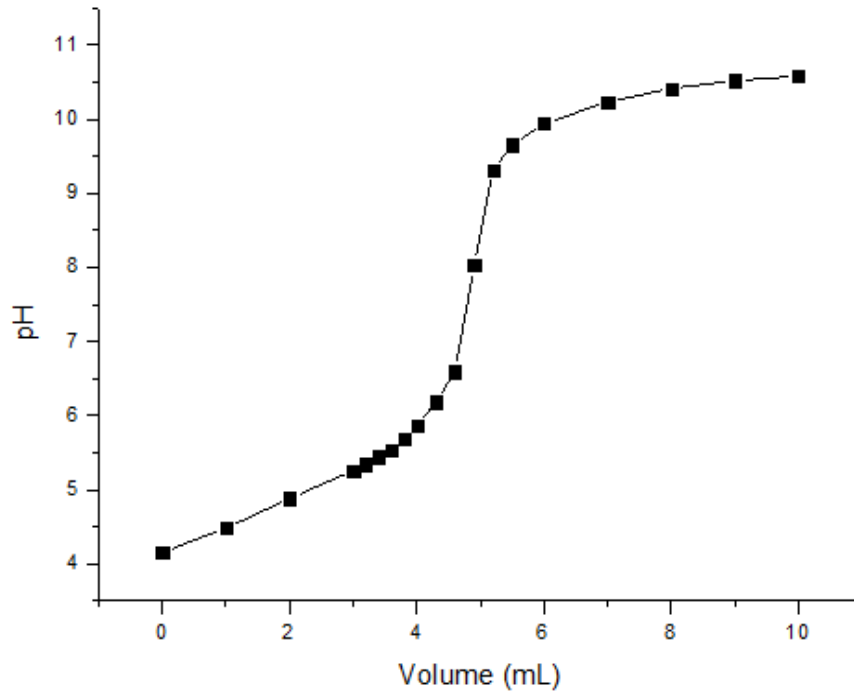
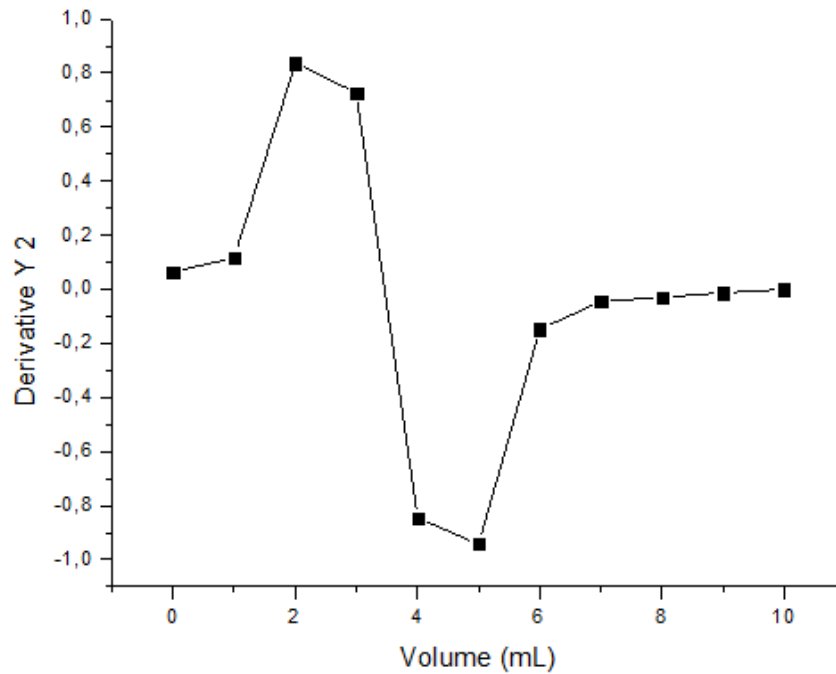


Figura 2.4 - Derivadas segundas das curvas de titulação da esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom em 0,5 h (em triplicata)



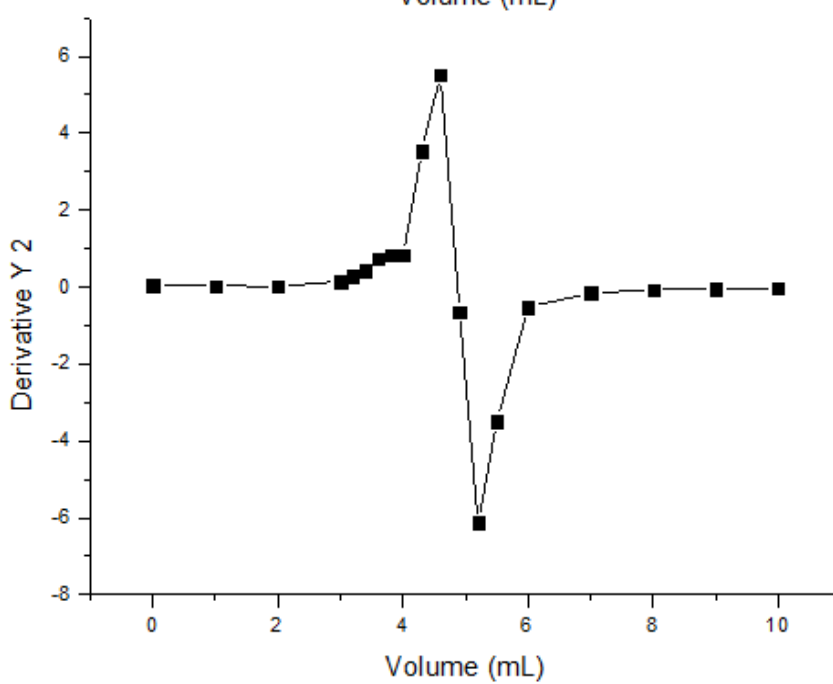
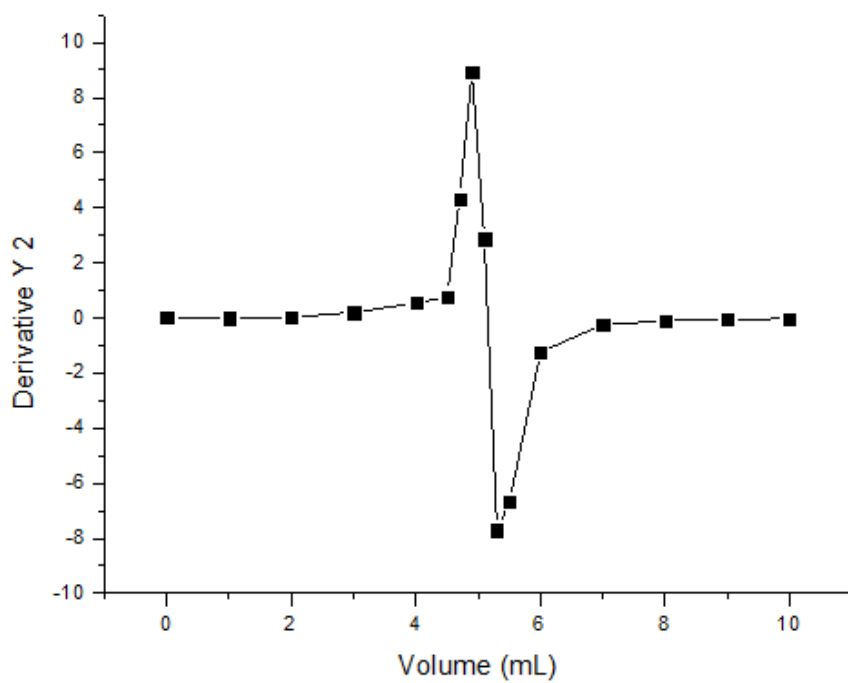
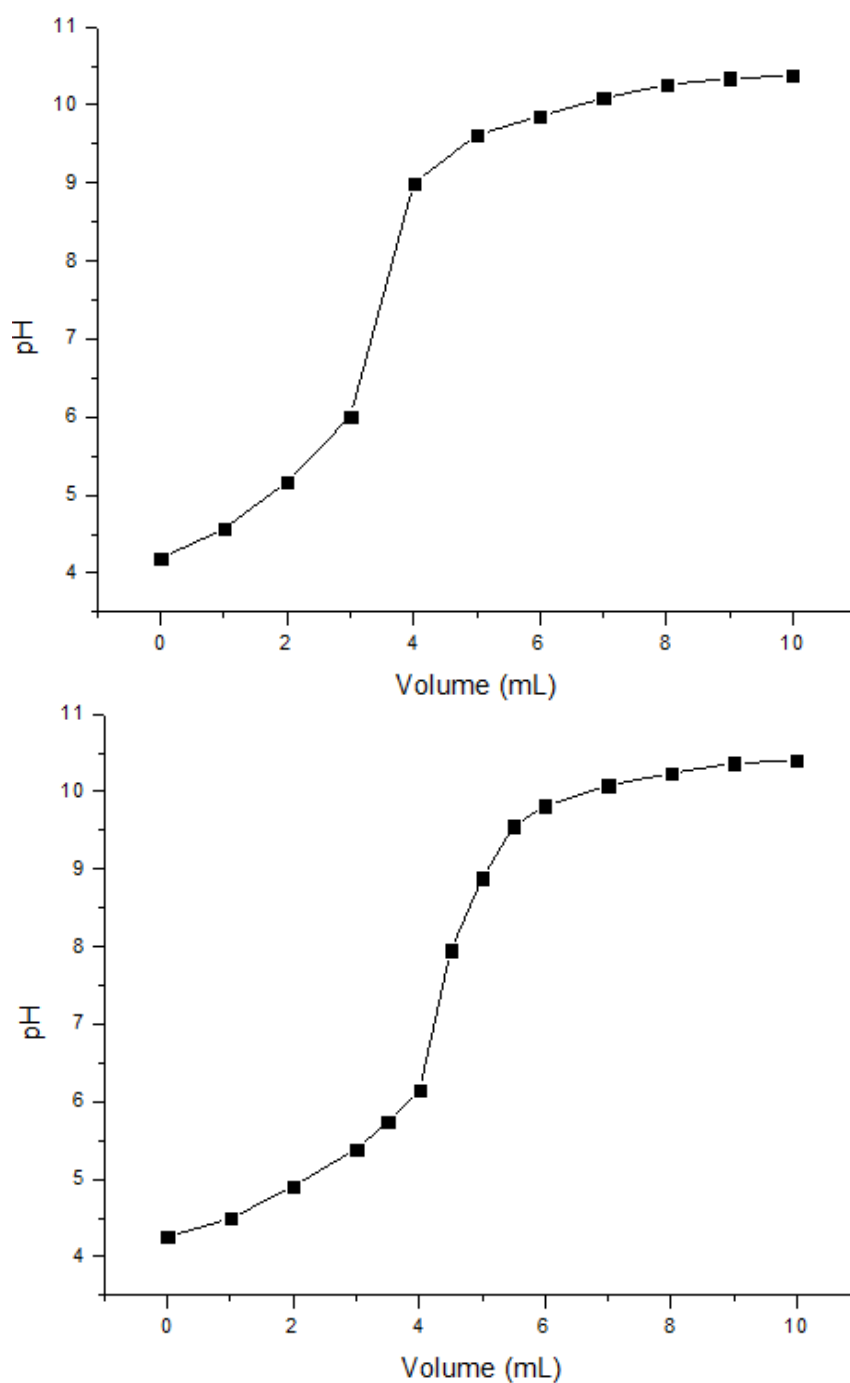


Figura 2.5 - Curvas de titulação da esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom em 1,0 h (em triplicata)



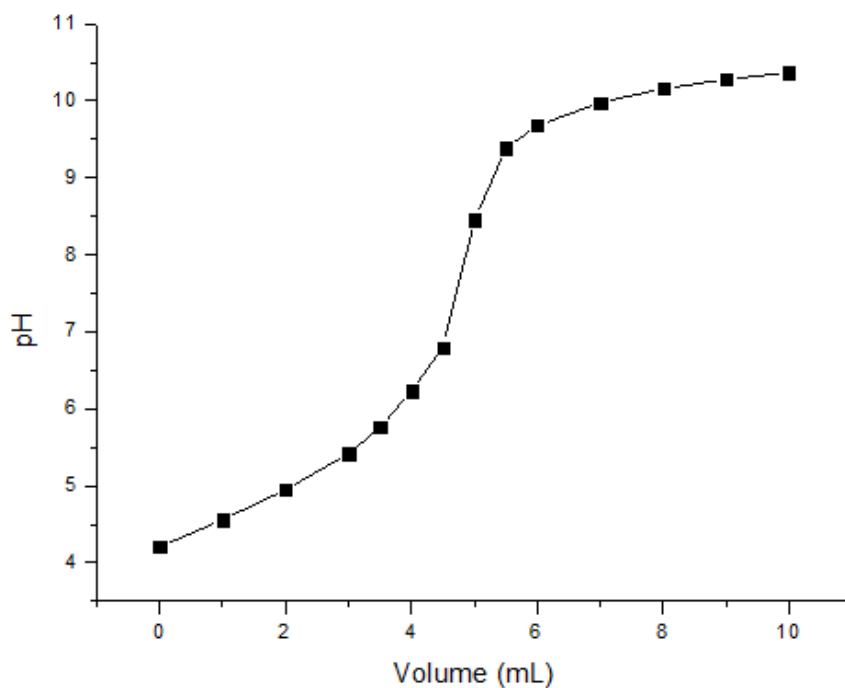
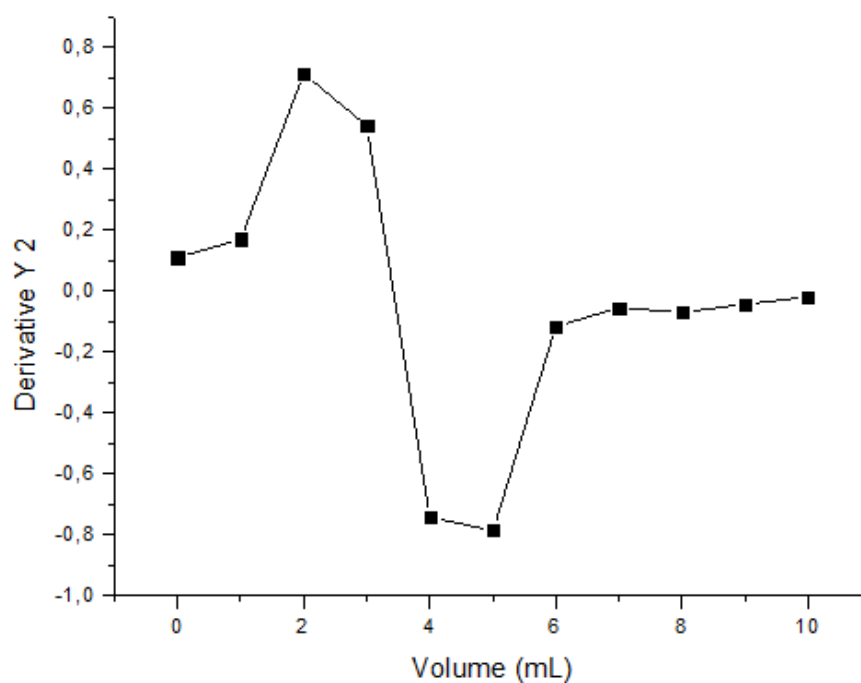


Figura 2.6 - Derivadas segundas das curvas de titulação da esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom em 1,0 h (em triplicata)



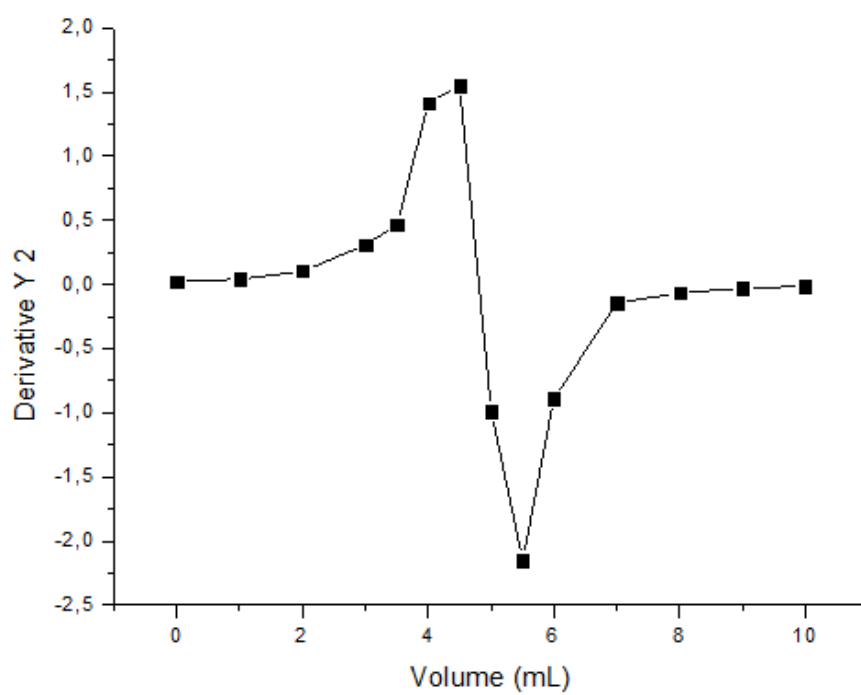
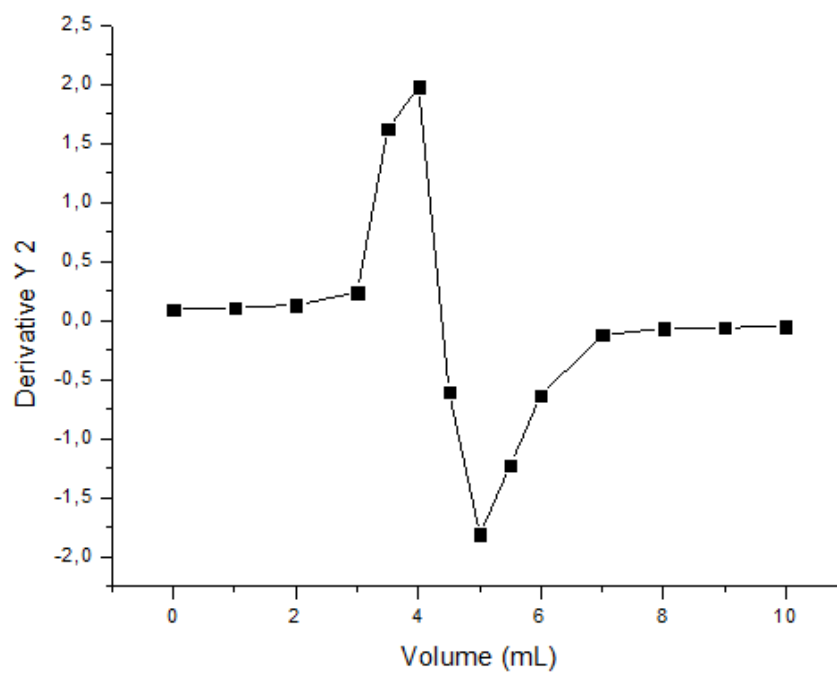
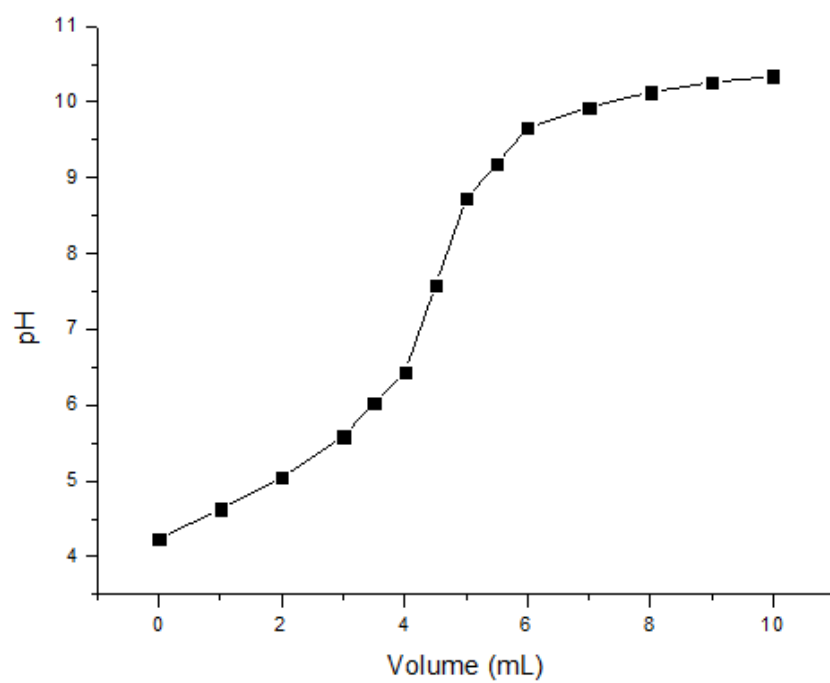
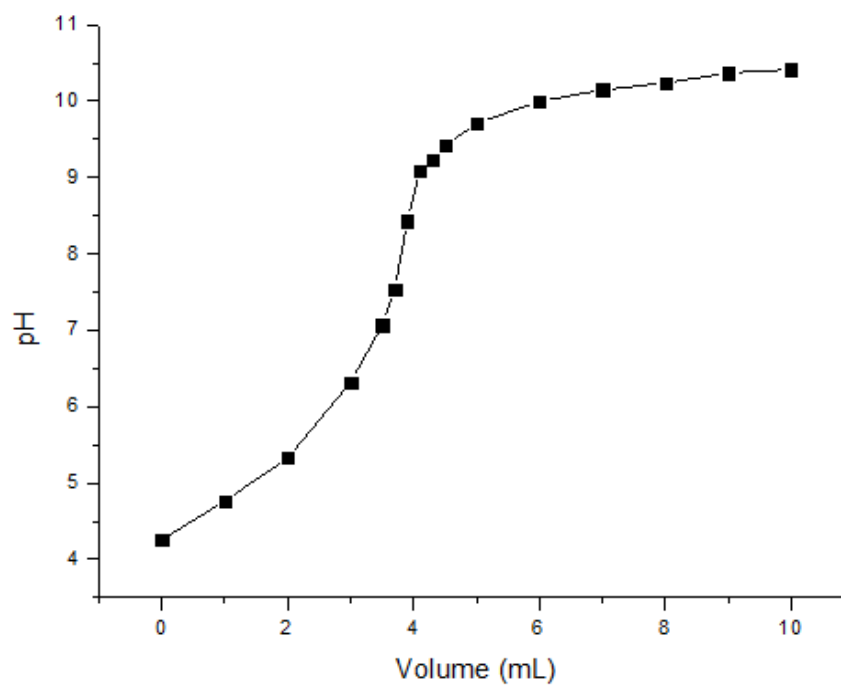


Figura 2.7 - Curvas de titulação da esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom em 1,5 h (em triplicata)





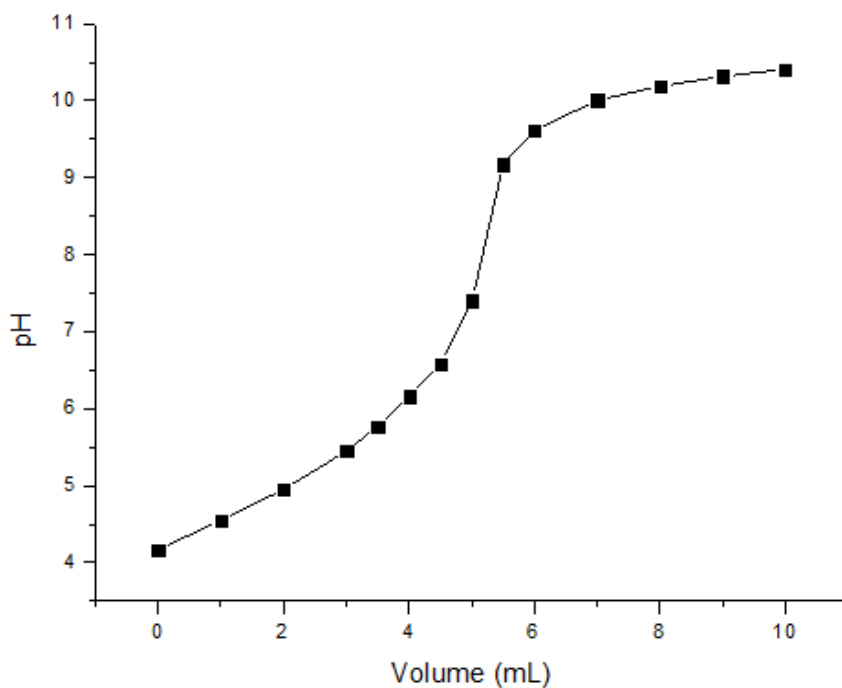
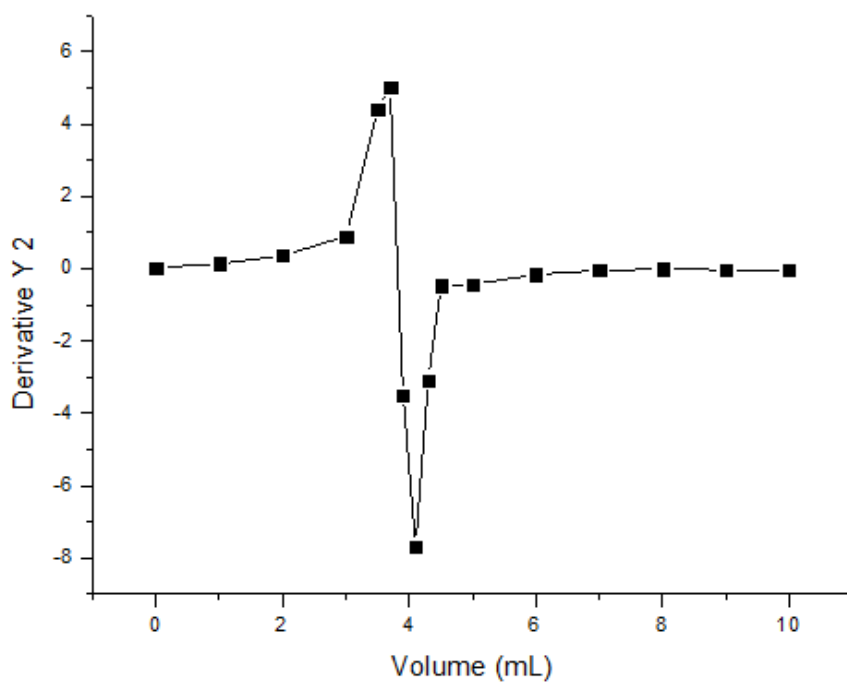


Figura 2.8 - Derivadas segundas das curvas de titulação da esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom em 1,5 h (em triplicata)



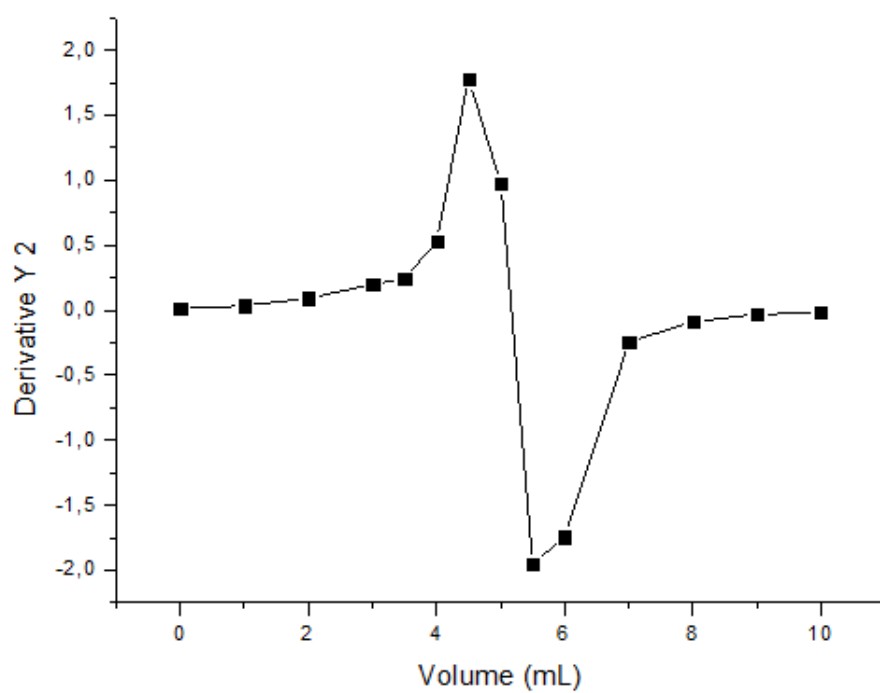
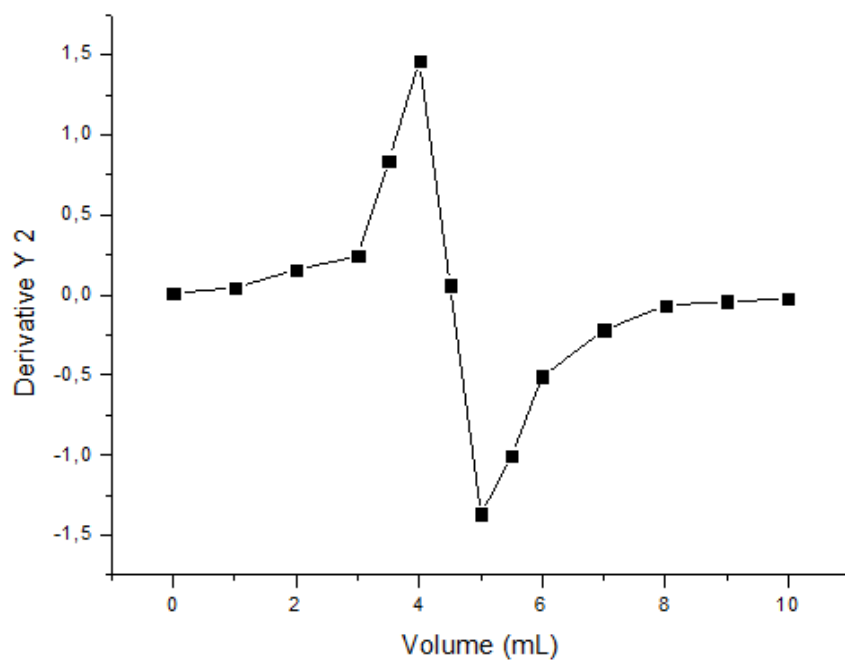
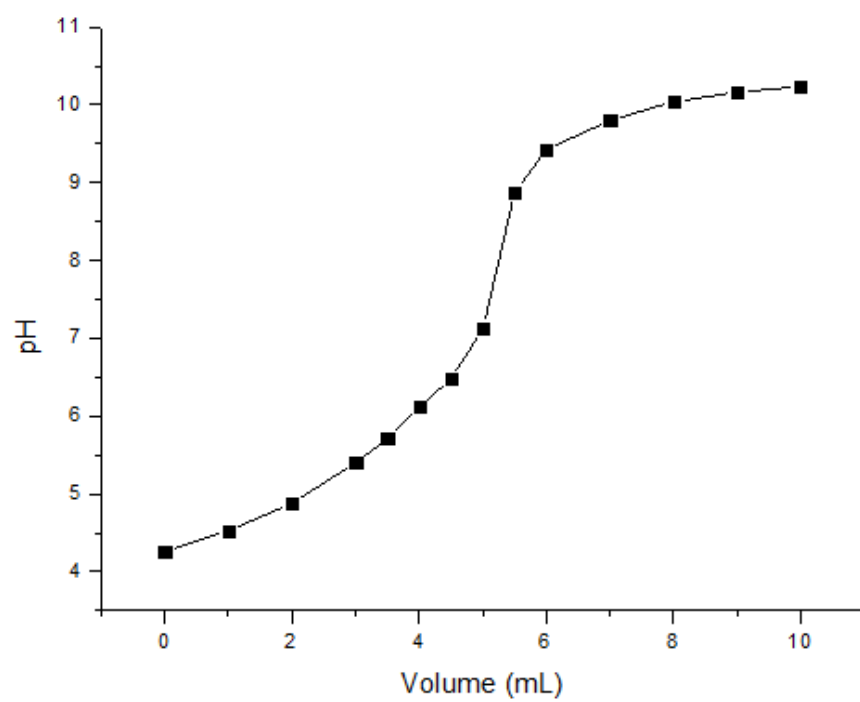
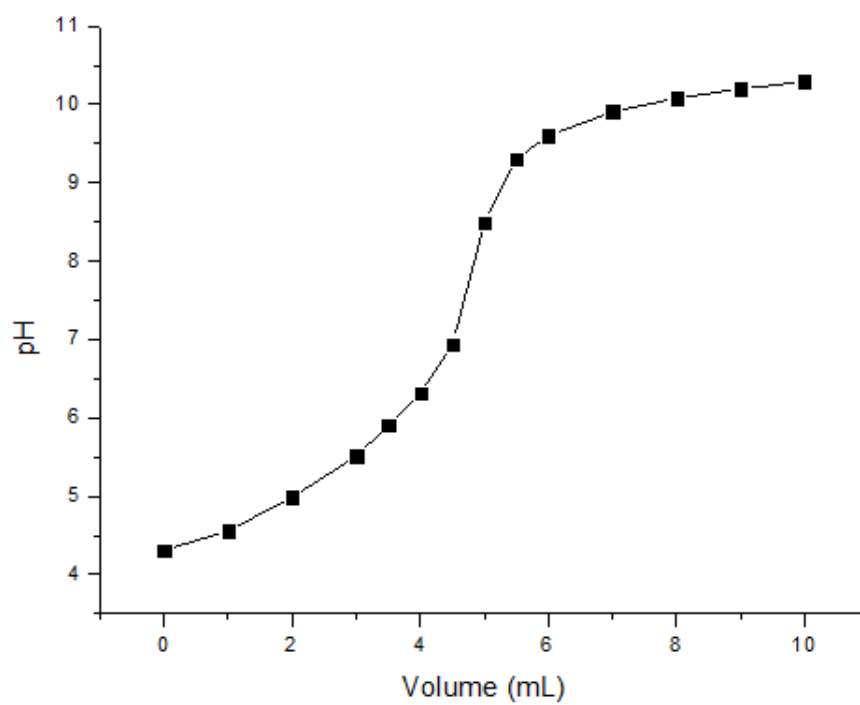


Figura 2.9 - Curvas de titulação da esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom em 2,0 h (em triplicata)



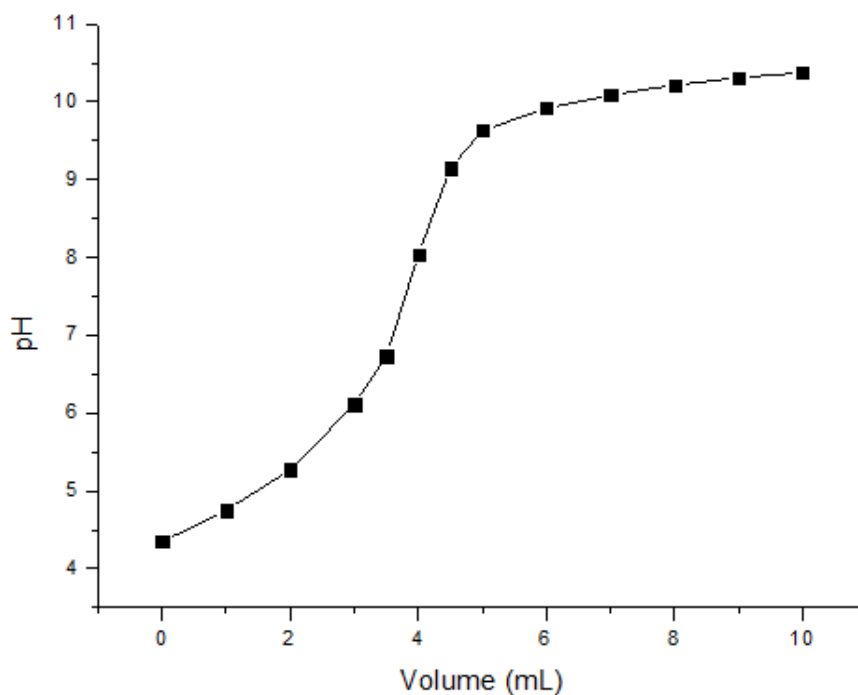
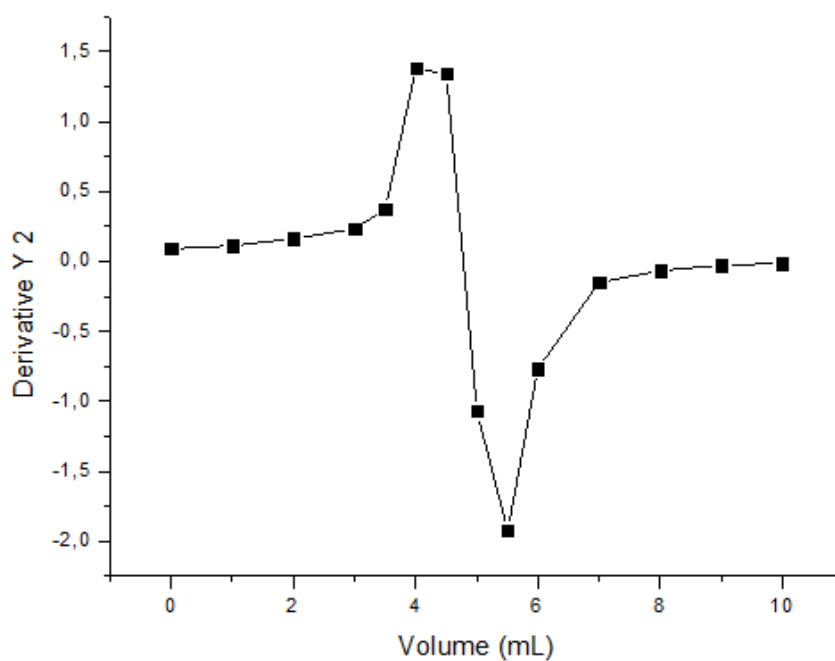
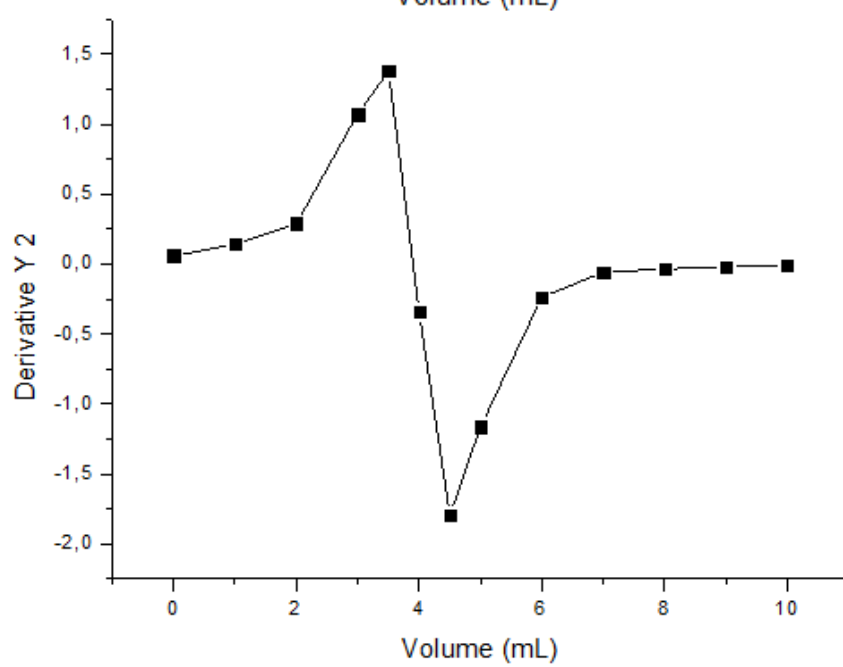
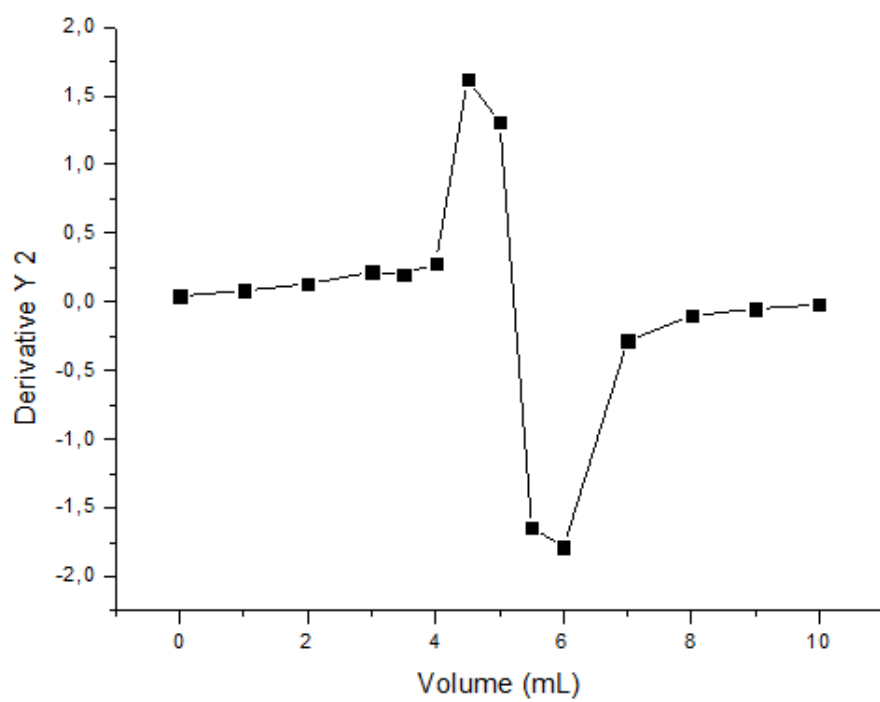


Figura 2.10 - Derivadas segundas das curvas de titulação da esterificação do ácido butírico com xilitol em banho de ultrassom em 2,0 h (em triplicata)





## APÊNDICE III

As reações de esterificação do ácido oleico com xilitol em banho de ultrassom empregando o iso-octano como solvente reacional foram acompanhadas por titulação potenciométrica. Os gráficos nesse apêndice foram gerados com os resultados de pH medidos em um potenciômetro MS-Tecnon MS-150 empregando eletrodo de platina. A metodologia empregada nas sínteses encontra-se descrita no capítulo 3 – METODOLOGIA – desta dissertação.

Figura 3.1 - Curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol em banho de ultrassom empregando iso-octano como solvente em 0,5 hora (em duplicata)

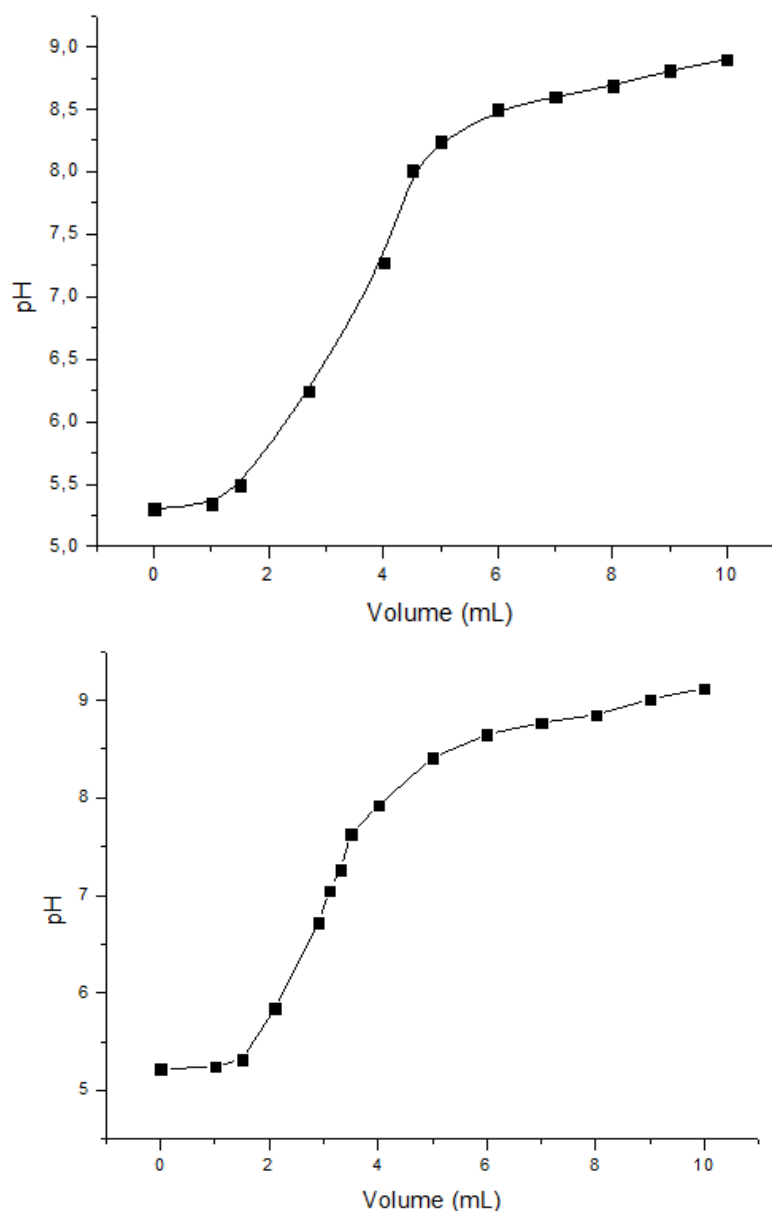


Figura 3.2 - Derivadas segundas das curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol em banho de ultrassom empregando iso-octano como solvente em 0,5 hora (em duplicata)

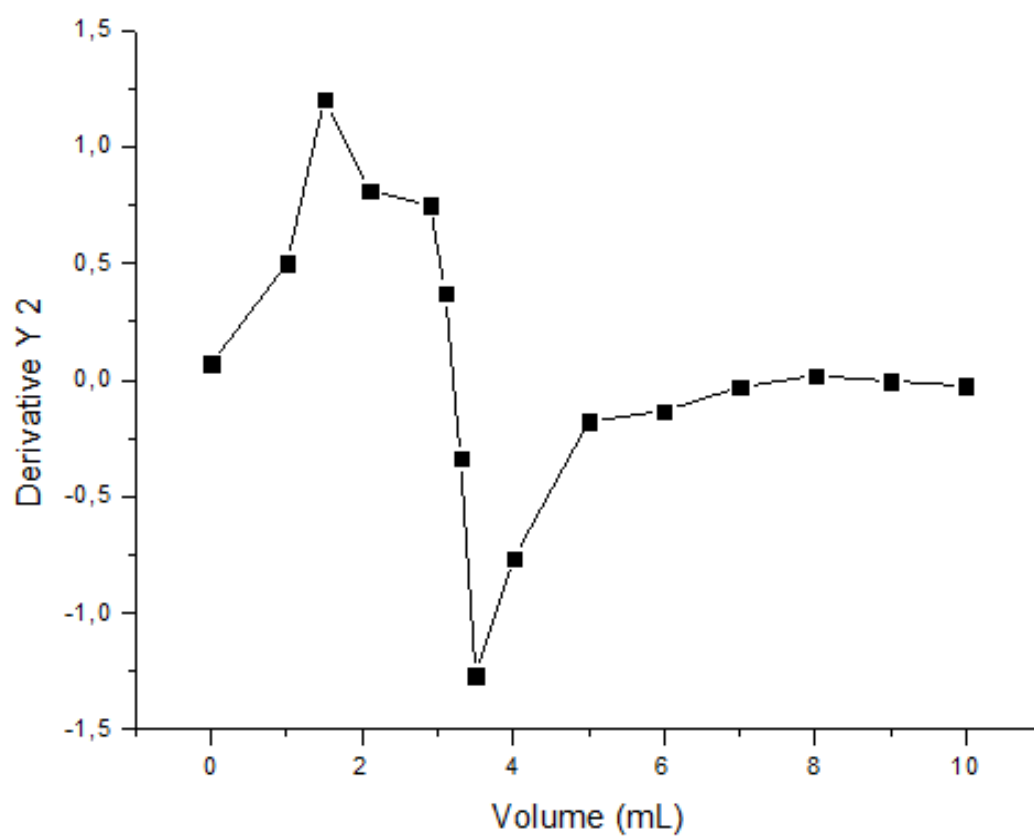
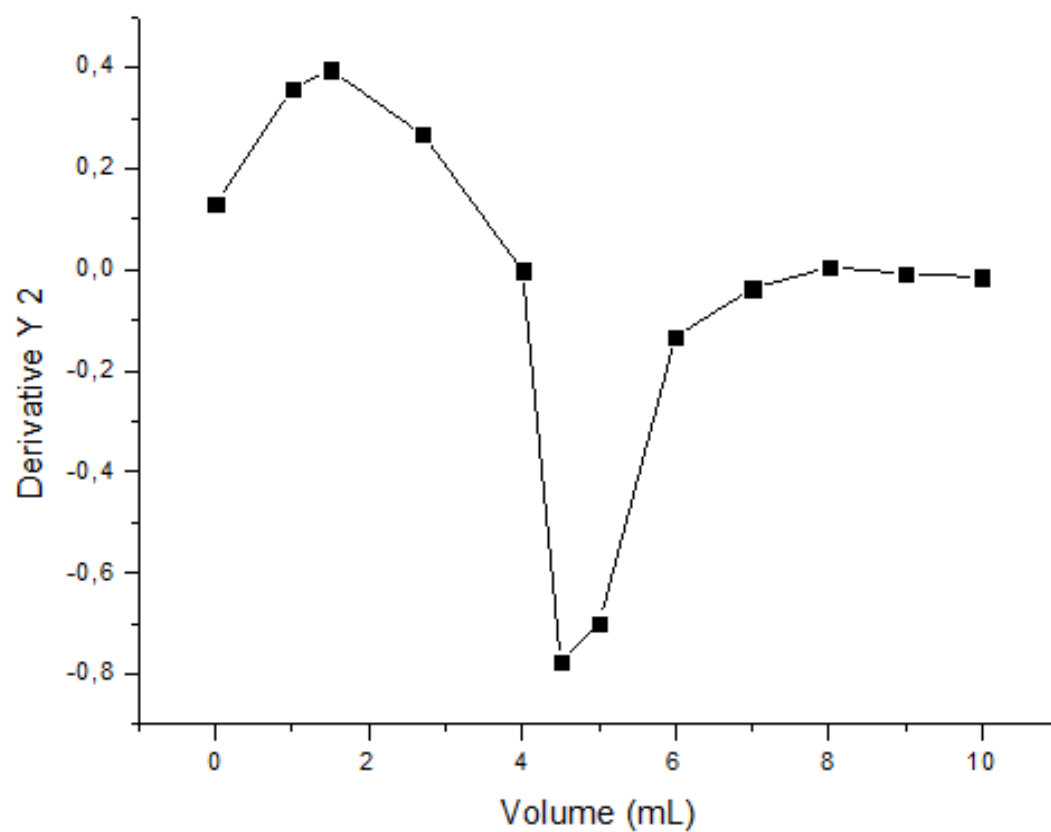


Figura 3.3 - Curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol em banho de ultrassom empregando iso-octano como solvente em 1,0 hora (em duplicata)

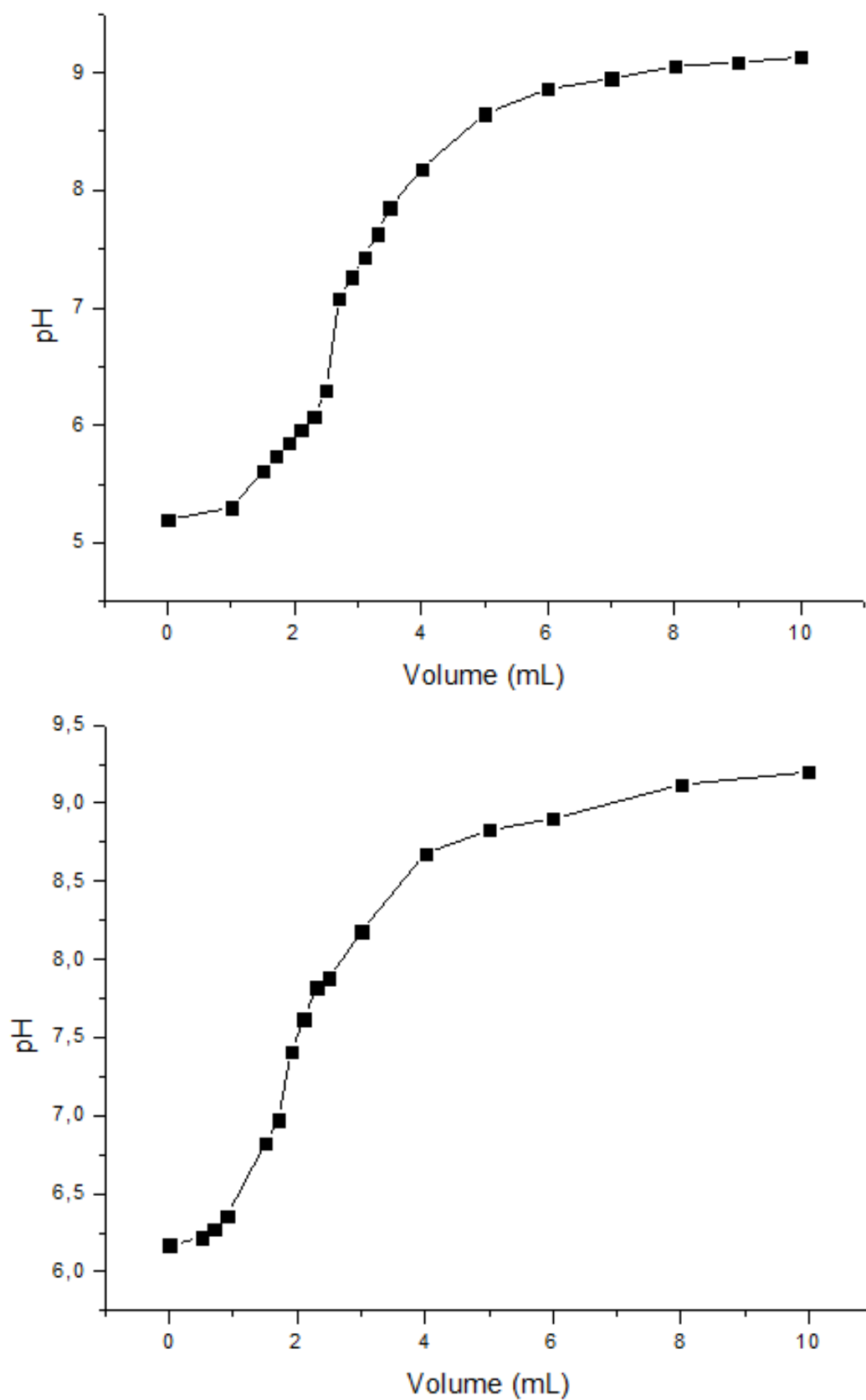




Figura 3.4 - Derivadas segundas das curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol em banho de ultrassom empregando iso-octano como solvente em 1,0 hora (em duplicata)

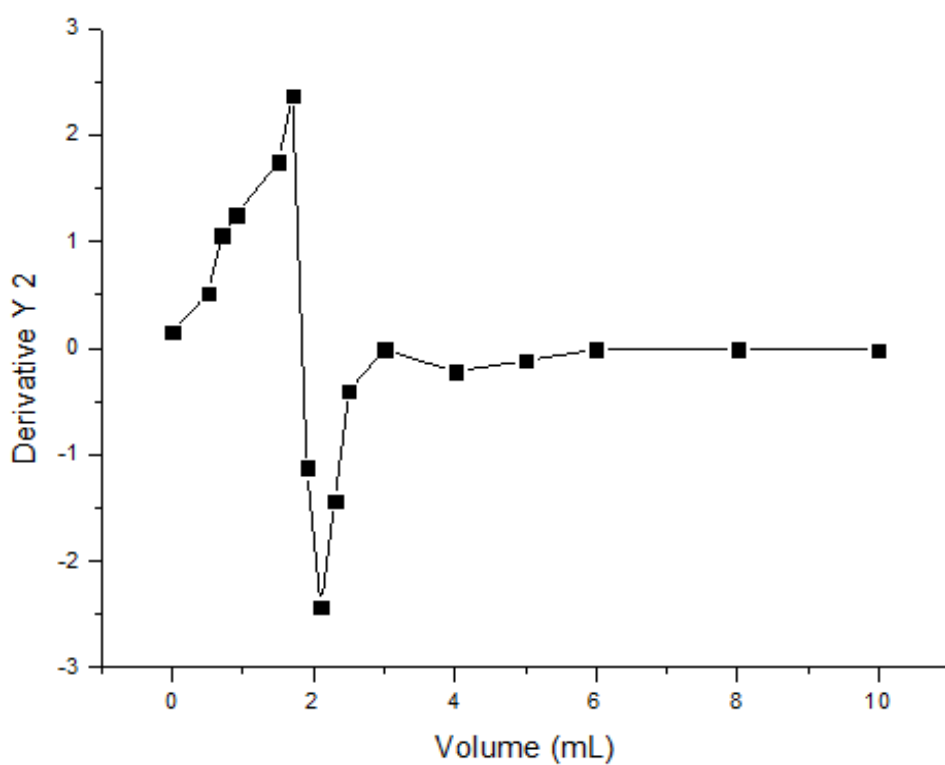
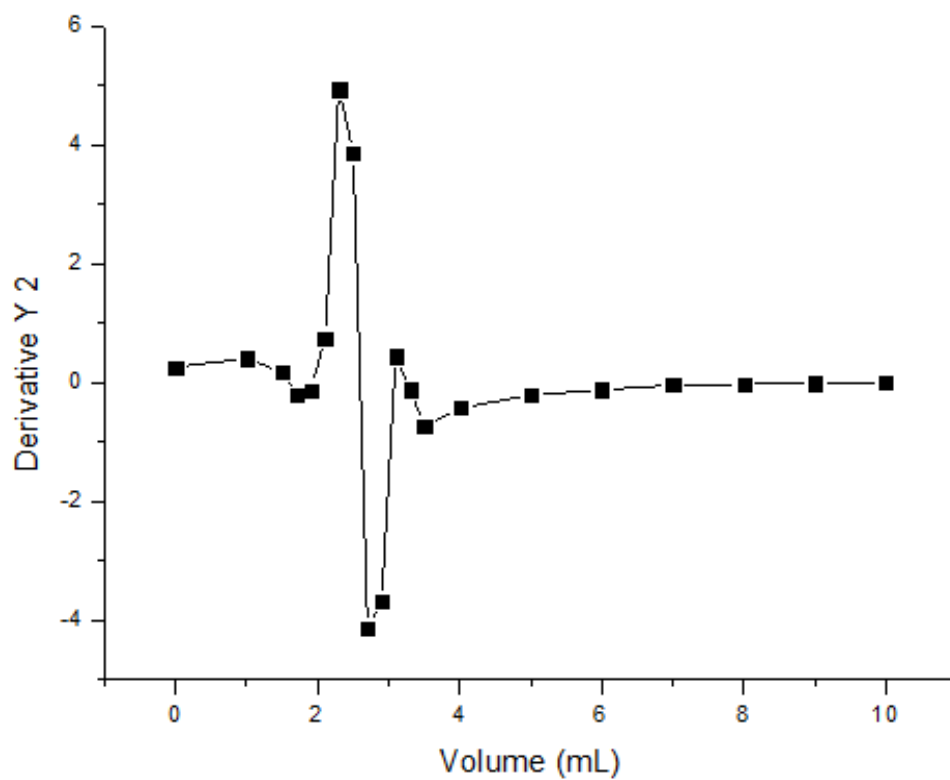


Figura 3.5 - Curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol em banho de ultrassom empregando iso-octano como solvente em 1,5 horas (em duplicata)

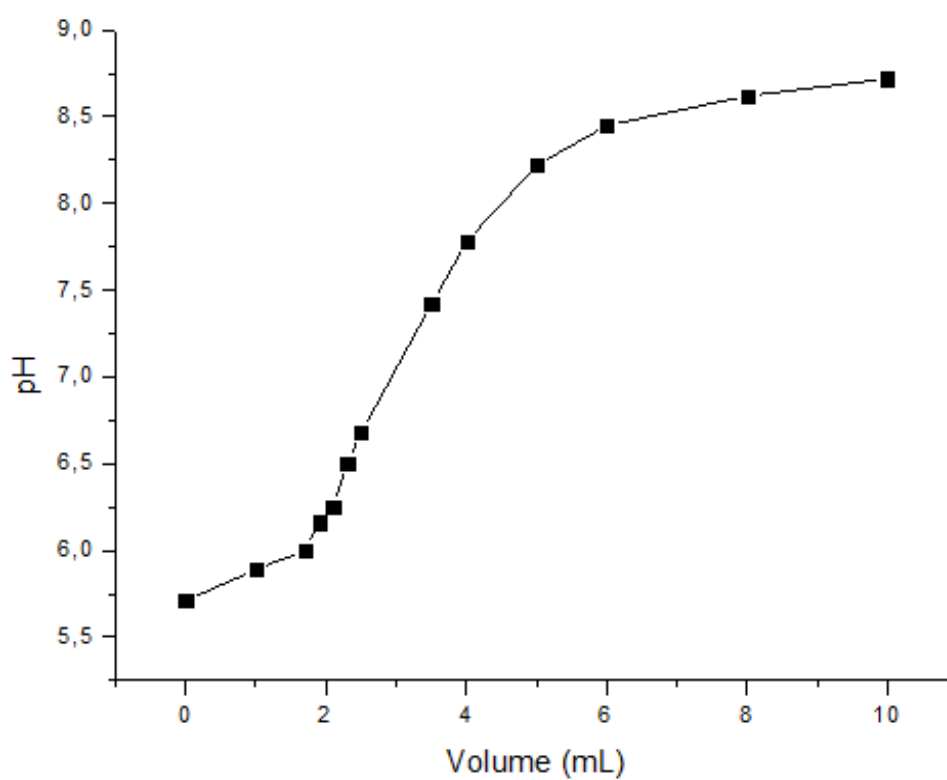
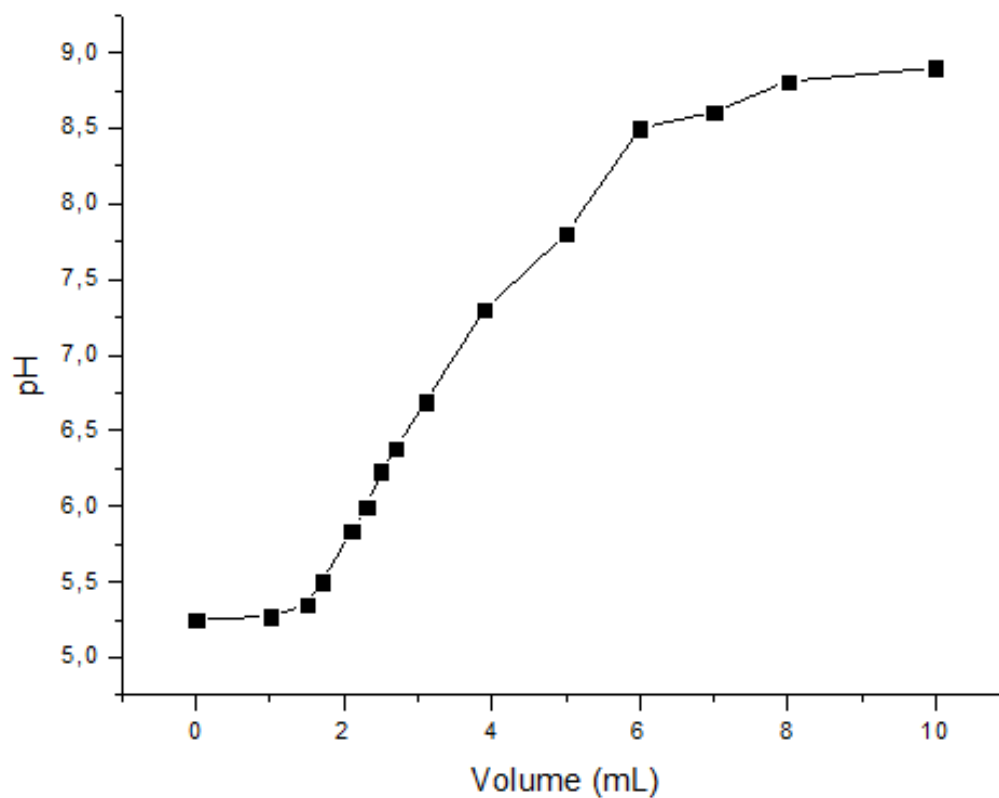


Figura 3.6 - Derivadas segundas das curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol em banho de ultrassom empregando iso-octano como solvente em 1,5 horas (em duplicata)

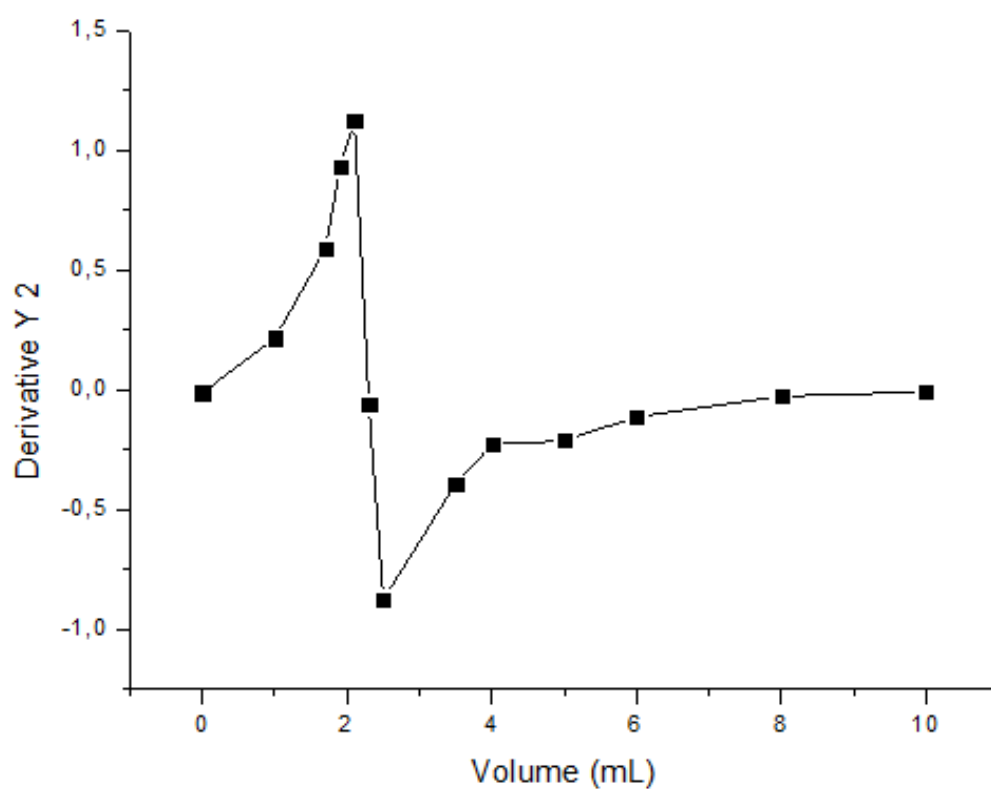
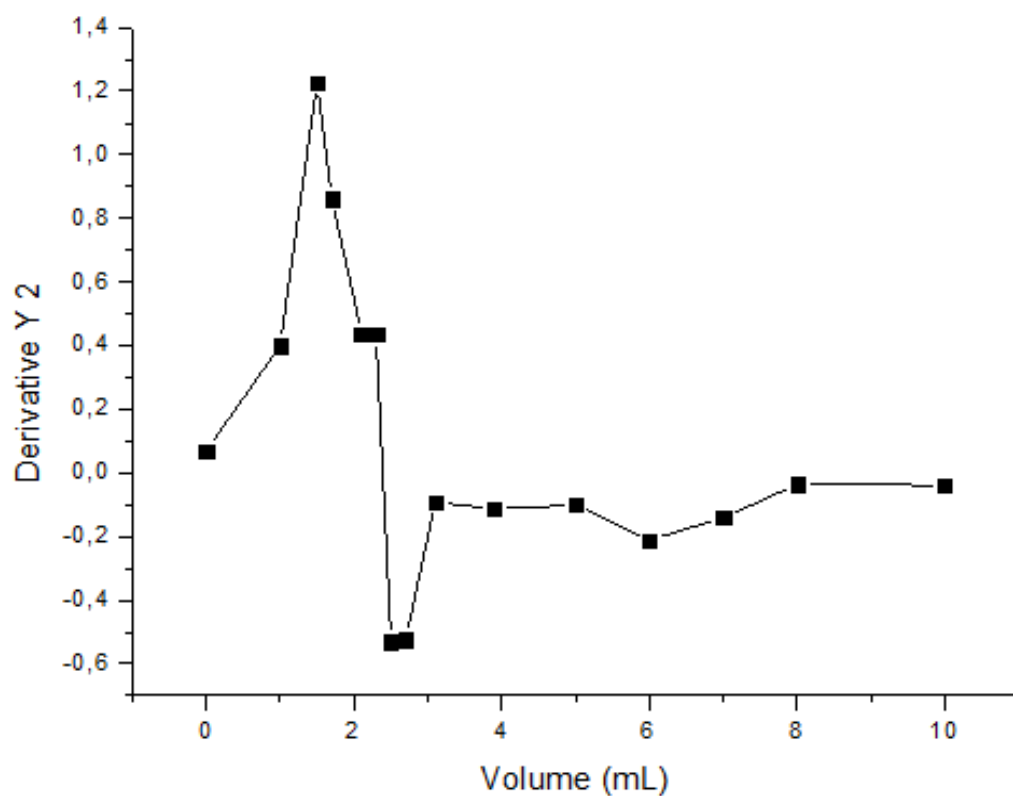


Figura 3.7 - Curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xitolol em banho de ultrassom empregando iso-octano como solvente em 2,0 horas (em duplicata)

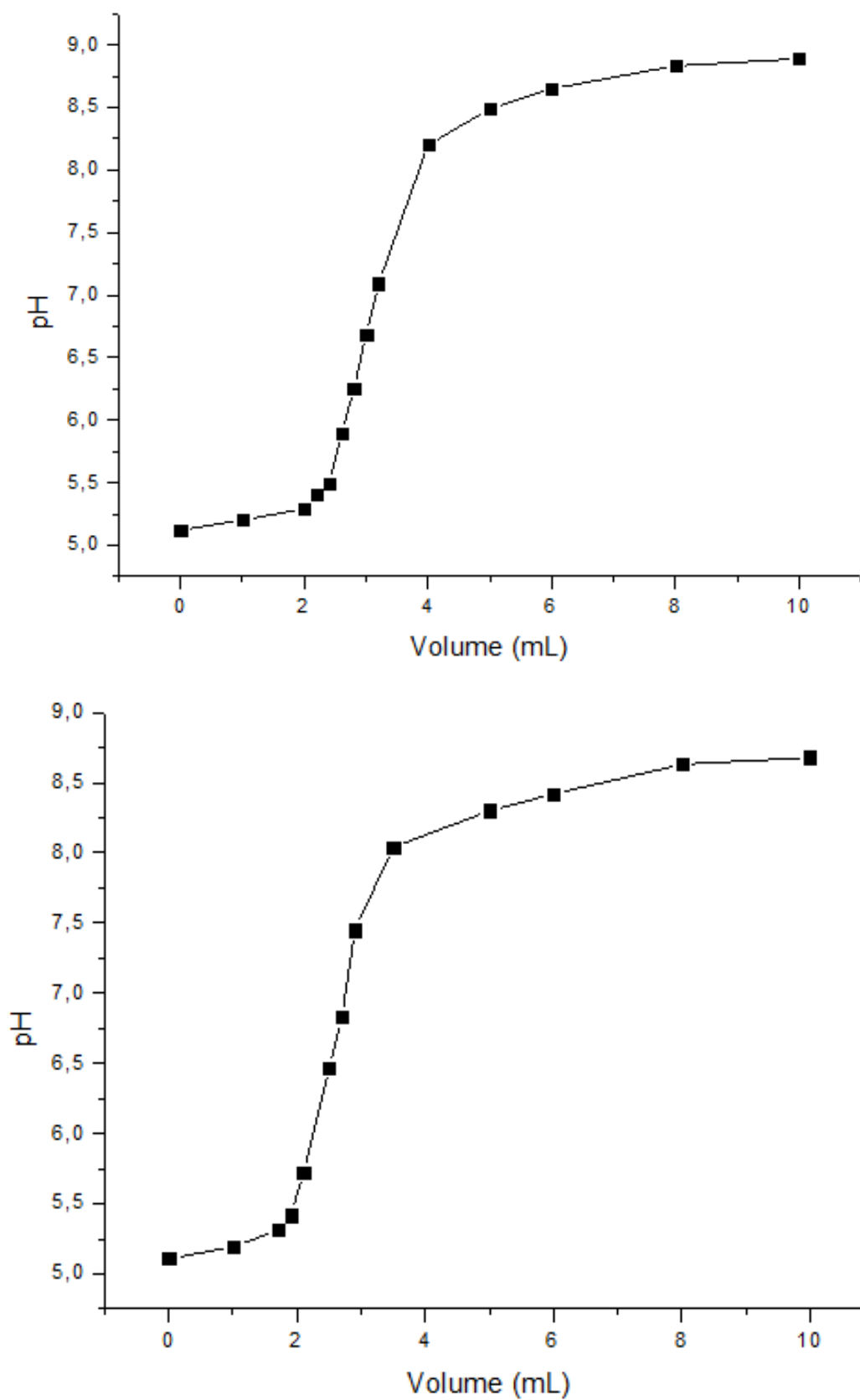


Figura 3.8 - Derivadas segundas das curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol em banho de ultrassom empregando iso-octano como solvente em 2,0 horas (em duplicata)

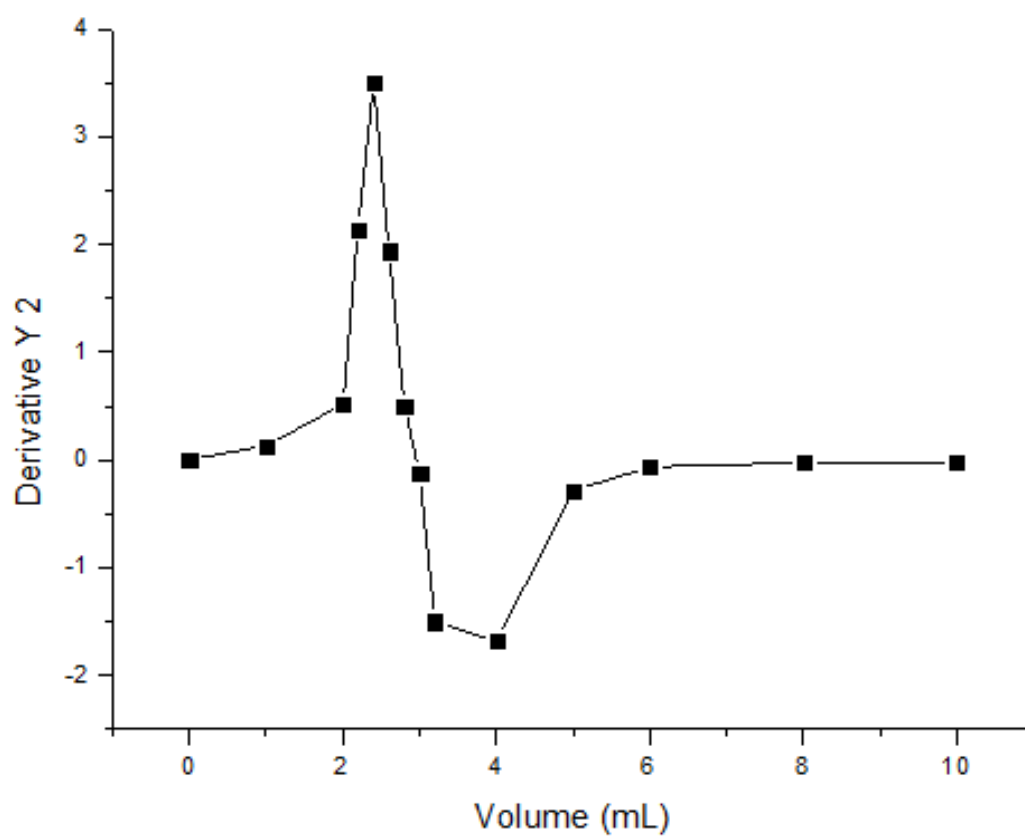
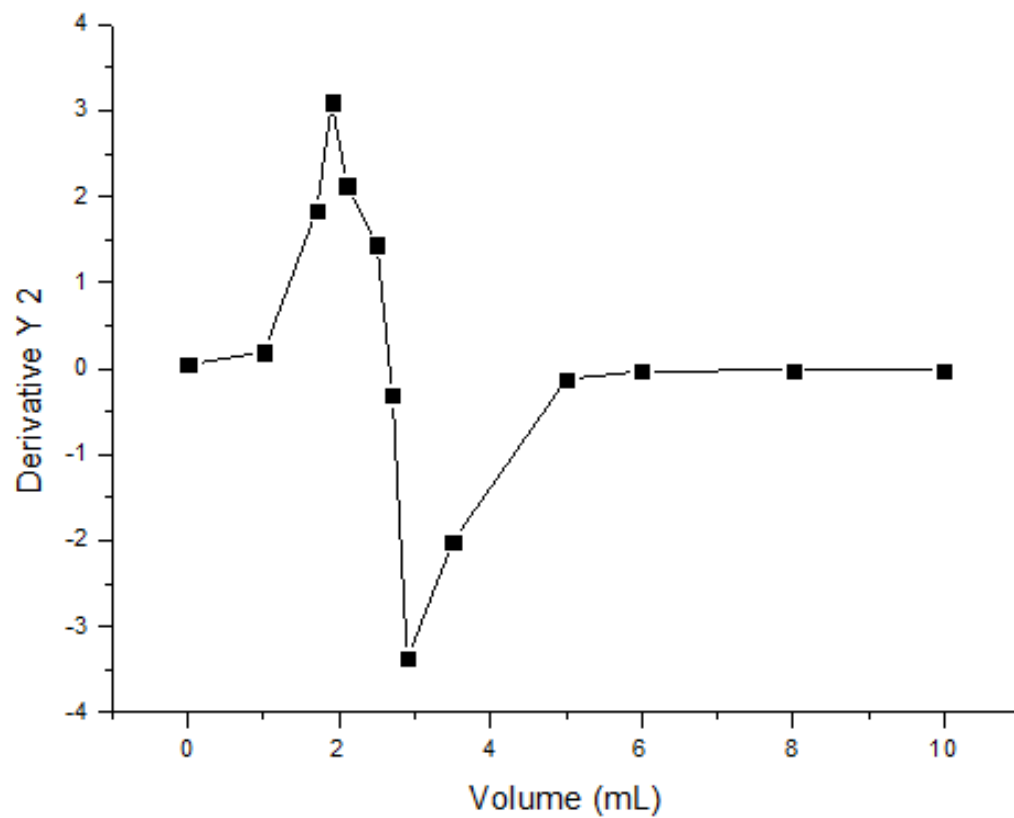


Figura 3.9 - Curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol em banho de ultrassom empregando iso-octano como solvente em 2,5 horas (em duplicata)

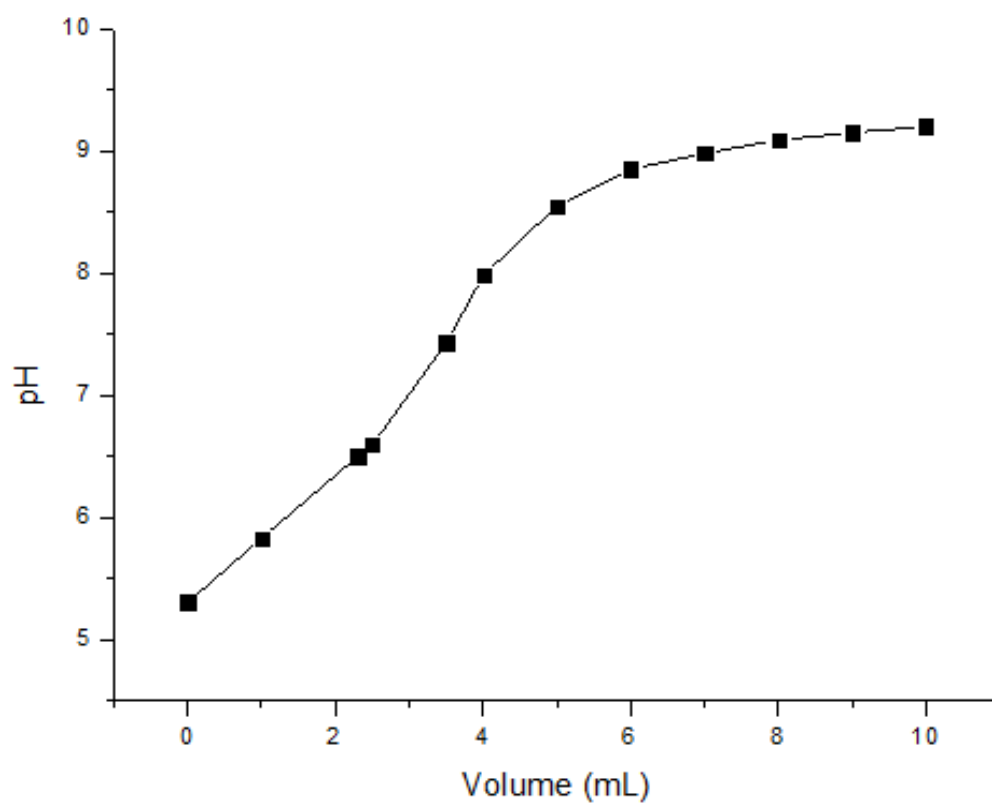
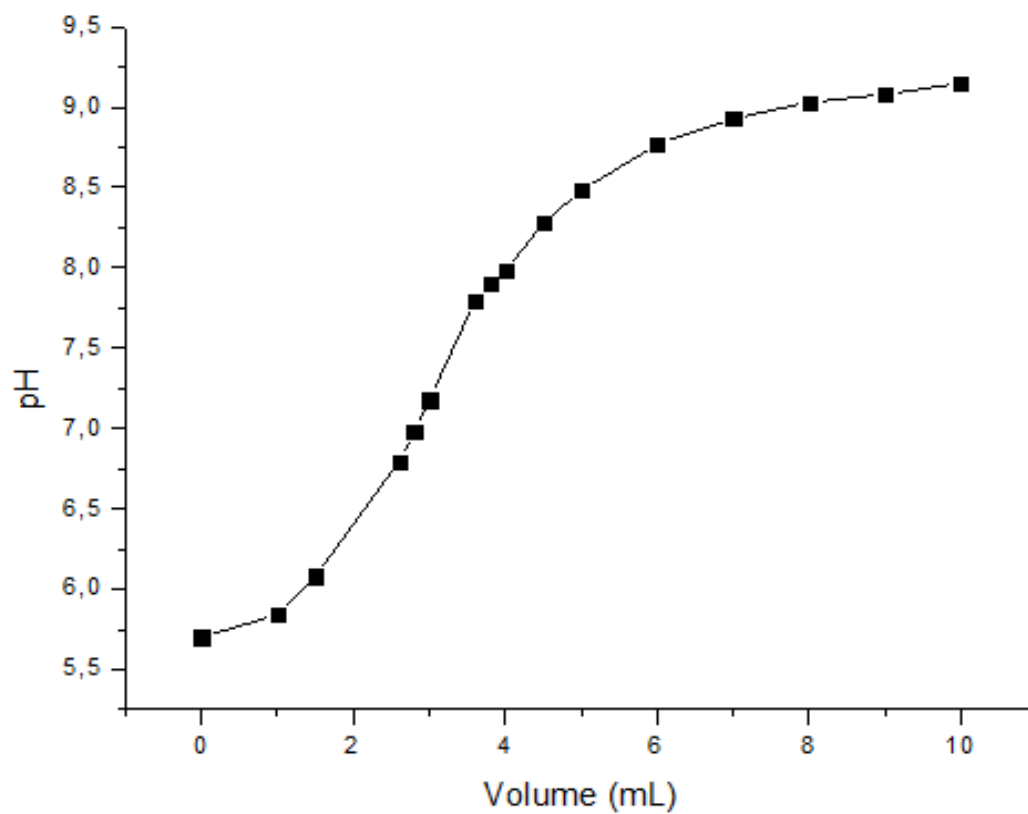
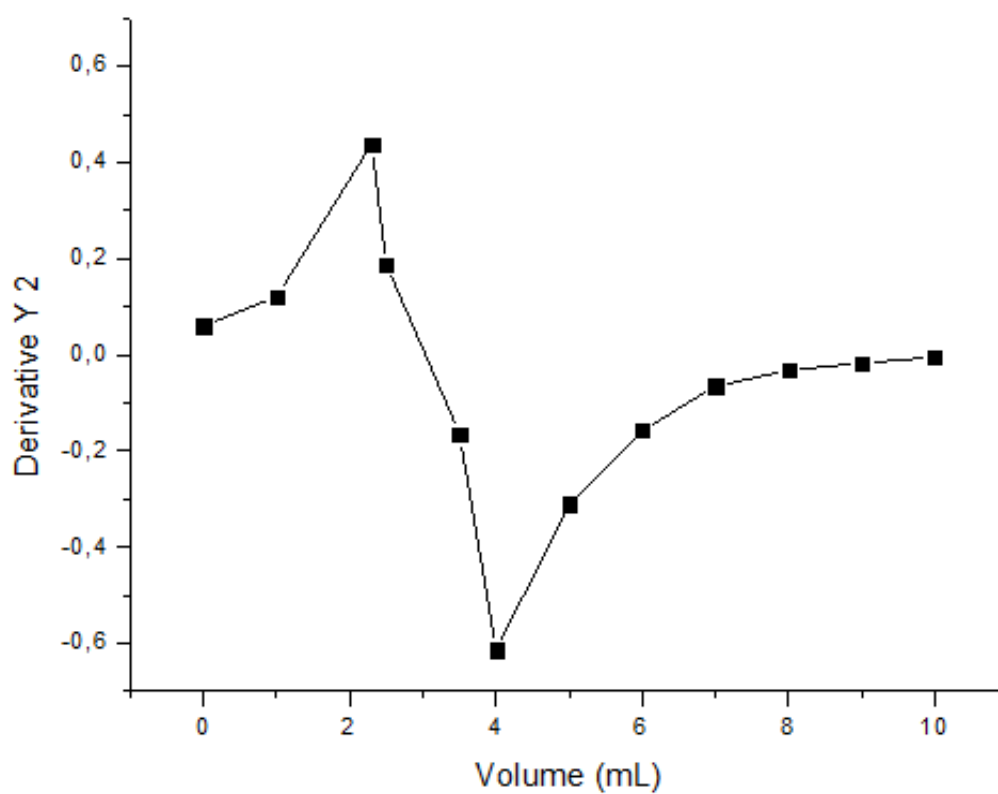
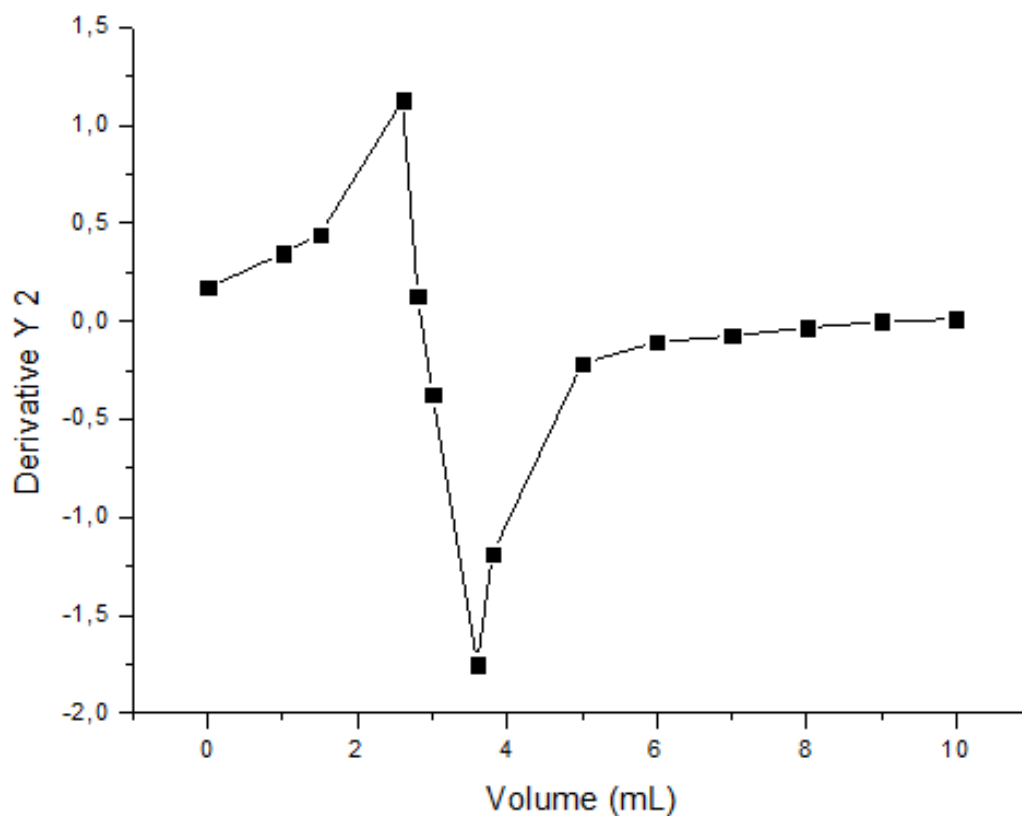


Figura 3.10 - Derivadas segundas das curvas de titulação da esterificação do ácido oleico com xilitol em banho de ultrassom empregando iso-octano como solvente em 2,5 horas (em duplicata)



## APÊNDICE IV

A lipase Novozym 435 favorece a formação de monoésteres e a fim de determinar essa eficácia, foram feitas análises de alíquotas retiradas nos tempos de 5, 10, 20, 30, 60 e 90 minutos da esterificação do ácido oleico com diversos poliálcoois. Essas análises empregaram acetonitrila/metanol (80:20) como fase móvel em uma coluna Phenomenex HvoerClone 5u C18 130A de 100 x 4,60 mm e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

Tabela 4.1 - Dados da análise em CLAE/UV-Vis da reação de esterificação entre o ácido oleico e o glicerol empregando a Novozym 435 e banho de ultrassom.

GLICEROL						
Tempo	Tempo de retenção	Composto	Área	Tempo inicial	Tempo final	Área %
5	1,196	Monoéster	153403	1,058	1,267	5,3303
	2,015	Ácido oleico	2724551	1,658	2,550	94,6698
10	1,183	Monoéster	625191	1,092	1,275	11,4694
	1,301	Poliésteres	215716	1,275	1,533	3,9574
	1,948	Ácido oleico	4610045	1,783	2,508	84,5732
20	1,199	Monoéster	799620	1,117	1,267	19,1815
	1,336	Poliésteres	326226	1,267	1,525	7,8256
	1,977	Ácido oleico	3042857	1,792	2,525	72,9929
30	1,191	Monoéster	790341	1,100	1,273	20,7814
	1,335	Poliésteres	444969	1,273	1,600	11,7001
	1,984	Ácido oleico	2567798	1,792	2,508	67,5184
60	1,198	Monoéster	543506	1,117	1,283	15,8536
	1,311	Poliésteres	762306	1,283	1,608	22,2358
	1,968	Ácido oleico	2122470	1,783	2,517	61,9106
90	1,204	Monoéster	556811	1,108	1,275	15,7341
	1,327	Poliésteres	813458	1,275	1,633	22,9863
	1,925	Ácido oleico	2168612	1,792	2,492	61,2796



Tabela 4.2 - Dados da análise em CLAE/UV-Vis da reação de esterificação entre o ácido oleico e o glicerol protegido empregando a Novozym 435 e banho de ultrassom.

GLICEROL PROTEGIDO						
Tempo	Tempo de retenção	Composto	Área	Tempo inicial	Tempo final	Área %
5	1,203	Monoéster	129914	1,117	1,267	4,5716
	2,002	Ácido oleico	2711873	1,742	2,517	95,4284
10	1,180	Monoéster	1078746	1,075	1,258	15,7998
	1,322	Poliésteres	201906	1,258	1,533	2,9572
	1,966	Ácido oleico	5546941	1,758	2,517	81,2430
20	1,188	Monoéster	1298523	1,092	1,267	18,6586
	1,324	Poliésteres	501737	1,267	1,608	7,2095
	1,958	Ácido oleico	5159121	1,775	2,500	74,1319
30	1,202	Monoéster	1969160	1,092	1,267	21,6714
	1,340	Poliésteres	781198	1,267	1,617	8,5974
	1,937	Ácido oleico	6336088	1,758	2,500	69,7312
60	1,204	Monoéster	296762	1,092	1,259	8,8727
	1,323	Poliésteres	436716	1,259	1,558	13,0571
	1,943	Ácido oleico	2672433	1,758	2,400	79,9014
90	1,201	Monoéster	221218	1,092	1,259	7,0415
	1,323	Poliésteres	477519	1,259	1,550	15,1997
	1,960	Ácido oleico	2385366	1,817	2,525	75,9276

Tabela 4.3 - Dados da análise em CLAE/UV-Vis da reação de esterificação entre o ácido oleico e o xilitol empregando a Novozym 435 e banho de ultrassom.

XILITOL						
Tempo	Tempo de retenção	Composto	Área	Tempo inicial	Tempo final	Área %
5	1,205	Monoéster	107923	1,092	1,340	3,8801
	1,936	Ácido oleico	2673526	1,832	2,525	96,1199
10	1,217	Monoéster	311050	1,100	1,392	7,7025
	1,463	Poliésteres	118464	1,392	1,619	2,9335
	1,929	Ácido oleico	3608786	1,833	2,458	89,3640
20	1,197	Monoéster	904917	1,092	1,358	15,4217
	1,465	Poliésteres	329319	1,358	1,625	5,6123
	1,917	Ácido oleico	4633580	1,817	2,408	78,9660
30	1,216	Monoéster	887798	1,142	1,342	13,7240
	1,465	Poliésteres	462219	1,342	1,625	7,1452
	1,946	Ácido oleico	5118928	1,800	2,500	79,1308
60	1,210	Monoéster	404964	1,109	1,352	7,9807
	1,461	Poliésteres	1248940	1,353	1,648	24,6131
	1,924	Ácido oleico	3420387	1,834	2,499	67,4062
90	1,199	Monoéster	387790	1,097	1,349	7,7371
	1,459	Poliésteres	1262018	1,343	1,644	25,1795
	1,932	Ácido oleico	3362277	1,840	2,510	67,0834

Tabela 4.4 - Dados da análise em CLAE/UV-Vis da reação de esterificação entre o ácido oleico e o xilitol protegido empregando a Novozym 435 e banho de ultrassom.

XILITOL PROTEGIDO						
Tempo	Tempo de retenção	Composto	Área	Tempo inicial	Tempo final	Área %
5	1,201	Monoéster	67859	1,100	1,250	2,5693
	1,980	Ácido oleico	2573288	1,172	2,525	97,4307
10	1,198	Monoéster	371490	1,108	1,249	13,1794
	1,941	Ácido oleico	2447227	1,742	2,492	86,8206
20	1,206	Monoéster	1373876	1,083	1,242	20,7830
	1,343	Poliésteres	184779	1,242	1,517	2,7952
	1,951	Ácido oleico	5051921	1,775	2,483	76,4218
30	1,191	Monoéster	1311847	1,092	1,250	16,9215
	1,336	Poliésteres	459152	1,250	1,525	5,9226
	1,938	Ácido oleico	5981546	1,767	2,483	77,1559
60	1,196	Monoéster	349331	1,092	1,248	13,1123
	1,336	Poliésteres	234317	1,248	1,542	8,7952
	1,928	Ácido oleico	2080499	1,792	2,483	78,0925
90	2,140	Monoéster	101190	1,092	1,251	10,5328
	1,334	Poliésteres	102645	1,251	1,542	10,6842
	1,936	Ácido oleico	756879	1,833	2,475	78,7830