UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE AÇÚCAR: SURFACTANTES E POLÍMEROS COMO NOVOS MATERIAIS AMBIENTALMENTE SEGUROS

Maurício Rodrigues Borges

Tese de Doutorado

Março de 2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE AÇÚCAR: SURFACTANTES E POLÍMEROS COMO NOVOS MATERIAIS AMBIENTALMENTE SEGUROS

MAURÍCIO RODRIGUES BORGES

NATAL/RN

2007

MAURÍCIO RODRIGUES BORGES

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE AÇÚCAR: SURFACTANTES E POLÍMEROS COMO NOVOS MATERIAIS AMBIENTALMENTE SEGUROS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Materiais.

ORIENTADORA: PROFª DRª ROSANGELA BALABAN GARCIA

NATAL/RN

2007

MAURÍCIO RODRIGUES BORGES

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE AÇÚCAR: SURFACTANTES E POLÍMEROS COMO NOVOS MATERIAIS AMBIENTALMENTE SEGUROS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Aprovada em 12/03/2007

Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Elba Pinto da Silva Bon – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Márcia Rodrigues Pereira – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dra. Marta Costa – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Profa. Dra. Rosangela Balaban Garcia - Universidade Federal do Rio Grande do Norte (orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais, pelo eterno apoio.

A minha esposa Marcely e minha filha Manuela, pelo amor e pelas horas de solidão silenciosa, durante esta jornada.

À professora Rosangela Balaban Garcia, minha orientadora, que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho, sacrificando preciosos momentos de lazer. Meu especial agradecimento e admiração.

Ao Doutor Yutaka Tokiwa que me orientou no curso de biotecnologia industrial realizado no Japão em 2002 e me ensinou a dar os primeiros passos nesta área.

Aos amigos Takao Raku, Hong Fan, Amnat Jarerat, Hardaning Pranamuda e Katherine Oliveira pela amizade e pelo auxílio, durante a pesquisa no Japão.

Ao professor Hélder Girão, que viabilizou os ensaios dos produtos em fluido de completação.

Aos integrantes do LAPET/LAPOL que me estenderam a mão nos momentos de dificuldade: Gláucio, Suzan, Telma, Fábio, Ana Catarina, Marta e Michelle.

Aos colegas e professores do PPGCEM pelos momentos de alegria e tormenta, que juntos passamos, na busca deste ideal.

À empresa Reiza Kern, na pessoa de Waleska Marques, pela gentil doação das enzimas da BIOVET J S C utilizadas neste trabalho.

Para minha filha Manuela:

Eu lhe desejo um mundo cheio de luz.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO..... 1

1.1-Generalidades..... 2
1.2-Objetivos..... 5

2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... 6

2.1-Síntese de biomateriais a partir de açúcares..... 7
2.1.1-Ésteres de açúcar como biossurfactantes..... 8
2.1.1.1-Algumas aplicações industriais dos biossurfactantes..... 10
2.1.1.1.1-Cosméticos..... 10
2.1.1.1.2-Medicina..... 11
2.1.1.1.3-Indústria de Alimentos..... 12
2.1.1.1.4-Biorremediação..... 12
2.1.1.1.5-Limpeza de reservatórios de óleo pesado..... 13
2.1.1.1.6-Recuperação melhorada do petróleo (EOR)..... 14
2.1.1.1.7-Agricultura..... 14
2.1.1.1.8-Mineração..... 14
2.1.2-Biopolímeros de açúcar 15
2.2-Concentração Micelar Crítica (CMC) 18
2.3-Balanço Hidrofílico-Lipofílico (HLB) 20
2.4-A seletividade da catálise enzimática 24

3 - ESTADO-DA-ARTE..... 28

3.1-Estratégia para a síntese de ésteres de açúcar..... 29
3.2-Estratégia para a síntese enzimática de ésteres de açúcar 31
3.2.1-O papel dos solventes..... 31
3.2.2-A natureza dos substratos poli-hidroxilados 32
3.2.3-A natureza dos substratos doadores de acilas..... 33
3.2.4-A importância da água..... 33
3.2.5-A escolha da enzima..... 34
3.3-Catálise Enzimática *versus* Catálise Química..... 35
3.4-Catálise enzimática em açúcares e outros polióis..... 35

4 – BIOSSURFACTANTES E BIOPOLÍMEROS DE AÇÚCAR PROPOSTOS..... 49

5 - MATERIAIS E MÉTODOS..... 55

5.1-Obtenção dos ésteres de sacarose, de ácido ascórbico e do polímero de ácido ascórbico – 1ª etapa..... 56
5.1.1-Materiais 56
5.1.2-Equipamentos..... 56
5.1.3-Métodos analíticos..... 56
5.1.4-A influência da concentração de enzima na taxa de conversão dos ésteres de sacarose..... 57
5.1.5-A influência do tamanho da cadeia dos ésteres vinílicos na taxa de

conversão dos ésteres de sacarose..... 58
5.1.6-A influência da adição de água na taxa de conversão dos ésteres de sacarose..... 58
5.1.7-Síntese dos ésteres de sacarose..... 59
5.1.8-Purificação dos ésteres de sacarose e caracterização por ^{13}C-RMN..... 59
5.1.9-Influência da concentração de enzima, da razão água/DMF e da temperatura na síntese do éster vinílico de ácido ascórbico..... 60
5.1.10-Síntese do éster vinílico de ácido ascórbico..... 61
5.1.11-Purificação do éster vinílico de ácido ascórbico e caracterização por ^{13}C-RMN..... 61
5.1.12-Determinação dos valores de HLB..... 61
5.1.13-Polimerização do 6-*O*-(vinil adipoil - ácido ascórbico)..... 62
5.1.14-Determinação da massa molar do poli (6-*O*-(vinil adipoil - ácido ascórbico)) por GPC..... 62
5.2-Obtenção dos ésteres de sacarose, D-glicose, L-arabinose e dos respectivos polímeros – 2ª etapa..... 62
5.2.1-Materiais..... 62
5.2.2-Equipamentos..... 63
5.2.3-Métodos Analíticos..... 63
5.2.4-Otimização das variáveis por DOE (“Design of Experiments”)..... 64
5.2.5-Síntese dos ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1’-*O*-lauroil sacarose..... 66
5.2.6-Purificação dos ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1’-*O*-lauroil sacarose e caracterização por ^{13}C-RMN..... 67
5.2.6.1-Purificação do éster 1’-*O*-lauroil sacarose por coluna cromatográfica..... 67
5.2.6.2-Purificação dos ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1’-*O*-lauroil sacarose por extração em acetona a quente..... 67
5.2.7-Síntese dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1’-*O*-viniladipoil sacarose..... 69
5.2.8-Purificação dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1’-*O*-viniladipoil sacarose e caracterização por ^{13}C-RMN..... 69
5.2.9-Polimerização dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1’-*O*-viniladipoil sacarose..... 70
5.2.10-Caracterização por FTIR dos polímeros poli (5-*O*-viniladipoil L-arabinose), poli (6-*O*-viniladipoil D-glicose), poli (1’-*O*-viniladipoil sacarose) e dos seus monômeros de partida..... 72
5.2.11-Determinação das massas molares por GPC..... 72
5.2.12-Determinação das CMC dos ésteres de açúcar..... 72
5.2.13-Emprego dos ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1’-*O*-lauroil sacarose como lubrificantes em fluidos de completação..... 73

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 75

6.1-Obtenção dos Ésteres de sacarose e de ácido ascórbico – 1ª etapa..... 76
6.1.1-A influência da concentração de enzima na taxa de conversão dos ésteres de sacarose..... 76
6.1.1.1-Caproato de sacarose (x = 4)..... 76
6.1.1.2-Caprilato de sacarose (x = 6)..... 77
6.1.1.3-Caprato de sacarose (x = 8)..... 79
6.1.1.4-Laurato de sacarose (x = 10) 80

6.1.2-A influência do tamanho da cadeia do éster vinílico na taxa de conversão do éster de sacarose..... 81
6.1.3-A influência da adição de água nas taxas de conversão dos ésteres de sacarose..... 82
6.1.4-Síntese dos ésteres de sacarose..... 84
6.1.4.1-Laurato de sacarose (1'-O-lauroil sacarose)..... 84
6.1.4.1.1-Variação da conversão com o tempo nas condições ótimas de síntese do produto..... 84
6.1.4.1.2-Purificação em coluna cromatográfica..... 85
6.1.4.1.3-Identificação da estrutura química e da posição de acilação por ^{13}C-RMN..... 85
6.1.4.2-Caprato de sacarose (1'-*O*-caproil sacarose)..... 88
6.1.4.2.1-Variação da conversão com o tempo nas condições ótimas de síntese do produto..... 88
6.1.4.2.2-Purificação em coluna cromatográfica..... 89
6.1.4.2.3-Identificação da estrutura química e da posição de acilação por ^{13}C-RMN..... 90
6.1.4.3-Caprilato de sacarose (1'-*O*-capriloil sacarose)..... 92
6.1.4.3.1-Variação da conversão com o tempo nas condições ótimas de síntese do produto..... 92
6.1.4.3.2-Purificação em coluna cromatográfica..... 93
6.1.4.3.3-Identificação da estrutura química e da posição de acilação por ^{13}C-RMN..... 94
6.1.5-Determinação dos valores de HLB dos ésteres de sacarose..... 96
6.1.6-A influência dos valores de HLB nas taxas de conv. dos ésteres de sacarose 98
6.1.7-Adipato de ácido ascórbico (6-*O*-diviniladipoil ácido ascórbico)..... 99
6.1.7.1-A influência da concentração de enzima, da razão água/DMF e da temperatura na síntese do adipato de ácido ascórbico..... 99
6.1.7.2-Taxas de conversão na síntese do adipato de ácido ascórbico..... 101
6.1.7.3-Purificação em coluna cromatográfica..... 101
6.1.7.4-Identificação da estrutura química e da posição de acilação por ^{13}C-RMN 102
6.1.7.5-Determinação do valor de HLB para o adipato de ácido ascórbico..... 105
6.1.7.6-Síntese e determinação da massa molar do poli (6-*O*-viniladipoil ácido ascórbico)..... 106
6.2-Obtenção dos Ésteres de sacarose, D-glicose, L-arabinose e dos respectivos polímeros – 2ª etapa..... 107
6.2.1-Otimização das variáveis por DOE..... 107
6.2.1.1-Resultados das taxas de conversão de sacarose em laurato de sacarose 107
6.2.1.2-Valores de R2, Q2, Validade do Modelo e Reprodutibilidade..... 108
6.2.1.3-Resultados experimentais *versus* resultados numéricos..... 109
6.2.1.4-Principais efeitos dos fatores na resposta..... 110
6.2.1.5-Otimização das variáveis independentes..... 112
6.2.2-Síntese dos ésteres laurato de L-arabinose, laurato de D-glicose e laurato de sacarose..... 119
6.2.3-Purificação dos ésteres laurato de L-arabinose, laurato de D-glicose e laurato de sacarose..... 120
6.2.3.1-Por coluna cromatográfica..... 120
6.2.3.2-Por extração em acetona a quente (50°C)..... 121
6.2.4-Identificação da estrutura química e da posição de acilação por ^{13}C-RMN..... 122
6.2.4.1-Laurato de arabinose..... 122

6.2.4.2-Laurato de D-glicose..... 125
6.2.4.3-Laurato de sacarose..... 128
6.2.5-Síntese dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipolil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose..... 130
6.2.6-Purificação dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipolil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose..... 131
6.2.6.1-Por coluna cromatográfica..... 132
6.2.6.2-Por extração em acetona a quente (50°C)..... 133
6.2.7-Identificação da estrutura química e da posição de acilação por ^{13}C-RMN..... 134
6.2.7.1-Adipato de L-arabinose..... 134
6.2.7.2-Adipato de D-glicose..... 137
6.2.7.3-Adipato de sacarose..... 139
6.2.8-Determinação dos valores de HLB dos ésteres de L-arabinose, D-glicose e sacarose..... 142
6.2.9-Polimerização dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose..... 145
6.2.9.1-Caracterização dos polímeros por FTIR..... 146
6.2.9.2-Determinação das massas molares dos polímeros por GPC..... 148
6.2.10-Determinação da CMC dos ésteres surfactantes..... 152
6.2.10.1-Ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose..... 152
6.2.10.2-Ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose..... 155
6.2.11-Determinação da área ocupada por cada molécula na superfície..... 157
6.2.12-Determinação do parâmetro de empacotamento crítico (CPP)..... 159
6.2.13-Determinação da energia livre de micelização..... 160
6.2.14-Determinação da entropia de micelização..... 160
6.2.15-Emprego dos ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose como lubrificantes em fluidos de completação..... 161

7- CONCLUSÕES..... 165

8- SUGESTÕES..... 169

REFERÊNCIAS..... 171

LISTA DE ABREVIATURAS

ADG	adipato de D-glicose
AIBN	α,α'-Azobis-isobutironitrila
AIST	National Institute of Advanced Ind. Science and Technology
ALA	adipato de L-arabinose
AS	adipato de sacarose
CL	coeficiente de lubricidade
CMC	concentração micelar crítica
CPP	auto-organização estrutural
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO-d_6	dimetil sulfóxido deuterado
DOE	Design of Experiments
DXT	dextrana
EOR	recuperação melhorada de petróleo
ES	complexo enzima-substrato
FTIR	infravermelho com transformada de Fourier
GS	grau de substituição
HLB	balanço hidrofílico-lipofílico
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
lb/ bbl	libras/ barril (2,9 kg/ m^3)
lb/ gal	libras/ galão (120 kg/ m^3)
LDG	laurato de D-glicose
LLA	laurato de L-arabinose
LS	laurato de sacarose
PD	polidispersão
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	parte por milhão
rpm	rotações por minuto
RSM	Response Surface Methodology
TLC	cromatografia de camada delgada
VA	acrilato de vinila
^{13}C-RMN	ressonância magnética nuclear do carbono 13

LISTA DE SÍMBOLOS

a	área ocupada por molécula na superfície
A/O	emulsificante água em óleo
AG	razão água/DMF
E	concentração de enzima
l_c	comprimento médio da cadeia alquílica
M	massa molar total
M	molar
m/m	massa/massa
$\mathbf{M_h}$	a massa molar da parte hidrofílica
MM	massa molar
M_n	massa molar numérica média
M_w	massa molar ponderal média
$\boldsymbol{n}$	número de carbonos na cadeia carbônica.
N_A	número de Avogadro.
O/A	emulsificante óleo em água
P	coeficiente de partição de um solvente
Q2	%de variação das respostas obtidas numericamente
R	constante dos gases ideais
R2	% da variação da resposta gerada pelo modelo
RCO-	grupo acila
TBA	álcool *t*-butílico
TE	temperatura
TPO	tempo
v/v	volume/volume
VC	vitamina C
XM	razão molar composto vinílico/sacarose
Y	conversão
β_0	coeficiente linear
β_i	coeficientes de primeira ordem
β_{ii}	coeficientes quadráticos para as i-ésimas variáveis
β_{ij}	coeficientes para as interações das variáveis i e j
γ_{CMC}	tensão superficial crítica
ΔG_m	energia livre de micelização
ΔH_m	entalpia de micelização
ΔS_m	entropia de micelização
η (%)	rendimento
ν	volume ocupado pela cadeia alquílica
Γ	excesso de superfície

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Diferenças estruturais básicas entre hidrocarbonetos de origem fóssil e os carboidratos oriundos de biomassa..... 3

Figura 2-Produção mundial de carboidratos em relação à biomassa total produzida. Fonte: Lichtender (2004)..... 4

Figura 3-Histórico e perspectivas futuras do emprego de biomassa, carvão e petróleo..... 5

Figura 4-Elemento de volume de água de superfície, mostrando a saturação de moléculas de surfactante..... 19

Figura 5-(a) micela esférica, onde a água está dispersa no óleo; (b) microemulsão bicontínua com volumes de óleo e água similares; (c) micela esférica, onde o óleo está disperso na água..... 19

Figura 6-Gráfico Tensão Superficial *versus* concentração de surfactante, para a determinação da Concentração Micelar Crítica..... 20

Figura 7-Tanque de estocagem de óleo pesado. (a) colocação da solução de surfactante, seguida de agitação vigorosa para remoção do resíduo de fundo; (b) separação das três fases após repouso..... 22

Figura 8-Faixa de valores de HLB de ésteres de sacarose, em comparação com outros surfactantes..... 23

Figura 9-Representação da estrutura de um aminoácido simples..... 25

Figura 10-Representação de uma cadeia peptídica. Resíduos de aminoácidos ligados uns aos outros por ligações amida..... 25

Figura 11-Modelo de catálise enzimática tipo chave/fechadura..... 27

Figura 12-Síntese de ésteres de açúcar com a formação de subprodutos competitivos com o açúcar..... 29

Figura 13-Formação de subprodutos não competitivos com o açúcar..... 30

Figura 14-Tipos de transesterificação..... 30

Figura 15-Fluxograma simplificado da reação químio-enzimática de polímeros..... 36

Figura 16-Representação esquemática de um polímero com açúcar incorporado na cadeia principal..... 37

Figura 17-Reação enzimática de poliéster de sacarose, onde a sacarose foi incorporada na cadeia principal do polímero..... 38

Figura 18-Copolimerização de 6-*O*-viniladipolil D-glicose (VAG) e ésteres de ácidos graxos..... 39

Figura 19-Esterificação enzimática de acrilato de vinila (VA), para formação do éster de inulina..... 40

Figura 20-Reação químio-enzimática para obter poli (1'-*O*-viniladipoil sacarose) a partir de sacarose e adipato de vinila..... 41

Figura 21-Transestereficação do adipato de vinila com lactose para a obtenção do polímero poli (6'-*O*-viniladipoil lactose)..... 42

Figura 22-Esterificação enzimática de ésteres de trehalose, a partir de ésteres de ácido graxos..... 42

Figura 23-Esterificação regioseletiva entre a D-glicose, a trehalose e a sacarose com o éster de ácido 10-andecilênico..... 43

Figura 24-Síntese enzimática de ésteres de sacarose, maltose e maltotriose a partir dos respectivos açúcares com laurato de vinila, para uso como agentes anti-placas dentárias..... 45

Figura 25-Conversão de sacarose em isomaltulose, através de catálise enzimática de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 imobilizada em células com diferentes soluções de alginato de sódio..... 46

Figura 26-Síntese enzimática do éster lauroil glicose a partir de uma mistura de glicose e ácido láurico (1:2) em álcool t-butílico (TBA)..... 47

Figura 27-Síntese enzimática de ésteres de ácido kojic, a partir de uma série de ésteres vinílicos: divinil adipato, vinil hexanoato, vinil octanoato e vinil decanoato..... 48

Figura 28-Produtos obtidos na primeira etapa da pesquisa (Japão). (1a) síntese enzimática dos ésteres de sacarose e; (1b) síntese do polímero de ácido ascórbico..... 52

Figura 29-Produtos obtidos na segunda etapa da pesquisa (Brasil). (2a) síntese enzimática dos ésteres de açúcar não polimerizáveis e; (2b) dos ésteres de açúcar polimerizáveis, seguida de catálise química para a obtenção dos polímeros..... 53/54

Figura 30-Metodologia usada para a purificação dos ésteres de açúcar, por extração em acetona a quente..... 69

Figura 31a-Dispositivo para polimerização. Arranjo para a obtenção de atmosfera inerte..... 71

Figura 31b-Dispositivo para polimerização. Arranjo para a catálise química com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)..... 71

Figura 32-(a) Porcentagem de conversão de sacarose em caproato de sacarose e (b) confirmação da obtenção dos produtos por cromatografia em camada delgada – TLC..... 77

Figura 33-(a) Influência da concentração de enzima sobre a conversão de sacarose em caprilato de sacarose e (b) confirmação da obtenção dos produtos por cromatografia em camada delgada – TLC..... 78

Figura 34-(a) Influência da concentração de enzima sobre a conversão de sacarose em caprato de sacarose e (b) confirmação da obtenção dos produtos por cromatografia em camada delgada – TLC..... 79

Figura 35-(a) Influência da concentração de enzima sobre a conversão de sacarose em laurato de sacarose e (b) confirmação da obtenção dos produtos por cromatografia em camada delgada – TLC..... 80

Figura 36- Conversão de sacarose em ésteres de sacarose para diferentes tamanhos de cadeia carbônica dos ésteres vinílicos: x=4 (caproato de vinila); x=6 (caprilato de vinila); x=8 (caprato de vinila) e x=10 (laurato de vinila)..... 81

Figura 37-(a) Conversão de sacarose em laurato de sacarose em função da adição de água, para 5mg/mL de enzima e (b) confirmação da obtenção dos produtos por análises qualitativas em TLC..... 83

Figura 38-(a) Conversão de sacarose em laurato de sacarose em função da adição de água, para 40mg/mL de enzima e (b) confirmação da obtenção dos produtos por análises qualitativas em TLC..... 83

Figura 39-Conversão do laurato de sacarose nas condições ótimas de síntese..... 84

Figura 40-Análise em TLC do laurato de sacarose, após separação e purificação em coluna cromatográfica..... 85

Figura 41-(A) Espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e (B) do laurato de sacarose..... 87

Figura 42-Conversão com o tempo do caprato de sacarose nas condições ótimas de síntese..... 89

Figura 43-Análise em TLC do caprato de sacarose, após separação e purificação em coluna cromatográfica..... 89

Figura 44-(A) Espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e (B) do caprato de

sacarose..... 91

Figura 45-Variação da conversão com o tempo para o caprilato de sacarose nas condições ótimas de síntese..... 93

Figura 46-Análise em TLC do caprilato de sacarose, após separação e purificação em coluna cromatográfica..... 93

Figura 47-(A) Espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e (B) do caprilato de sacarose..... 95

Figura 48-Fórmulas estruturais e valores de HLB dos ésteres de sacarose de acordo com a equação de Griffin..... 97

Figura 49-Influência dos valores de HLB nas conversões dos ésteres de sacarose..... 98

Figura 50(a)-Resultados das análises, por TLC, da síntese do adipato de ácido ascórbico sem a adição de enzima, para várias razões de água/ DMF..... 100

Figura 50(b)-Resultados das análises, por TLC, da síntese do adipato de ácido ascórbico, com a adição de enzima, para várias razões de água/DMF..... 100

Figura 51-Variação da conversão com o tempo na síntese do adipato de ácido ascórbico, a 60°C, 160 rpm, 24 horas, na ausência de enzima..... 101

Figura 52-Análise em TLC da coluna cromatográfica para a separação e purificação do adipato de ácido ascórbico..... 102

Figura 53-Espectro de ^{13}C-RMN do ácido ascórbico (A) e do adipato de ácido ascórbico (B)..... 104

Figura 54-Estrutura química e valor de HLB, de acordo com a equação de Griffin (Equação 2), para o adipato de ácido ascórbico sintetizado..... 105

Figura 55-Cromatograma, curva de calibração e os valores de massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e da Polidispersão (PD) obtidos para o polímero de ácido ascórbico..... 106

Figura 56-Resumo dos parâmetros para a validade do modelo na otimização de variáveis para a síntese do laurato de sacarose..... 109

Figura 57-Comparação entre os resultados experimentais e os resultados numéricos..... 110

Figura 58-Influência e efeito dos fatores reacionais na transesterificação enzimática de sacarose em laurato de sacarose..... 111

Figura 59-Previsão da conversão de sacarose em laurato de sacarose gerada através de análise fatorial por RSM. Efeito da concentração de enzima e tempo de reação..... 113

Figura 60-Previsão da conversão de sacarose em laurato de sacarose gerada, através de análise fatorial por RSM. Efeito da razão molar dos substratos e do tempo de reação..... 114

Figura 61-Previsão da conversão de sacarose em laurato de sacarose gerada, através de análise fatorial por RSM. Efeito da adição de água e do tempo de reação..... 115

Figura 62-Previsão da conversão de sacarose em laurato de sacarose gerada através de análise fatorial por RSM. Efeito da temperatura e do tempo de reação..... 117

Figura 63-Influência das variáveis reacionais: concentração de enzima, tempo, razão molar laurato de vinila/ sacarose e razão água/DMF na conversão de sacarose em laurato de sacarose..... 118

Figura 64-Análises em TLC das amostras brutas de laurato de L-arabinose (A'), de laurato de D-glicose (G') e de laurato de sacarose (S'). 119

Figura 65-Análise por TLC do produto de síntese do laurato de sacarose evidenciando a separação das fases na coluna cromatográfica..... 120

Figura 66-(a)Análises em TLC das amostras de laurato de L-arabinose, (b) laurato de D-glicose e (c) laurato de sacarose, purificadas por extração com acetona a quente..... 121

Figura 67-(A) Espectros de ^{13}C-RMN da L-arabinose e (B) do laurato de L-arabinose 123

Figura 68-(A) Espectros de ^{13}C-RMN da D-glicose e (B) do laurato de D-glicose..... 126

Figura 69-(A) Espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e (B) do laurato de sacarose, obtido na 2ª etapa..... 128

Figura 70-Análises em TLC das amostras brutas dos ésteres adipato de L-arabinose, adipato de D-glicose e adipato de sacarose..... 131

Figura 71-Análise por TLC para o adipato de L-arabinose, evidenciando as fases separadas pela coluna cromatográfica..... 132

Figura 72-Análise por TLC para o adipato de sacarose, evidenciando as fases separadas pela coluna cromatográfica..... 133

Figura 73-Análise por TLC para o adipato de D-glicose, após purificação por extração em acetona a quente (50°C)..... 133

Figura 74-(A) Espectros de ^{13}C-RMN da L-arabinose e (B) do adipato de L-arabinose..... 135

Figura 75-(A) Espectros de ^{13}C-RMN da D-glicose e (B) do adipato de D-glicose..... 138

Figura 76-(A) Espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e (B) do adipato de sacarose..... 141

Figura 77-Fórmula estrutural e valores de HLB dos derivados dos ácidos láurico e adípico..... 143

Figura 78-Características visuais do poli (5-*O*-viniladipoil L-arabinose) ao final da reação de polimerização..... 145

Figura 79-Espectros, na região do infravermelho, do monômero 5-*O*-viniladipoil L-arabinose e do polímero poli(5-*O*-viniladipoil L-arabinose).... 146

Figura 80-Espectros, na região do infravermelho, do monômero 6-*O*-viniladipoil D-glicose e do polímero poli(6-*O*-viniladipoil D-glicose)..... 147

Figura 81-Espectros, na região do infravermelho, do monômero 1'-*O*-viniladipoil sacarose e do polímero poli(1'-*O*-viniladipoil sacarose)..... 147

Figura 82-Curva de calibração dos padrões de dextrana, processada pelo sistema GALAXIE GPC (Varian Inc, USA)..... 148

Figura 83-Cromatograma relativo ao poli (5-*O*-viniladipoil L-arabinose) e os valores das massas molares e polidispersão (PD)..... 149

Figura 84-Cromatograma relativo ao poli (6-*O*-viniladipoil D-glicose) e os valores das massas molares e polidispersão (PD)..... 149

Figura 85-Cromatograma relativo ao poli (1'-*O*-viniladipoil sacarose) e os valores das massas molares e polidispersão (PD)..... 150

Figura 86-Curvas de tensão superficial *versus* concentração para os ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose..... 152

Figura 87-Curvas de tensão superficial *versus* concentração dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose, sem escala logarítmica..... 156

Figura 88-Coeficientes de lubricidade (C.L.) das diversas formulações de lubrificantes testadas..... 164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Valores de HLB e potenciais aplicações..... 21

Tabela 2-Fatores e seus limites no modelo fatorial..... 66

Tabela 3-Quantidade dos monômeros e demais reagentes empregados na polimerização dos ésteres de açúcar..... 70

Tabela 4-Formulação e concentração dos lubrificantes analisados..... 74

Tabela 5-Valores de HLB dos ésteres de sacarose, obtidos pela Equação de Griffin, com propriedades surfactantes..... 88

Tabela 6-Mudanças nos deslocamentos químicos entre sacarose e o éster laurato de sacarose..... 92

Tabela 7-Mudanças nos deslocamentos químicos entre sacarose e o éster caprato de sacarose..... 96

Tabela 8-Mudanças nos deslocamentos químicos entre sacarose e o éster caprilato de sacarose..... 98

Tabela 9-Mudanças nos deslocamentos químicos entre o ácido ascórbico e o adipato de ácido ascórbico..... 105

Tabela 10-Matriz de experimentos gerada pelo sistema para a análise dos cinco fatores..... 108

Tabela 11-Seqüência de iterações com três diferentes condições ótimas para conversões superiores a 97%..... 118

Tabela 12-Massa dos produtos brutos, das fases purificadas e as relações percentuais das massas, após as purificações para os ésteres: laurato de L-arabinose (LLA), laurato de D-glicose (LDG) e laurato de sacarose (LS)..... 122

Tabela 13-Deslocamentos químicos entre a L-arabinose e o laurato de L-arabinose e a posição de acilação (C5)..... 125

Tabela 14-Mudanças químicas entre a D-glicose e o laurato de D-glicose e a posição de acilação (C6)..... 127

Tabela 15-Deslocamentos químicos para a sacarose e o laurato de sacarose e a posição de acilação (C1'), obtidos na 2ª etapa..... 130

Tabela 16-Resumo dos resultados obtidos na purificação do adipato de L-arabinose (ALA), adipato de D-glicose (ADG) e adipato de sacarose

(AS)..... 134

Tabela 17-Deslocamentos químicos para a L-arabinose e o adipato de L-arabinose e a posição de acilação (C5)..... 136

Tabela 18-Deslocamentos químicos entre a D-glicose e o adipato de D-glicose e a posição de acilação (C6)..... 139

Tabela 19-Deslocamentos químicos da sacarose e do adipato de sacarose e evidências da posição de acilação (C1')..... 142

Tabela 20-Valores de HLB dos ésteres laurato de L-arabinose, laurato de D-glicose, laurato de sacarose, adipato de L-arabinose, adipato de D-glicose e adipato de sacarose..... 144

Tabela 21- Condições reacionais e valores da conversão em % dos monômeros 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose nos respectivos polímeros..... 145

Tabela 22-M_n, M_w e PD dos polímeros poli (5-*O*-viniladipoil L-arabinose), poli (6-*O*-viniladipoil D-glicose) e poli (1'-*O*-viniladipoil sacarose)..... 150

Tabela 23-Propriedades dos surfactantes: laurato de L-arabinise, laurato de D-glicose, laurato de sacarose, adipato de L-arabinose, adipato de D-glicose e adipato de sacarose, a 20°C..... 158

Tabela 24-Formulação dos 16 lubrificantes analisados, os coeficientes de lubricidade medidos e as concentrações dos lubrificantes..... 162

RESUMO

Ésteres de açúcar são compostos que possuem ação surfactante, antifúngica e bactericida e podem ser obtidos a partir de duas fontes renováveis de matéria-prima: açúcares e óleos vegetais. Sua capacidade de se biodegradar, aliada ao fato de serem atóxicos, insípidos, inodoros, biocompatíveis, não-iônicos, digestíveis e resistirem a condições severas de temperatura, pH e salinidade, explicam o crescente emprego destas substâncias em diversos setores da indústria. O objetivo desta tese foi sintetizar e caracterizar surfactantes e polímeros, contendo açúcares ramificados em suas estruturas, através de transesterificação enzimática de ésteres vinílicos com açúcares, empregando-se protease alcalina de *Bacillus subtilis* como catalisador, em meio orgânico (DMF). Foram empregados três tipos de açúcares: L-arabinose, D-glicose e sacarose e dois tipos de ésteres vinílicos: laurato de vinila e adipato de vinila. Para a obtenção de altas conversões de substratos em produtos, visando uma futura produção em larga escala, uma série de variáveis foram otimizadas, através de análise estatística experimental (DOE), por metodologia de resposta de superfície (RSM). As variáveis investigadas foram: (1) a concentração de enzima; (2) a razão molar entre substratos; (3) a razão água/solvente orgânico; (4) a temperatura e (5) o tempo. Foram obtidos seis ésteres de açúcar: 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose, 1'-*O*-lauroil sacarose, 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose, sendo os três últimos polimerizáveis. O progresso da reação foi monitorado por análise em HPLC, através do decréscimo da concentração de açúcar em relação ao branco. Análises qualitativas, por TLC, confirmaram a formação dos produtos. Foram obtidas conversões superiores a 98% na síntese do laurato de sacarose. Na purificação, foram adotadas duas metodologias: (1) coluna cromatográfica e (2) extração com acetona a quente. A posição de acilação e a estrutura química foram determinadas por ^{13}C-RMN. A polimerização dos três ésteres de açúcar foi possível, através de catálise química, empregando-se H_2O_2 e $K_2S_2O_8$ como iniciadores, a 60°C, por 24 horas. Espectros de IR dos polímeros foram comparados com os seus monômeros, revelando o desaparecimento do grupo vinil. As massas molares dos polímeros foram determinadas por GPC. Os polímeros de açúcar obtidos apresentaram as seguintes massas molares: poli (5-*O*-viniladipoil L-arabinose): M_w = 7,2 x 10^4; PD = 2,48; poli (6-*O*-viniladipoil D-glicose): M_w = 2,7 x 10^3; PD = 1,75 e poli (1'-*O*-viniladipoil sacarose): M_w = 4,2 x 10^4; PD = 6,57. Os seis ésteres de açúcar foram submetidos a ensaios de tensão superficial para a determinação das concentrações micelares críticas (CMC), que variaram de 122 a 167 ppm. Por fim, um estudo de aplicabilidade dos ésteres não polimerizáveis, como lubrificantes para fluidos de completação de poços de petróleo foi realizado, através de análise comparativa da eficiência destes, em relação a três lubrificantes comerciais. Os produtos sintetizados nesta tese apresentaram desempenho equivalente ou superior aos produtos comerciais testados.

Palavras-chave: síntese enzimática, biossurfactantes, biopolímeros, ésteres de açúcar, polímeros de açúcar

ABSTRACT

Sugar esters are substances which possess surfactant, antifungical and bactericidal actions and can be obtained through two renewable sources of raw materials: sugars and vegetable oils. Their excellent biodegradability, allied to the fact that they are non toxic, insipid, inodorous, biocompatible, no-ionic, digestible and because they can resist to adverse conditions of temperature, pH and salinity, explain the crescent use of these substances in several sections of the industry. The objective of this thesis was to synthesize and characterize surfactants and polymers containing sugar branched in their structures, through enzymatic transesterification of vinyl esters and sugars, using alkaline protease from *Bacillus subtilis* as catalyst, in organic medium (DMF).Three types of sugars were used: L-arabinose, D-glucose and sucrose and two types of vinyl esters: vinyl laurate and vinyl adipate. Aiming to reach high conversions from substrates to products for a possible future large scale industrial production, a serie of variables was optimized, through Design of Experiments (DOE), using Response Surface Methodology (RSM).The investigated variables were: (1) enzyme concentration; (2) molar reason of substrates; (3) water/solvent rate; (4) temperature and (5) time. We obtained six distinct sugar esters: 5-*O*-lauroyl L-arabinose, 6-*O*-lauroyl D-glucose, 1'-*O*-lauroyl sucrose, 5-*O*-vinyladipoyl L-arabinose, 6-*O*-vinyladipoyl D-glucose and 1'-*O*-vinyladipoyl sucrose, being the last three polymerizable. The progress of the reaction was monitored by HPLC analysis, through the decrease of sugar concentration in comparison to the blank. Qualitative analysis by TLC confirmed the formation of the products. In the purification step, two methodologies were adopted: (1) chromatographic column and (2) extraction with hot acetone. The acylation position and the chemical structure were determined by ^{13}C-RMN. The polymerization of the three vinyl sugar esters was possible, through chemical catalysis, using H_2O_2 and $K_2S_2O_8$ as initiators, at 60°C, for 24 hours. IR spectra of the monomers and respective polymers were compared revealing the disappearance of the vinyl group in the polymer spectra. The molar weights of the polymers were determined by GPC and presented the following results: poly (5-*O*-vinyladipoyl L-arabinose): Mw = 7.2 x 10^4; PD = 2.48; poly (6-*O*-vinyladipoyl D-glucose): Mw = 2.7 x 10^3; PD = 1.75 and poly (1'-*O*-vinyladipoyl sucrose): Mw = 4.2 x 10^4; PD = 6.57. The six sugar esters were submitted to superficial tension tests for determination of the critical micelle concentrations (CMC), which varied from 122 to 167 ppm. Finally, a study of applicability of these sugar esters, as lubricants for completion fluids of petroleum wells was accomplished through comparative analysis of the efficiency of these sugar esters, in relation to three commercial lubricants. The products synthesized in this thesis presented equivalent or superior action to the tested commercial products.

Keywords: enzymatic synthesis, biosurfactants, biopolymers, sugar esters, sugar polymers

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de açúcar-de-cana do mundo com mais de 29 milhões de toneladas processadas em 2006 (SEVERO, 2006). Este fato torna a sacarose uma matéria-prima de baixo custo, quando comparada ao custo de outros países produtores. Conseqüentemente, o Brasil tem condições muito favoráveis de produzir materiais biodegradáveis derivados de açúcar em escala industrial. Além da possibilidade de obtenção destes materiais a baixo custo, o uso de biomassa como matéria-prima e o emprego de processos naturais (enzimas) na síntese de novos produtos estão coerentes com os termos da *The Pollution Prevention Act* (1990). Em paralelo, os insumos fósseis, que são a matéria-prima básica da indústria química, apresentam um estoque finito e não são renováveis. Estes fatos têm incentivado pesquisadores a direcionar esforços no sentido de encontrar alternativas de suprimento de matéria-prima abundante e que seja renovável. O emprego de biomassa vem surgindo como a melhor alternativa. Do ponto de vista energético, biomassa é todo recurso renovável oriundo de matéria orgânica (de origem vegetal ou animal) que pode ser utilizada na produção de energia (ANEEL, 2007).

Outro fator importante a se considerar na fabricação de bioprodutos são os processos enzimáticos. Estes apresentam uma série de vantagens em comparação aos métodos químicos convencionais, que geralmente empregam altas temperaturas na presença de catalisadores alcalinos, alto consumo de energia, baixa biodegradabilidade e baixa seletividade dos produtos, limitando suas aplicações, onde excelentes propriedades toxicológicas são desejadas, como nas indústrias de cosméticos, de alimentos e farmacêutica (YAN, 2001). As principais vantagens do uso da catálise enzimática incluem condições reacionais brandas, como pressão atmosférica e temperatura ambiente, alta seletividade e baixa toxicidade (PARK, 2000).

Até o final do século passado, as vendas de bioprodutos foram da ordem de US$ 500 bilhões, sendo que, somente em 1992, foram mais de US$ 1,7 bilhões, com uma taxa de crescimento em torno de 3 a 5% ao ano (DESAI, 1997). No entanto, ainda tem sido difícil competir, economicamente, com os produtos derivados do petróleo. A transição do processamento químico de matéria-prima fóssil para a biomassa esbarra em dois fortes obstáculos: (1) no momento, o insumo fóssil é mais econômico do que a biomassa; (2) a tecnologia disponível para a conversão da matéria-prima de origem fóssil em produtos químicos orgânicos está altamente desenvolvida e difere muito da tecnologia necessária para a transformação da biomassa em produtos para aplicação industrial. Em outras palavras, seria muito dispendiosa a reestruturação das indústrias químicas em operação. Esta situação ocorre devido às diferentes estruturas moleculares inerentes aos dois tipos de matérias-primas. Enquanto os produtos orgânicos de origem fóssil são constituídos de hidrocarbonetos livres de oxigênio e de grupos funcionais, com comportamento hidrofóbico, os carboidratos são compostos mais complexos para a transformação em outros produtos químicos orgânicos, porque são multifuncionalizados com grupos hidroxila, apresentando comportamento hidrofílico (LICHTENTHALER, 2004). A Figura 1 ilustra as diferenças básicas entre estas fontes de matéria orgânica.

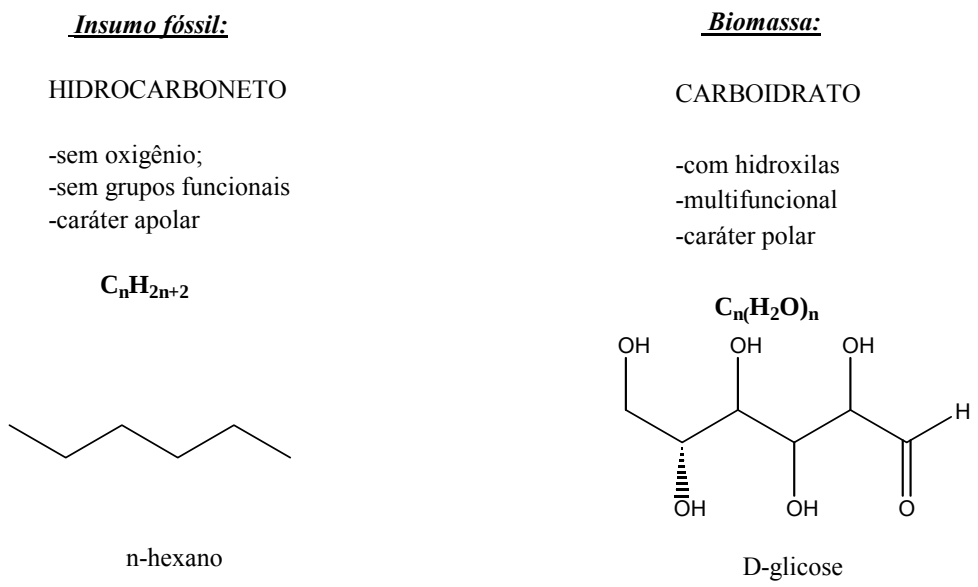


Figura 1: Diferenças estruturais básicas entre hidrocarbonetos de origem fóssil e os carboidratos oriundos de biomassa.

Sem dúvida, a classe mais importante de compostos orgânicos, em termos de volume produzido, é a dos carboidratos, representando em torno de 75% das 200 bilhões de toneladas de biomassa produzidas anualmente, das quais, somente, 4% são processadas pelo homem. O restante decai e recicla ao longo da cadeia natural (LICHTENTHALER, 2004). A Figura 2 apresenta as frações da biomassa produzidas anualmente no mundo.

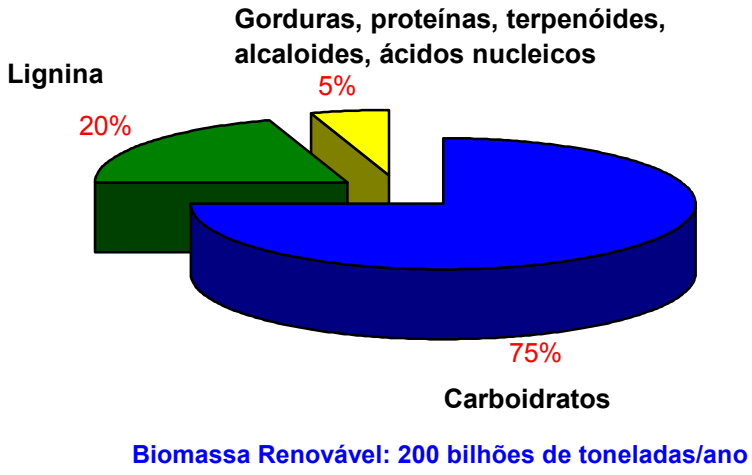


Figura 2: Produção mundial de carboidratos em relação à biomassa total produzida. Fonte: Lichtenthaler (2004)

Assim, os carboidratos são os compostos que reúnem as condições ideais para viabilizar o desenvolvimento industrial e econômico de produtos orgânicos de biomassa em substituição aos produtos de origem petroquímica.

Esta mudança já começou a dar os primeiros passos, devido a alguns fatores: (1) escassez de matérias-primas não renováveis; (2) aumento das tarifas energéticas; (3) endurecimento da legislação ambiental e (4) maior esclarecimento por parte dos consumidores em relação às práticas industriais (ANASTAS, 2001).

Especialistas calculam que até o ano 2040, a biomassa será uma matéria-prima de menor custo que os hidrocarbonetos de origem fóssil

(CAMPBELL, 1998). A Figura 3 ilustra o histórico e as perspectivas futuras do consumo de biomassa, de carvão e de petróleo (LICHTENTHALER, 2004).

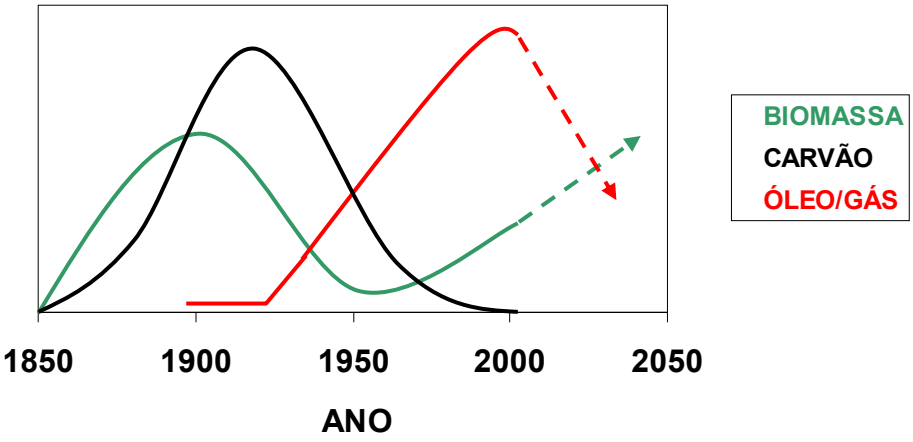


Figura 3: Histórico e perspectivas futuras do emprego de biomassa, carvão e petróleo. Fonte: Lichtenthaler (2004)

Ironicamente, o maior mercado consumidor de produtos da biomassa é a indústria petrolífera, principalmente biossurfactantes, que são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (VAN DYKE, 1991). Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos (REHM, 1996), remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem (BOGNOLO, 1999) e a recuperação melhorada de petróleo - EOR (JENNEMAN, 1983).

1.2 - Objetivos

A pesquisa teve como objetivos: (1) sintetizar ésteres de polióis (açúcares e ácido ascórbico) obtidos por transesterificação enzimática, empregando-se protease alcalina de *Bacillus subtilis*, em meio orgânico (DMF); otimizar as condições reacionais e caracterizar os produtos obtidos; (2) polimerizar, por catálise química, os ésteres vinílicos obtidos na etapa anterior e determinar suas massas molares por GPC; (3) determinar as concentrações micelares críticas e respectivas tensões superficiais dos ésteres obtidos; (4) avaliar a eficiência de alguns destes ésteres de açúcar, como aditivos em fluidos de completação para a indústria do petróleo.

CAPÍTULO 2
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 - Síntese de biomateriais a partir de açúcares

Dentre todos os compostos orgânicos, a sacarose é o que mais é produzido na forma pura (MORRISON, 1973). Por este fato, o texto fará maior referência aos ésteres de sacarose, como representantes dos ésteres de outros açúcares, por ocuparem um lugar de destaque, devido à multiplicidade de aplicações (MACINDOE, 1996). Estes compostos são normalmente empregados como surfactantes não-iônicos (CRUCES, 1992).

Um indicador do potencial tecnológico da sacarose como substrato é o elevado número de patentes de aplicações somente para os ésteres de sacarose, contrastando com os poucos artigos científicos publicados sobre o tema (GARTI, 2000). Estimativas feitas na década de 80 indicaram que somente cerca de 0,1% da sacarose refinada, produzida mundialmente, foi empregada como insumo químico na indústria de transformação (PARKER, 1981).

A complexidade dos produtos que podem ser obtidos em um único meio reacional, tendo a sacarose como reagente, é considerável. Teoricamente, com o grau de substituição variando de um a oito e todas as possibilidades de combinação dos regioisômeros, o número de compostos que podem ser obtidos por substituições na sacarose, a partir de um único reagente, pode chegar a 255 (BOSCOLO, 2003), de acordo com a Equação 1,

$$i = \sum_{m=1}^{8} \frac{8!}{m!(8-m)!} \qquad (1)$$

onde *i* é o número total de compostos possíveis e *m* o grau de substituição.

2.1.1 - Ésteres de açúcar como biossurfactantes

Os ésteres de açúcar têm atraído um grande interesse por parte dos pesquisadores da área biotecnológica, porque estes produtos são obtidos a partir de duas matérias-primas de origem vegetal, abundantes e renováveis: açúcares e óleos/ gorduras (ADELHORST, 1990; OGINO, 1996; ARCOS, 1998). Uma outra vantagem da utilização de açúcares, baseia-se no fato de os carboidratos serem polióis (compostos poli hidroxilados). Assim, processos enzimáticos, altamente regioseletivos, são os mais indicados para a transformação destas substâncias e representam uma importante vantagem sobre os processos químicos convencionais de baixa seletividade (CAMEOTRA, 1998; BOUSQUET, 1999).

O grau de substituição (GS) nestes polióis é definido como o número de grupos hidroxila esterificados com os doadores de acila (RCO—). Por exemplo, a D-glicose possui cinco grupos hidroxila livres. Ésteres de D-glicose com 1<DS<3 são altamente hidrofílicos, digestíveis, absorvíveis e são usados como agentes de estabilização, emulsificantes, dispersantes, agentes antimicrobianos e como coberturas protetoras para o acondicionamento de frutas (BAUCHOT, 1995). Se DS>4, os ésteres são lipofílicos, não-digestíveis, não-absorvíveis e com propriedades físico-químicas similares aos óleos e gorduras convencionais, sendo referenciados, comercialmente, como gorduras substitutas de baixa caloria (ZUNFT, 1997).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). Por isso, as moléculas dos surfactantes são chamadas de anfifílicas (do grego: *philos* = forte afinidade) (ROCHA, 1999). Os grupos hidrofílicos, constituintes das “cabeças” dos surfactantes, são polares e, no caso dos ésteres de açúcar, neutros. Os grupos hidrofóbicos, identificados como as “caudas” dos surfactantes, são apolares e, em geral, constituídos por hidrocarbonetos de cadeias alifáticas, grupos aromáticos ou policíclicos.

As propriedades mais interessantes dos surfactantes são os fenômenos ativos de modificação de superfícies, como: diminuição das tensões superficiais e interfaciais; molhabilidade; penetrabilidade; difusão; hidrofilicidade e hidrofobicidade; emulsificação; detergência; formação de gel; formação de espuma; floculação; atividade seqüestrante de metais e ações antimicrobianas (REHM, 1996). O emprego de biossurfactantes apresenta inúmeras vantagens em relação aos produtos similares sintetizados quimicamente: biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade e digestibilidade, permitindo o seu uso em cosméticos, fármacos, alimentos, biorremediação de solo contaminado e, ainda, são eficientes em condições "severas" de temperatura, pH e salinidade.

Microemulsões baseadas em surfactantes não-iônicos foram extensivamente investigadas, tanto do ponto de vista das formulações, como das estruturas moleculares. Em quase todos os casos, os surfactantes não-iônicos estudados eram surfactantes etoxilatos, a partir de álcoois, ácidos graxos, gorduras, monoglicerídeos e ésteres de sorbitan (LADHE, 2006; JAN, 2004; KUMIKO, 2002; PETROVIC, 2001; AMERI, 1997; ADAMS, 1996; MALLON, 1994). Entretanto, somente um número limitado de trabalhos foi publicado sobre surfactantes não-iônicos de polióis, como ésteres de sacarose e de glicose (GLATTER, 2001). Ao contrário dos compostos etóxi-alquílicos, os ésteres de sacarose não alteram, significativamente, os seus valores de HLB em função das variações de temperatura, não induzindo, assim, a uma inversão de fases na microemulsão. Estudos do desempenho de microemulsões com ésteres de sacarose são descritos na literatura (PES, 1996; ARAMAKI, 1997).

Na produção industrial dos biossurfactantes, o preço dos hidrocarbonetos e dos carboidratos deve ser levado em conta. Kosaric et al. (1984), visando reduzir os custos, propôs uma estratégia que utiliza esgoto municipal como substrato para a produção de biossurfactantes. Nesse processo, biomassa de *Torulopsis bombicola* pode ser reciclada ou separada e vendida como suplemento de levedura. Os gases produzidos (CO_2 e CH_4) podem ser aproveitados, gerando quatro produtos ao final do processo: água

tratada, biomassa, biossurfactante e gás rico em metano. O benefício paralelo é o aproveitamento da inconveniente lama do esgoto municipal, contribuindo para minimizar o impacto ao meio ambiente.

2.1.1.1 – Algumas aplicações industriais dos biossurfactantes

A seguir estão descritas, com mais detalhes, as principais aplicações industriais dos biossurfactantes.

2.1.1.1.1 - Cosméticos

Os biossurfactantes, de acordo com a sua estrutura química e propriedades, são utilizados na indústria de cosméticos com diferentes funções, tais como emulsificantes, espumantes, hidratantes e agentes antimicrobianos, em cremes, loções, pastas, géis, repelentes, anticaspas, desodorantes, tintas de cabelo, sombras para olhos, batons, máscaras faciais, anti-sépticos, sabonetes, dentifrícios, xampus, condicionadores, lubrificantes e produtos de depilação (KOSARIC, 1996).

Os surfactantes mais empregados em emulsões na indústria de cosméticos são: (1) Lanolina e seus derivados: Também conhecida como gordura de lã, apresenta algumas similaridades com o sebo humano. Ao contrário da maioria dos lipídios de origem animal, a lanolina não contém triglicerídeos. Seus principais constituintes são ésteres de ácidos graxos. (2) Etoxilatos não-iônicos: A princípio, qualquer composto com grupo hidroxila pode dar origem a surfactantes etoxilatos, pela reação com o óxido de etileno. A maioria é freqüentemente usada para se criar “novos materiais”. Como exemplo destes compostos, temos os derivados de açúcares, ácidos graxos e álcoois graxos. Em geral, são insensíveis a variações de pH e não são afetados por altas concentrações de sal. (3) Ésteres de sacarose: São materiais não-iônicos e mais vantajosos que os etoxilatos, pois sua síntese não produz dioxanas (carcinogênico). São obtidos pela esterificação de grupos hidroxila de açúcares com ácidos graxos, principalmente, ácido esteárico e láurico. A principal virtude do éster de sacarose é a sua ação delicada na pele.

Por ser uma molécula não-iônica, ela interage fracamente ou nada com as proteínas, não irritando e nem sensibilizando os tecidos. Ainda existem muitos outros como: ésteres de ácido ortofosfórico, ésteres de glicerina, amino óxidos, silicones, copolímeros em bloco, monoacilglicerídeos, fosfolipídios e outros ésteres de açúcar (KOSARIC, 1996).

2.1.1.1.2 - Medicina

Davis et al. (1985) e Schurch et al. (1993) apresentaram uma revisão com algumas aplicações para os biossurfactantes na medicina e farmácia. Emulsão Parenteral - São emulsões injetáveis usadas para permitir transporte de materiais lipossolúveis. Tanto emulsões óleo/água (O/A), como água/óleo (A/O) são usadas. Mas as formas mais complexas são as emulsões múltiplas (A/O/A) e (O/A/O), contendo microesferas sólidas dispersas. Por exemplo, emulsões A/O podem ser usadas em liberações controladas de drogas, por administração intramuscular. Por outro lado, emulsões O/A podem ser empregadas como carreadoras de drogas, por via intravenosa. Emulsões Perfluoroquímicas - Apresentam habilidade de dissolver grandes quantidades de O_2 e CO_2. Clarck e Gollan (1966) mostraram que ratos sobrevivem completamente submersos em emulsões perfluoroquímicas (respiração líquida). Geyer (1974) empregou tais emulsões como sangue artificial. As principais vantagens do uso de sangue artificial são: (1) boa estabilidade em procedimentos cirúrgicos; (2) não há incompatibilidade de grupos sangüíneos; (3) não há risco de infecção por hepatite ou AIDS; (4) fácil acessibilidade e alto tempo de armazenamento. Adjuvantes de Vacinas - São emulsões que ajudam a aumentar a eficácia de vacinas. Os antigens virais ou bactérias podem melhorar a resposta dos anticorpos. Os ésteres derivados de lauril, octil, e oleil apresentaram eficiência como antibióticos para tratamentos de pele (KANO, 1980). Derivados de decanoil apresentaram atividade antitumoral (KOHYA, 1986). Derivados de glicolipídios apresentaram atividades antivirais comprovadas contra *Herpes simplex* tipo I (KAWAI, 1988). Pode-se citar, ainda, o emprego em emulsões orais, emulsões tópicas e surfactantes alveolares.

2.1.1.1.3 - Indústria de Alimentos

Na preparação e processamento de alimentos, os biossurfactantes são empregados como aditivos em pequenas quantidades. Shikata e Yamashita (1986) patentearam um soforolipídio usado como aditivo em farinha de trigo, para conservação de pães. Ohata e Kamata (1986) desenvolveram biossurfactantes com propriedades ativas de superfície para uso em margarinas. Emulsificantes naturais, como os lisofosfolípidios, são empregados para facilitar a digestão de gorduras pelo organismo. É o caso da lisolecitina obtida por transesterificação enzimática, catalisada por fosfolipases ou pela lipase do *Mucor miehei* imobilizada (SARNEY, 1994).

2.1.1.1.4 - Biorremediação

No controle ambiental, os biossurfactantes têm desempenhado um importante papel, quando do acúmulo e persistência de materiais tóxicos na água e no solo. Estes contaminantes são gerados, principalmente, por indústrias petroquímicas e de celulose. A princípio são formados por compostos aromáticos e/ou clorados, que são tóxicos e de difícil biodegradação. Comparando-se a biorremediação com outras tecnologias para a remediação, em termos de custo por tonelada de solo, a primeira fica em vantagem absoluta - biorremediação: $15 a 70; estabilização: $100 a 200; incineração: $140 a 150; aterro: $140 a 200. A remoção de hidrocarbonetos de solo contaminado tem sido tema de investigação por numerosos pesquisadores (REHM, 1996; KITAMOTO, 2002; KELKAR, 2006).

Em relação ao seu emprego em derramamento de óleo, os biossurfactantes são usados por aumentarem a interação superficial água/óleo (A/O), acelerando a degradação pela ação de microorganismos, promovendo a biorremediação de águas e solos. Esta degradação ocorre pela capacidade emulsificadora e dispersante dos hidrocarbonetos na água. Biossurfactantes produzidos por *Arthrobacter, Pseudomonas, Corynebacterium* e *Bacillus subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piche em areias contaminadas (BOGNOLO, 1999).

Uma vez que os microorganismos degradadores estão presentes em oceanos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes. Entretanto, os estudos ainda ocorrem a nível laboratorial e a biorremediação de oceanos, utilizando biossurfactantes, permanece como um desafio (ATLAS, 1991).

Na biodegradação de pesticidas, os biossurfactantes vêm sendo objeto de investigações. A degradação de hexaclorociclohexano por surfactante produzido por *Pseudomonas* foi relatada, sendo que outros organoclorados como DDT e ciclodienos também foram emulsificados em menor grau (KARANTH, 1999).

Na biorremediação de locais contaminados por metais pesados tóxicos, como urânio, cádmio e chumbo, os biossurfactantes também têm sido empregados (MILLER, 1995).

2.1.1.1.5 - Limpeza de reservatórios de óleo pesado

Resíduos de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solvente ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Um processo alternativo e eficaz é o emprego de biossurfactantes, que promovem a diminuição da viscosidade e a formação de emulsões O/A, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após a quebra da emulsão. Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos problemático (BOGNOLO, 1999). A utilização de biossurfactantes na limpeza de tanques, em substituição aos surfactantes convencionais, promove a limpeza e recuperação de, aproximadamente, 90% dos hidrocarbonetos presente nos resíduos (BANAT, 1991).

2.1.1.1.6 - Recuperação melhorada do petróleo (EOR)

A EOR consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo, que utiliza microorganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual (BANAT, 1995). Os microorganismos produzem polímeros e surfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo, através dos poros. O mecanismo de EOR *in situ*, deve-se, provavelmente, a múltiplos efeitos dos microorganismos no óleo e ambiente. Estes efeitos incluem: formação de gás e aumento de pressão; produção de ácido e degradação da matriz calcárea; redução da viscosidade do óleo e da tensão interfacial pela produção de biossurfactantes; produção de solventes; degradação de macromoléculas de óleo e conseqüente diminuição da viscosidade e bloqueio seletivo da biomassa nas zonas de alta permeabilidade (KHIRE, 1994; JACK, 1998). Para ser útil na EOR *in situ,* os microorganismos devem estar aptos a crescer sob condições extremas, como alta temperatura, pressão, salinidade e baixa concentração de oxigênio. Muitos microorganismos adaptados a condições extremas, com capacidade de recuperação de óleo cru, têm sido isolados e estudados (JENNEMAN, 1983).

2.1.1.1.7 - Agricultura

Os biossurfactantes são empregados na agricultura, particularmente, nas formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são, geralmente, hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas (LIN, 1996). Surfactantes de *Bacillus* foram utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis (PATEL, 1986).

2.1.1.1.8 - Mineração

Na flotação e separação de calcita e scheelita foram empregados compostos tensoativos produzidos por *Pseudomonas sp*. e *Alcaligenes sp*., com recuperação de 95% de $CaWO_4$ e de 30% para $CaCO_3$, onde reagentes

químicos convencionais foram incapazes de separar estes dois minerais (KOSARIC, 1987). Biosurfactantes de *C.bombicola* demonstraram eficiência na solubilização de carvão (POLMAN, 1994).

2.1.2 Biopolímeros de açúcar

Ao longo da história os seres humanos empregaram, extensivamente, polímeros naturais para a sua proteção e sobrevivência, como madeira, couro e seda. Hoje em dia, novos polímeros naturais podem ser projetados para atender a necessidades específicas. Com o advento da biotecnologia moderna, combinada com os avanços da química e da ciência dos materiais, a sociedade já pode dispor de uma nova classe de materiais biocompatíveis, biodegradáveis e renováveis.

Embora tecnologias para a produção de biopolímeros, como as proteínas, por síntese química, já tenham sido desenvolvidas, seu emprego tornou-se inviável, devido aos elevados custos de manufatura. Porém, não existe, até o momento, tecnologia química capaz de produzir estruturas complexas de polissacarídeos. No entanto, estes compostos podem ser obtidos, prontamente, por via enzimática. Devido a sua estrutura e especificidade química, as enzimas são extremamente eficientes na produção de polímeros complexos. Neste contexto, um grande número de novos materiais produzidos por síntese enzimática estão sendo desenvolvidos e introduzidos no mercado, destacando-se os poliésteres, as proteínas e os polissacarídeos (BIOPOLYMERS: MAKING MATERIALS NATURE'S WAY, 1993, p.12).

Na prática, os polímeros que são obtidos por química convencional perdem uniformidade em relação à composição, comprimento e orientação espacial. Estas variáveis compõem o controle estatístico nas técnicas de polimerização, fundamentais para as propriedades físicas finais dos produtos. A ciência dos polímeros tem procurado reduzir estas variações. Entretanto, os processos químicos desempenham um papel importante, através da polimerização de materiais de origem biológica e na criação de novas

seqüências de genes, permitindo a obtenção de novos polímeros, através de métodos de recombinação de DNA (FRANK, 1991).

Uma das principais características requeridas para um polímero é a sua durabilidade. Entretanto, esta característica que torna o polímero tão versátil, também cria problemas, devido à sua persistência no meio ambiente. Muitos plásticos convencionais como polietileno, poliestireno e outros polímeros aromáticos não degradam nos aterros sanitários e nas usinas de tratamento de lixo (ANASTAS, 2001).

Estatísticas comprovam que mais de 100 milhões de toneladas de plásticos são produzidos a cada ano e que 40 milhões de toneladas são descartados em aterros sanitários. Outras centenas de toneladas são lançadas no ambiente marinho e vão se acumular em regiões oceânicas (REDDY, 2003). A incineração gera controvérsias, pois são produzidas substâncias potencialmente tóxicas na atmosfera, como a dioxina, o cloreto de hidrogênio e o cianeto de hidrogênio (JOHNSTONE, 1990). A reciclagem de plástico ajuda a minimizar o problema da classificação seletiva do lixo, mas nem todos os plásticos são passíveis de serem reciclados. A única solução para superar estas dificuldades é a substituição dos plásticos não-biodegradáveis pelos biodegradáveis. Muitos pesquisadores têm apresentado soluções para este problema, projetando materiais que degradam no ambiente natural. Assim, foi produzida uma ampla variedade de materiais sintéticos que não persistem intactos no meio ambiente, decompondo-se em subprodutos não tóxicos (ANASTAS, 1998).

Recentemente, uma importante classe de polímeros biodegradáveis tem recebido grande atenção. São os polímeros contendo açúcares ramificados (TOKIWA, 1998; LIU, 1999; PARK, 2000, 2001), também conhecidos como glicopolímeros. Estes materiais têm sido reportados na literatura como “materiais inteligentes” (BLINKOVSKY, 1994; HIANAGIDA, 1994; TOKIWA, 1998) e são divididos em três grupos: (1) ésteres de açúcar; (2) polímeros lineares de açúcar; (3) polissacarídeos modificados em laboratório.

De maneira geral, glicopolímeros podem ser definidos como polímeros sintéticos que possuem carboidratos pendurados, ou como grupos terminais em suas cadeias (OKADA, 2001). Estes compostos despertaram um elevado interesse como materiais artificiais em uma série de aplicações como biomateriais, por possuírem complexa funcionalidade, apresentando estreita similaridade com os glicoconjugados naturais e, em muitos casos, superando o desempenho destes em aplicações específicas (ALBERTIN, 2004). A literatura tem apresentado estudos do uso de glicopolímeros em drogas macromoleculares (ROY, 2002), sistemas carreadores de drogas (SIHORKAR, 2001), substratos para cultura celular (CHAIKOF, 2002), materiais biofuncionais para uso em linhas de sutura, cartilagens artificiais, reagentes bioquímicos, gel cromatográfico, produtos farmacêuticos, antibióticos, produtos de higiene, gel absorvente de água, embalagens, biossurfactantes (GRUBER, 2000), modificadores de tensão superficial (WULFF, 1999), pele e substrato de órgãos artificiais (KARAMUK, 1999), fragrâncias e cosméticos (TOKIWA, 1998; 2003).

No entanto, pouca atenção tem sido dada à preparação de poli (vinis ésteres), embora estes possam oferecer inúmeras aplicações como biomateriais, devido a sua cadeia principal ser constituída por um poli (vinil álcool), obtido pela quebra da dupla ligação C=C do grupo vinil (CHIELINI, 2003). De fato, materiais com poli (vinil álcool) na cadeia principal estão sendo empregados em um grande número de aplicações médicas, devido a sua fraca interação com os componentes do sangue (YAMAOKA, 1995).

Comparados aos polímeros convencionais, os polímeros sintetizados a partir de ésteres vinílicos de açúcar apresentam melhor desempenho em relação a algumas propriedades, como: adesividade, tingibilidade, biocompatibilidade e potencial antiestático (GÜBITZ, 2003).

As aplicações mais interessantes surgem na área de biomateriais. Kobayashi et al (1994) investigaram a interação nos sistemas de reconhecimento célula – célula entre hepatócitos e oligossacarídeos com poliestireno, na pesquisa e desenvolvimento de um fígado artificial. Klemm e Einfeldt (2001) usaram catalisadores enzimáticos na transesterificação seletiva

de derivados de celulose e amido para obter matrizes poliméricas de nanotubos de D-glicose, estruturadas em redes de nanofibras dilatadas, para emprego em vasos sanguíneos artificiais.

2.2 - Concentração Micelar Crítica (CMC)

As moléculas de um surfactante, por serem anfifílicas, apresentam um comportamento distinto ao interagirem com a água. A parte polar (cabeça) da molécula atrai as moléculas de água, enquanto a parte apolar (cauda) as repele. Existem duas maneiras nas quais estas interações ocorrem: (1) as moléculas do surfactante estão na superfície da mistura. Neste caso, a parte polar da molécula interage com a água, enquanto que a parte apolar fica sobre a superfície, em contato com o ar ou com outro solvente apolar (Figura 4). A presença destas moléculas na superfície rompe as forças de ligação entre as moléculas de água, diminuindo a energia de superfície (tensão superficial); (2) as moléculas do surfactante estão abaixo da superfície da mistura. Neste caso, as moléculas podem formar agregados, onde a parte polar fica orientada na direção das moléculas de água e a parte apolar fica voltada para o solvente. Estes agregados são chamados de micelas. A Figura 5 apresenta os três tipos mais comuns de micro emulsões formadas, que dependem da composição da mistura. Em (a) e (c) as micelas apresentam forma esférica, sendo que no primeiro caso a fração de volume de óleo é maior e a dispersão se caracteriza por emulsão de água em óleo (A/O), enquanto que no segundo caso, a fração de água é maior e a dispersão se caracteriza pela emulsão de óleo em água (O/A). No entanto, quando as frações volumétricas de óleo e água são similares, pode ocorrer a formação de uma micro emulsão bicontínua (Figura 5b). Neste caso, tanto o óleo como a água coexistem em uma fase contínua na presença de uma interface estável, imposta pelo surfactante, com um grau de curvatura igual a zero (LAWRENCE, 2000).

.

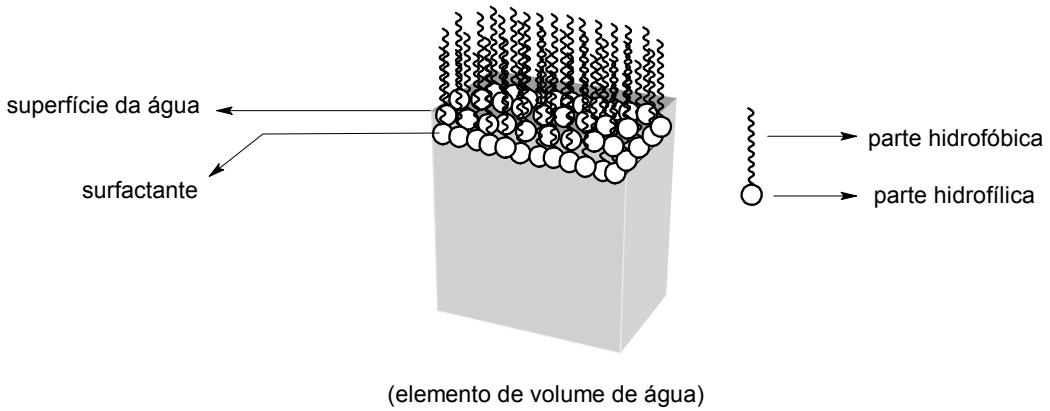


Figura 4: Elemento de volume de água de superfície, mostrando a saturação de moléculas de surfactante. (LAWRENCE, 2000).

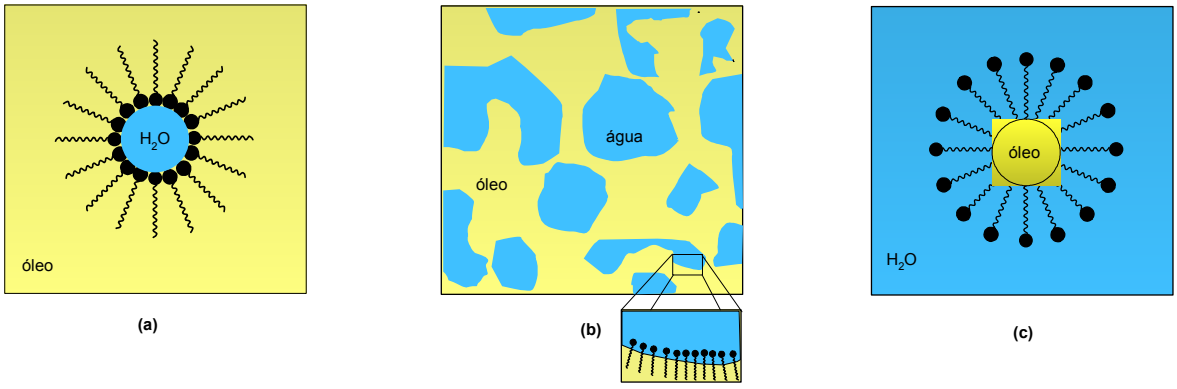


Figura 5: (a) micela esférica, onde a água está dispersa no óleo; (b) microemulsão bicontínua com volumes de óleo e água similares; (c) micela esférica, onde o óleo está disperso na água (LAWRENCE,2000).

A quantidade de moléculas na superfície, ou de agregados no interior da mistura, irá depender da concentração do surfactante. Baixas concentrações favorecem arranjos na superfície. À medida que a concentração aumenta, mais moléculas migram para a superfície e mais micelas vão se formando no interior da mistura. Quando a superfície se torna saturada de surfactantes, novas adições contribuirão somente para a formação de micelas no interior da mistura. Neste ponto, a concentração do surfactante é chamada “Concentração Micelar Crítica” (CMC) e pode ser determinada, através de medidas de tensão superficial *versus* concentração (Figura 6).

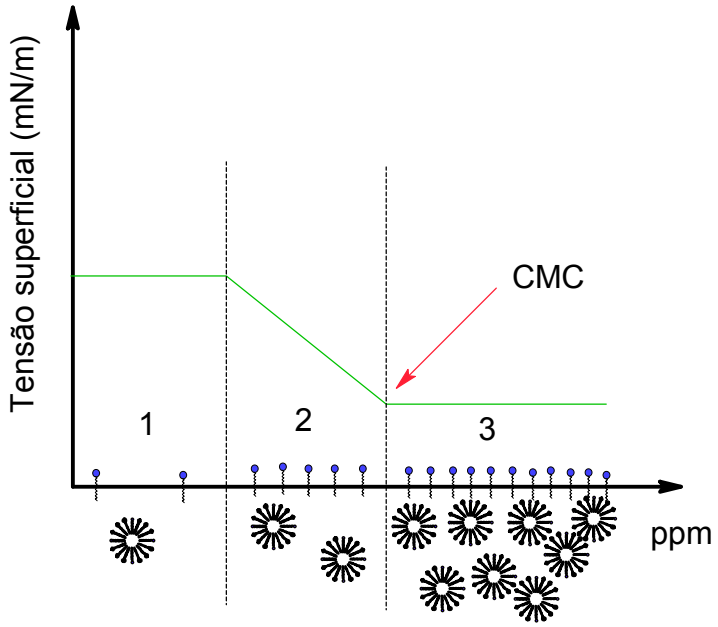


Figura 6: Gráfico Tensão Superficial *versus* concentração de surfactante, para a determinação da Concentração Micelar Crítica (BIRDI, 1997).

Na Figura 6, podem ser observadas três situações: (1) concentrações muito baixas de surfactante, que não alteram a tensão superficial significativamente; (2) quantidades adicionais implicam no decréscimo dos valores da tensão superficial; (3) a superfície se torna saturada e não se nota mais nenhuma variação nas medidas da tensão superficial (HIEMENZ, 1997).

A determinação da CMC é muito importante, a fim de otimizar a detergência de um produto, minimizando custos, evitando desperdícios e minimizando resíduos em efluentes industriais.

2.3 Balanço Hidrofílico-Lipofílico (HLB)

Surfactantes são classificados, empiricamente, através de seus valores de HLB, os quais descrevem uma relação entre as partes hidrofílicas e lipofílicas da molécula (GUIDE TO CLEANER TECHNOLOGIES, 1994). Através do controle do grau de esterificação e da natureza do ácido graxo e do açúcar empregados na reação, é possível sintetizar ésteres de açúcar com

uma ampla faixa de valores de HLB e, consequentemente, com uma grande variedade de aplicações (PLOU, 2002). Em casos ideais, o valor de HLB pode ser calculado pela expressão de Griffin (KIM, 2002).

Existem, basicamente, dois tipos de emulsão: (1) água em óleo (A/O): a água está dispersa no óleo. Por exemplo, água contida em amostras de petróleo; (2) óleo em água (O/A): o óleo está disperso na água. Por exemplo, derramamento de petróleo no oceano (NITSCHKE, 2002). Emulsões (A/O) requerem surfactantes com baixos valores de HLB e emulsões (O/A) requerem surfactantes com altos valores de HLB para a sua estabilização. A Tabela 1 apresenta as faixas típicas de valores de HLB e suas aplicações mais indicadas (ROSS, 1988).

Tabela 1: Valores de HLB e potenciais aplicações.

HLB	**APLICAÇÕES**
1 - 3	**Agentes antiespumantes**
3 - 6	**Agentes emulsificantes (emulsão A/O)**
7 - 9	**Agentes de molhabilidade**
8 - 18	**Agentes emulsificantes (emulsão O/A)**
13 - 16	**Detergentes**
16- 18	**Agentes solubilizantes**

No entanto, o valor de HLB não indica a eficiência do emulsificante e a escolha do mais indicado deve ser feita através de experimentos. Muitos tipos de surfactantes são usados como desengordurantes em soluções aquosas, mas os usuários devem atentar para a sua toxicidade. Por exemplo, o etileno glicol butil éter, o etileno glicol etil éter e o etileno glicol metil éter, devem ser usados com observância dos limites de exposição previstos no *Material Safety Data Sheet* (MSDS, 2006).

Ao contrário, os ésteres de açúcar, por serem biodegradáveis, atóxicos, não-inflamáveis e não-iônicos são fortes candidatos para serem empregados em soluções de limpeza (KELKAR, 2006), como, por exemplo, em tanques de estocagem de óleo pesado, contendo depósitos de fundo, geralmente,

formados por uma mistura de material particulado, óleo cru e água emulsificada ou salmoura. A ação estratégica destes biossurfactantes é a imediata separação dos resíduos de óleo pesado em três componentes facilmente separáveis: (1) óleos e graxas que flotam no topo; (2) os resíduos sólidos livres de óleo, que se depositam no fundo do tanque e (3) o sistema biossurfactante na parte intermediária. Tanto os óleos e graxas, como o sistema biossurfactante, podem ser reaproveitáveis (BANAT, 1995). A Figura 7 ilustra este procedimento.

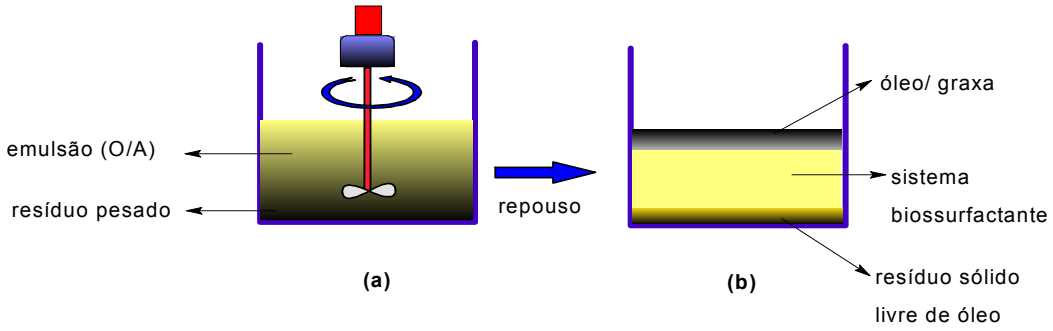


Figura 7: Tanque de estocagem de óleo pesado. (a) colocação da solução de surfactante, seguida de agitação vigorosa para remoção do resíduo de fundo; (b) separação das três fases após repouso (BANAT, 1991).

Os valores de HLB para os ésteres de sacarose ou sucroésteres não são significativamente alterados por variações de temperatura (CRUCES, 2001), mas é possível se conseguir variações nos valores de HLB entre 1 e 18 (BÖGE, 1999), conforme o grau das substituições, tamanho da cadeia carbônica e número de insaturações (Figura 8).

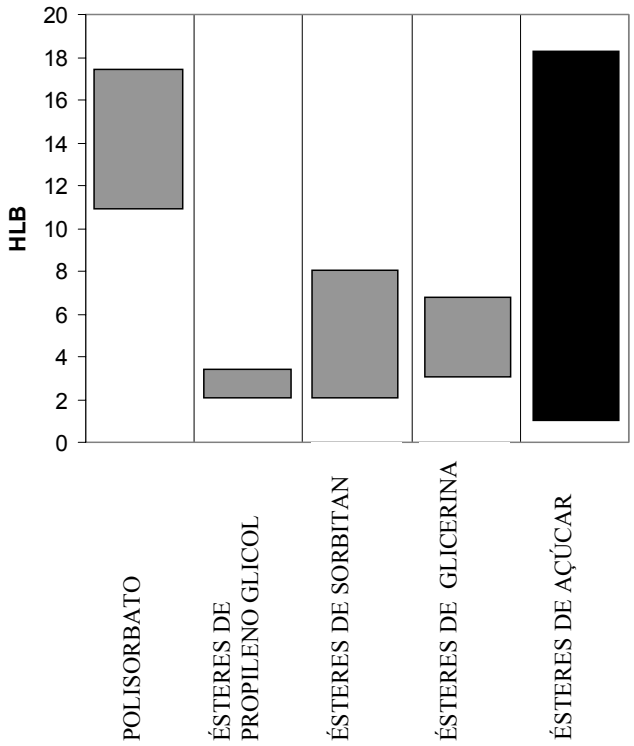


Figura 8: Faixa de valores de HLB de ésteres de sacarose, em comparação com outros surfactantes (YAN, 2001).

Monoésteres de sacarose, com cadeias alquílicas entre oito e dezesseis carbonos, são excelentes surfactantes não-iônicos, enquanto que ésteres de açúcar com cadeias alquílicas maiores que dezoito carbonos apresentam pouca ou nenhuma solubilidade em água, o que inviabiliza suas aplicações como tensoativos (BAZIAN, 1998). Uma forma de solucionar este problema é a introdução de um grupo sulfato no fragmento da sacarose para aumentar a polaridade.

Ésteres de sacarose geralmente apresentam uma baixa capacidade de formar microemulsões. Porém, na presença de co-surfactantes, como álcoois com C2-C8, é possível solubilizar até 45% de água em óleo, o que é muito desejável nas indústrias de cosméticos (GARTI, 2000) e de petróleo. Por outro lado, ésteres de sacarose com HLB entre 2 e 6 são usados na prevenção de separação de fases em produtos compostos de misturas água/óleo como margarina, manteiga, chocolate, patê, entre outros (AKOH, 1992).

2.4 - A seletividade da catálise enzimática

Em laboratório, a oxidação de ácidos graxos em dióxido de carbono e água não é um processo suave. Exige graus extremos de pH, altas temperaturas e reagentes químicos corrosivos. Entretanto, no organismo, esta reação se efetua suavemente e com rapidez, devido à necessidade de se preservar um ambiente "fisiológico" para os tecidos. Esta notável situação é explicada, porque o organismo possui um grupo de potentes catalisadores, as enzimas (CANTAROW e SCHEPARTZ, 1968).

Com exceção de algumas ribozimas (RNAs), todas as enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. São os mais eficientes catalisadores conhecidos, podendo aumentar a velocidade de uma reação por um fator de 10^{14} vezes mais do que uma reação não-catalisada. Os catalisadores químicos, por sua vez, aumentam a velocidade das reações por fatores entre 10^2 e 10^4. São macromoléculas com estrutura muito precisa e extremamente maiores que seus substratos, com reentrâncias possuidoras de grupos químicos localizados em posições exatas para servir à catálise. Por isso, as enzimas são muito específicas para os seus substratos. Esta especificidade se deve à existência de um local denominado "sítio de ligação do substrato", localizado na superfície da enzima. Este sítio de ligação é um arranjo tridimensional dos aminoácidos de uma determinada região da molécula, geralmente, complementar à molécula do substrato, espacial e eletricamente ideal para a ligação do mesmo, sendo capaz, inclusive, de reconhecer isômeros óticos D e L de um mesmo composto (CAMPBELL, 2001).

As enzimas são constituídas de aminoácidos, que apresentam um átomo de carbono ligado a uma carboxila, a um grupo amino e a um átomo de hidrogênio. O quarto substituinte é uma cadeia hidrocarbônica (grupo R), específica para cada aminoácido (Figura 9) (CANTAROW e SCHEPARTZ, 1968).

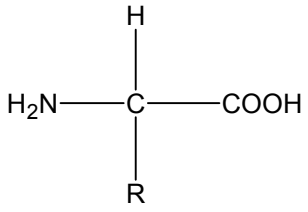


Figura 9: Representação da estrutura de um aminoácido simples.

A estrutura primária da enzima é formada pela união entre aminoácidos, através da ligação pepitídica (Figura 10), estabelecida entre o grupo α-carboxila de um aminoácido e o grupo α-amino do aminoácido subseqüente, formando uma longa cadeia. Grupos carboxila e grupos amino do radical R jamais participam da ligação pepitídica (CAMPBELL, 2001).

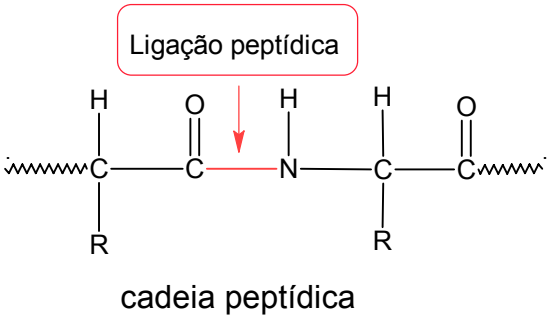


Figura 10: Representação de uma cadeia peptídica. Resíduos de aminoácidos ligados uns aos outros por ligações amida.

A medida da atividade da enzima é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Para efetuar estas dosagens, uma amostra da solução, contendo a enzima é incubada com altas concentrações de substrato, para garantir velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas. De acordo com a Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB), uma unidade de uma enzima - Unidade Internacional (U) - é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato por minuto, nas condições

padrão recomendadas para cada enzima. Na prática, emprega-se a atividade específica (U/ mg) que é uma medida da pureza da enzima (IUB, 2006).

O critério mais importante para a classificação das enzimas foi estabelecido pela *International Union of Biochemistry*, dividindo-as em seis classes (IUB, 2006):

-Oxidorredutases: são enzimas que catalisam reações de oxi-redução, como as desidrogenases e as oxidases;

-Transferases: são enzimas que catalisam tranferências de grupos funcionais, como as quinases e as transaminases;

-Hidrolases: catalisam reações de hidrólise de ligação covalente, como as proteases, lipases, amilases;

-Liases: catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico;

-Isomerases: catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos, como as epimerases;

-Ligases: catalisam reações de formação de novas moléculas com ligações C-O, C-S, C-C, éster fosfórico e Metal-N.

Alguns modelos procuram explicar a especificidade substrato/enzima: (1) modelo centenário chave/fechadura, que prevê um encaixe perfeito do substrato no sítio de ligação; (2) modelo ajuste induzido, que prevê um sítio de ligação, não totalmente pré-formado, porém moldável à molécula do substrato, ajustando-se à mesma na sua presença; (3) modelo combinado de ajuste induzido com uma torção da molécula do substrato, que o ativa e o prepara para a sua transformação em produto. A Figura 12 apresenta, esquematicamente, a síntese enzimática, através do modelo chave/fechadura, onde se pode notar a formação dos complexos enzima/substrato (ES) e enzima/produto (EP) (CAMPBELL, 2001).

.

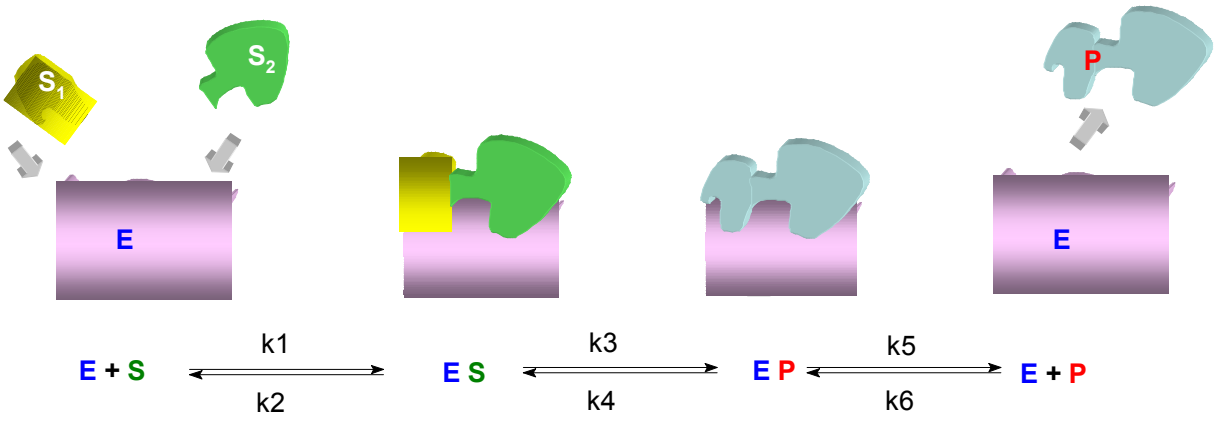


Figura 11: Modelo de catálise enzimática tipo chave/fechadura.

CAPÍTULO 3

ESTADO-DA-ARTE

3 - ESTADO-DA-ARTE

3.1 Estratégia para a síntese de ésteres de açúcar

Os açúcares possuem múltiplos grupos hidroxila e são classificados como polióis (BOSCOLO, 2003), podendo ser convertidos em ésteres, éteres e uretanas (PARKER, 1981), implicando em modificações nas suas propriedades físicas e químicas, resultando em importantes produtos de interesse tecnológico.

Ésteres de açúcar podem ser obtidos por: (1) transesterificação de ésteres de ácidos graxos de óleos vegetais; (2) glicerídeos e (3) ácidos graxos (BOSCOLO, 2003). Nestes casos, como os subprodutos são pouco voláteis, as reações podem ser processadas sob vácuo para a remoção do metanol, do glicerol e da água, respectivamente, favorecendo o deslocamento do equilíbrio da reação para os produtos, aumentando o rendimento do processo. A Figura 12 ilustra a síntese de éster de açúcar, empregando sacarose.

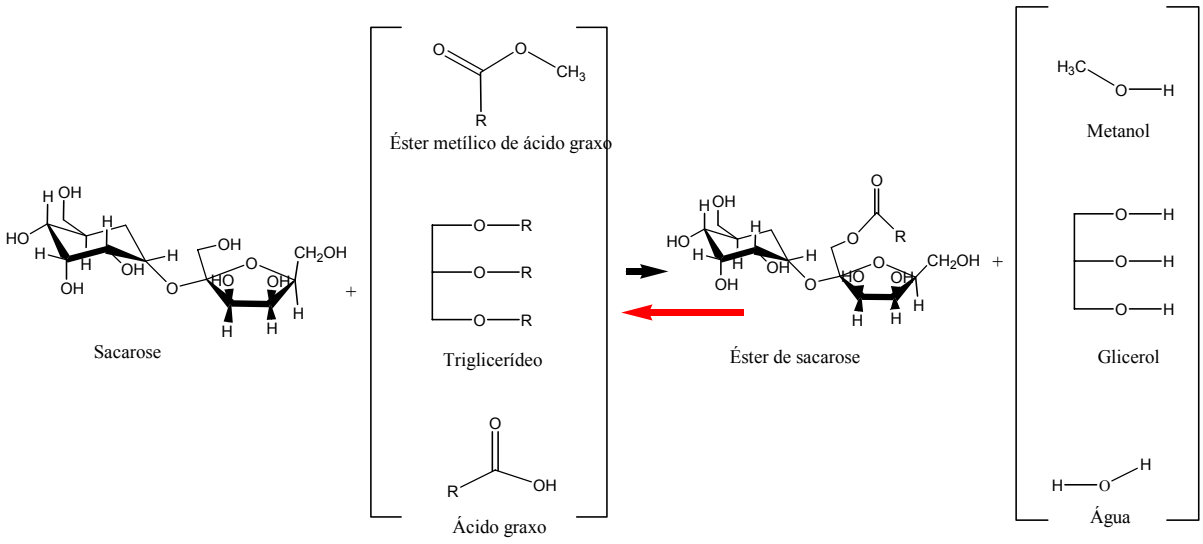


Figura 12: Síntese de ésteres de açúcar com a formação de subprodutos competitivos com o açúcar.

Tal dificuldade pode ser contornada, quando os ésteres de partida são vinílicos ou isopropenílicos (JONES, 1981), pois estes resultam em acetaldeído e acetona, respectivamente, subprodutos não competitivos com a sacarose, por não possuírem hidroxilas (Figura 13).

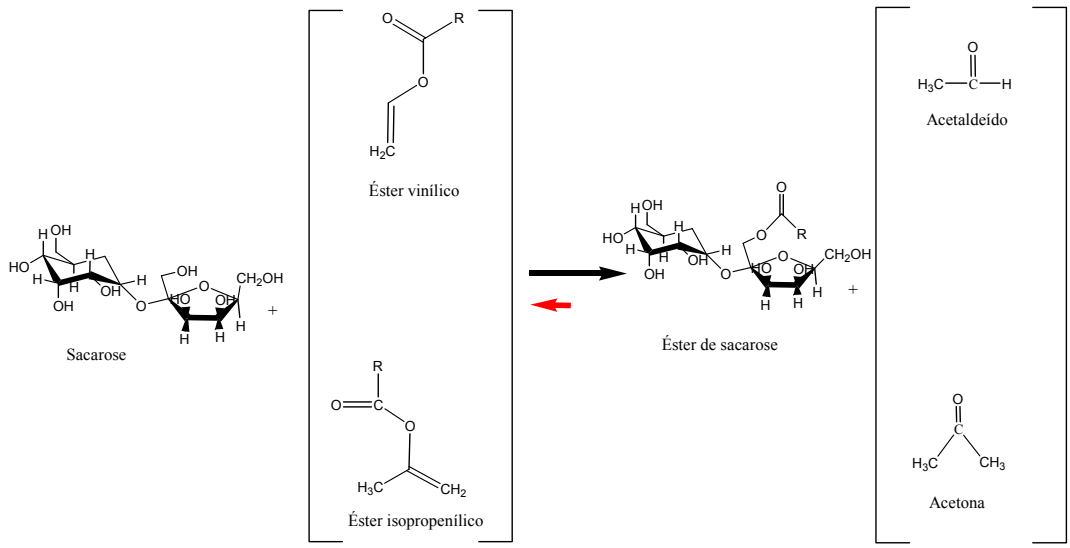


Figura 13: Formação de subprodutos não competitivos com o açúcar.

A transesterificação inclui: alcoólise, acidólise e interesterificação (YAMANE, 1987). Estas reações estão sumarizadas na Figura 14.

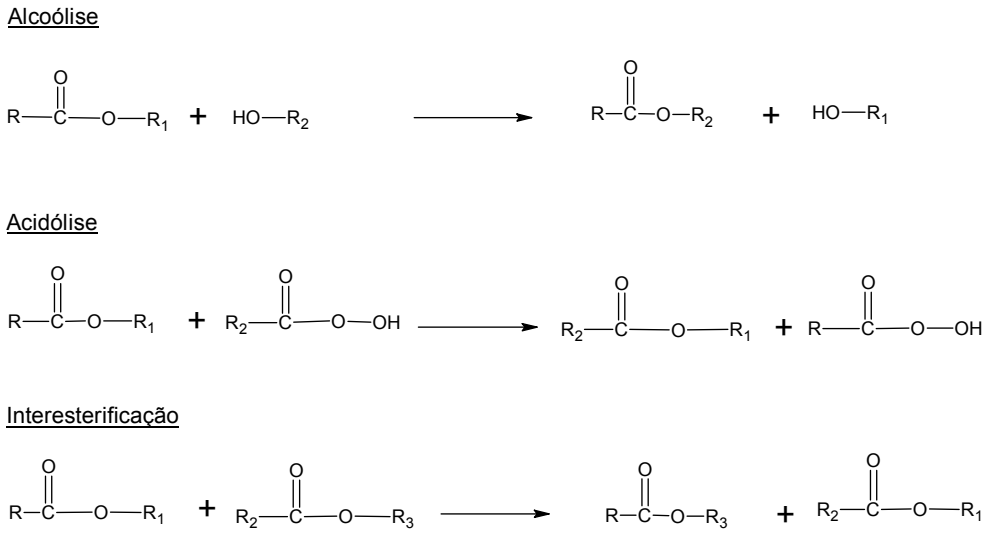


Figura 14: Tipos de transesterificação.

3.2 - Estratégia para a síntese enzimática de ésteres de açúcar

Assim como na catálise convencional, fatores termodinâmicos afetam o equilíbrio das reações catalisadas por enzimas (KASTLE, 1990). A mudança no equilíbrio das reações catalisadas por enzimas, como, por exemplo, as do tipo hidrolase, pode ocorrer variando-se a concentração de reagentes, temperatura e, principalmente, pela razão água/solvente. Em todos os casos, parâmetros, como a concentração de água e a natureza dos solventes, são de grande importância na síntese enzimática (BELL, 1995).

3.2.1 – O papel dos solventes

A escolha adequada do solvente tem um efeito determinante no desempenho da reação enzimática. Metodologias para a acilação de açúcares consistem em encontrar um meio onde o reagente polar (o carboidrato) e o reagente apolar (o doador acila) sejam capazes de reagir na presença do biocatalisador (enzima). A influência do solvente na conversão dos reagentes em produtos tem sido estudada extensivamente por inúmeros pesquisadores (RICH, 1995; TOKIWA, 1998; PLOU, 2002). Estas pesquisas comprovaram que as interações de natureza dielétrica dos solventes (AFFLECK, 1992) interferem na rigidez das cadeias proteicas das enzimas, modificando a polaridade de seus sítios ativos (XU, 1994). Também, variações na energia livre total do sistema podem estar associadas com as diferentes energias de solvatação (RYU, 1989).

No entanto, ainda não há um consenso geral na escolha dos parâmetros para descrever, quantitativamente, os efeitos dos solventes nas reações enzimáticas (LORTIE, 1997). O parâmetro mais frequentemente usado é o Log *P*, onde *P* é o coeficiente de partição entre dois solventes. Alguns autores afirmam que não há uma boa correlação entre o Log *P* e a eficiência da enzima (NARAYAN, 1993). Por outro lado, algumas publicações reportam a influência de parâmetros derivados do Log *P*, na eficiência da enzima, como: (1) constante dielétrica (AFFLECK, 1992); (2) polaridade e afinidade química

(VALIVETY, 1991) e (3) parâmetro de solubilidade de Hildebrand (BRINK, 1985).

3.2.2 – A natureza dos substratos poli-hidroxilados

Açúcares são uma classe particularmente interessante de compostos, que podem ser modificados através de catálise enzimática (DUCRET, 1996). A enzima mostra uma preferência seletiva típica pela acilação (RCO—) (DORDICK, 1994). Esta regioseletividade de açúcares proporciona reações altamente favoráveis para síntese de adoçantes, aditivos de alimentos, surfactantes, produtos químicos e farmacêuticos.

Porém, o maior problema encontrado é a baixa solubilidade do açúcar em solventes orgânicos. No entanto, se estes forem hidrofílicos, pode-se superar esta desvantagem. Por exemplo, na presença de piridina e N, N dimetilformamida (DMF), açúcares sofrem acilação em sítios primários (IKEDA, 1993; RIVA, 1988; THERISOD, 1986) e secundários (THERISOD, 1987), originando novos materiais (WONG, 1994). Tem sido mostrado que a Protease de *Bacillus subitilis* apresenta alta atividade em DMF (RIVA, 1988; THERISOD, 1986). Além do mais, a catálise enzimática requer, apenas, condições ambientais moderadas de pressão e temperatura, as quais permitem um controle primoroso das propriedades dos produtos.

A dificuldade de se controlar o grau e a seletividade das reações, envolvendo hidroxilas de açúcares, tem sido um problema na obtenção de produtos por catálise química convencional (PARK, 1999; LU, 2002; WU, 2002). No caso dos dissacarídeos, como a sacarose, maltose e celobiose o problema se agrava, devido à fragilidade da ligação glicosídica em meio aquoso ácido, pois, neste caso, os ésteres não podem ser produzidos pela esterificação direta dos ácidos carboxílicos com os açúcares, porque poderá ocorrer a quebra da ligação glicosídica. O problema seria, em parte, solucionado pela reação dos dissacarídeos com cloretos de ácidos orgânicos (THÉVENET, 1999), seguida de hidrólise em meio alcalino. No entanto, o

processo não é seletivo, havendo a necessidade de bloqueio e desbloqueio de hidroxilas.

3.2.3 – A natureza dos substratos doadores de acilas

Acilações catalisadas por lipase reagem via formação de um produto intermediário enzima-acila (KAWASE, 1992; SCHMIDT, 1998). Como conseqüência, a natureza destes doadores de acila (ácidos graxos e derivados) tem um efeito notável na reatividade.

Tem sido observado que o uso de proteases como catalisadores, em reações com doadores de acila de maiores cadeias carbônicas, diminui o rendimento na produção de ésteres de açúcar (PLOU, 1995). Para a acilação de açúcares com ácidos graxos de longa cadeia (C12-C18), lipases são mais indicadas (FERRER, 2000a).

Wang et al. (1988) demonstraram que a taxa de transesterificação de compostos contendo hidroxilas (incluindo açúcares) com ésteres vinílicos é de 20 a 100 vezes maior do que aquelas contendo ésteres alquílicos, porque o álcool vinílico formado, durante o processo, tautomeriza-se para acetaldeído de baixo ponto de ebulição, favorecendo o equilíbrio da reação na direção dos produtos. No entanto, deve-se tomar cuidado, pois tem sido reportado que algumas lipases, como a *Candida rugosa*, perdem a sua atividade na presença de acetaldeído (WEBER, 1995).

3.2.4 – A importância da água

A água desempenha funções controversas neste tipo de meio reacional. Para favorecer a síntese no sentido dos produtos, a atividade termodinâmica da água dever ser mantida a mais baixa possível. Entretanto, a hidratação das moléculas das enzimas é importante para a estrutura tridimensional das proteínas e para a atividade catalítica (TIMASHEFF, 1993). Sabe-se que a água representa um importante papel, tanto para a estabilidade térmica (VOLKIN, 1991), como para a atividade da enzima em meios não-aquosos

(ZAKS, 1988). No entanto, sendo a água o nucleófilo nas reações de hidrólise, também poderá ser um inibidor competitivo (VALIVETY, 1993).

Geralmente, solventes hidrofóbicos são bons meios para transesterificações catalisadas por hidrolases como as proteases e as lipases, pelo fato destes solventes não capturarem a água essencial das enzimas (PARK, 2000). Porém, o maior problema tem sido a baixa solubilidade dos açúcares em solventes orgânicos, com exceção do DMF e do DMSO (GORMAN, 1992). No entanto, estes dois solventes são considerados inadequados para a catálise química, por retirarem a água firmemente ligada à proteína, que constitui a enzima. Uma solução seria trabalhar em meios micro-aquosos, ou seja, hidratar a enzima, na medida certa, para permitir a sua atividade catalítica.

A influência da quantidade de água e a natureza do solvente orgânico são novos parâmetros a serem considerados na otimização de processos industriais (LORTIE, 1997).

3.2.5 – A escolha da enzima

Para a transesterificação por catálise enzimática de açúcares, diferentes regioisômeros podem ser obtidos pela escolha apropriada do biocatalisador (PLOU, 2002). Isto é notável, porque se pode conseguir, por exemplo, diferentes monoésteres de açúcar com distintas propriedades e aplicações, empregando-se os mesmos substratos, variando-se, somente, o tipo de enzima utilizada (HUSBAND, 1998).

As enzimas podem ser usadas em dois diferentes estados em meios não-convencionais: em solução, ou no estado sólido. No primeiro caso, ela pode estar na forma nativa ou modificada com moléculas anfifílicas para melhorar a sua solubilidade em meios orgânicos ou micro aquosos. Enzimas sólidas podem ser usadas como precipitados, liofilizadas, em cristais com ligações cruzadas, ou imobilizadas (CHULALAKSANANUKUL, 1996; MARTINELLE, 1995).

As proteases são, particularmente, empregadas nas transesterificações em presença de solventes orgânicos. Vários açúcares vinílicos têm sido obtidos por este método a partir de hexoses (SHIBATANI, 1997; KITAGAWA, 2000), pentoses (TOKIWA, 1999), dissacarídeos (KITAGAWA, 1999) e nucleosídeos (KITAGAWA, 2000).

A acilação regioseletiva de açúcares, como a sacarose, através da escolha da enzima mais adequada, potencializa, ainda mais, o uso destas matérias-primas abundantes na síntese de diversos produtos. O controle cuidadoso sobre a regioseletividade permite modificações altamente complexas em açúcares para obter compostos sintéticos incomuns em aplicações importantíssimas, como a acilação regioseletiva de nucleotídeos em tratamentos de câncer e terapias da AIDS, que apresenta efeito inibidor do crescimento do vírus em células brancas (WENGEL, 1988).

3.3 – Catálise Enzimática *versus* Catálise Química

A modificação enzimática em compostos hidroxilados é um processo altamente eficiente, quando comparado com a catálise química convencional. Neste último caso, a modificação regioseletiva requer metodologias complexas de controle de bloqueio e desbloqueio em reações de um dado grupo hidroxila (BALLARD, 1980; LU, 2002; WU, 2002). Além do mais, métodos sintéticos requerem, geralmente, o emprego de temperaturas elevadas e catálise alcalina, com alto consumo de energia e baixa seletividade. Entretanto, por catálise enzimática, a transesterificação regioseletiva de açúcares é possível sob certas condições e a acilação tem mostrado sucesso (CHAUVIN, 1991, 1993).

3.4 – Catálise enzimática em açúcares e outros polióis

A seguir, serão apresentados e discutidos alguns trabalhos publicados sobre catálise enzimática em açúcares e outros polióis, visando mostrar a importância desta metodologia de síntese e situar o leitor quanto ao trabalho desenvolvido nesta tese, no contexto da produção de biomateriais.

Ao contrário da catálise química, que permite apenas a síntese de polímeros com diversidade estrutural limitada, devido à simplicidade dos monômeros comuns, a catálise enzimática, altamente seletiva, permite incorporar monômeros polifuncionais de estruturas complexas na cadeia polimérica (PARK, 2000). Existe uma estratégia proposta por Tokiwa (1998) para se obter esses produtos. Em somente duas etapas é possível sintetizar polímeros biodegradáveis, contendo açúcares como substituintes ou ramificações. A primeira etapa consiste na reação enzimática para se obter um produto intermediário polimerizável, enquanto a segunda etapa se constitui na catálise química, responsável pela conversão do produto intermediário no polímero desejado. A Figura 15 apresenta esta metodologia através de um fluxograma simplificado.

*Se o éster de partida for monovinílico, o éster de açúcar obtido não é polimerizável.
*Se o éster de partida for polivinílico, o éster de açúcar obtido é polimerizável.

Figura 15: Fluxograma simplificado da reação químio-enzimática de polímeros.

Estes polímeros de açúcar ramificado consistem de três partes: (a) a cadeia principal; (b) o braço espaçador e (c) o açúcar pendente. A Figura 16 apresenta um esquema de um polímero de açúcar ramificado.

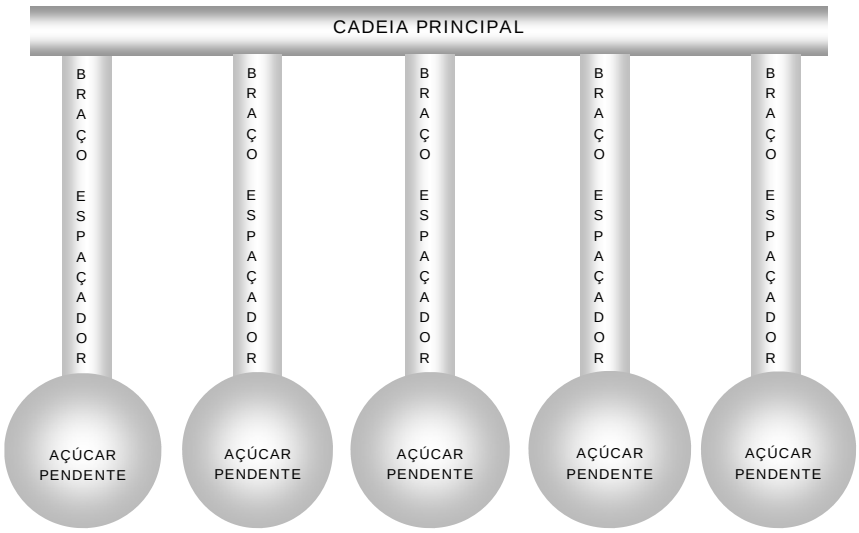


Figura 16: Representação esquemática de um polímero, com açúcar incorporado na cadeia principal.

Este modelo estrutural se torna interessante na medida em que a densidade, a biodegradabilidade, a hidrofilicidade, a lipofilicidade e outras propriedades podem ser alteradas para se adequarem a certa aplicação (TOKIWA, 1998). Para isto, basta escolher, adequadamente, os substratos que irão compor as partes desta arquitetura molecular, bem como as demais variáveis de síntese, como o tipo de enzima, o solvente, a temperatura, a razão mássica entre os substratos, o tempo de reação, a razão água/solvente e outras.

A incorporação de açúcares na estrutura de um polímero é um evento que permite a obtenção de uma infinidade de polissacarídeos. Por exemplo, Park et al. (2000) obtiveram um diéster de sacarose (sacarose 6,6'-O-diviniladipato), através de catálise enzimática entre sacarose e adipato de vinila em acetona, empregando a lipase Novozym-435. O monômero obtido foi submetido à outra catálise com a mesma lipase e 1,8-octanodiol, para formar um poliéster de sacarose (Figura 17).

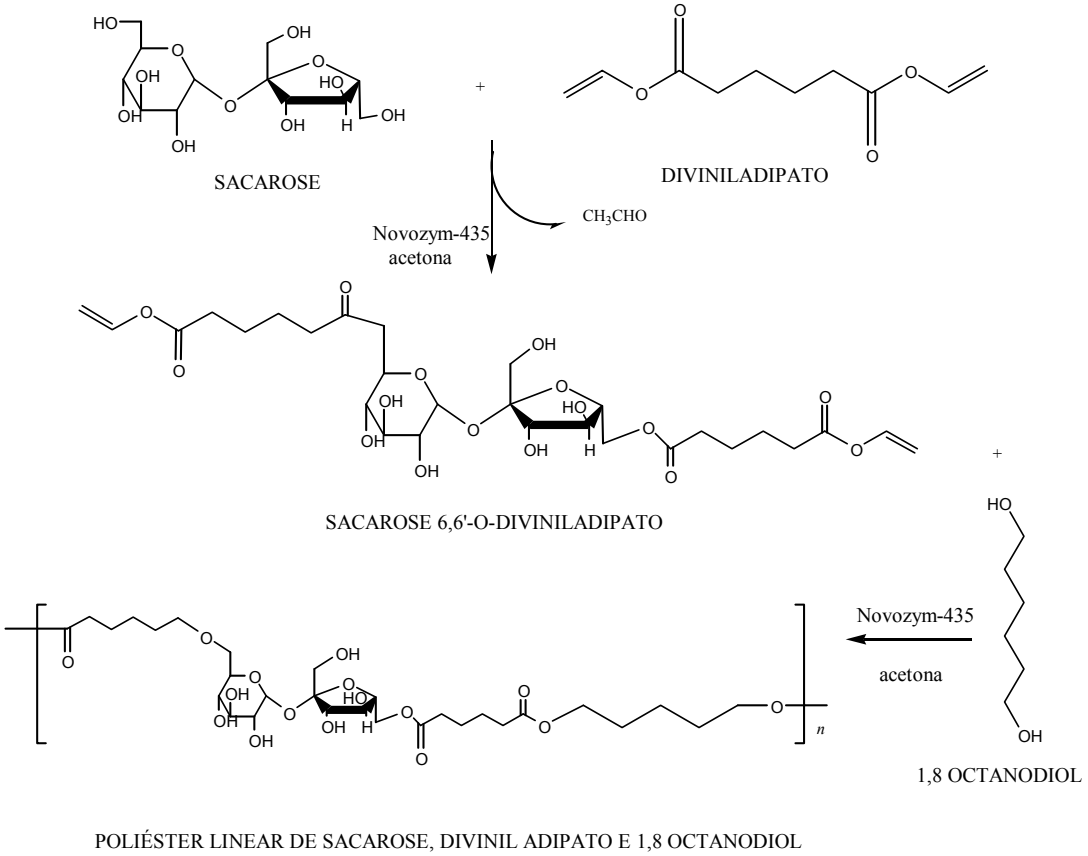


Figura 17: Reação enzimática de poliéster de sacarose, onde a sacarose foi incorporada na cadeia principal do polímero.

Tokiwa et al. (2000) sintetizaram biossurfactantes poliméricos, contendo açúcares ramificados e ésteres de ácido graxo. Estes polímeros anfifílicos são mais eficazes para a estabilização de dispersões sólidas do que os surfactantes convencionais de menores massas molares. A copolimerização do 6-*O*-viniladipoil-D-glicose (VAG) com ésteres de ácidos graxos ocorreu por catálise química com AIBN e DMF, a 60°C, sob vácuo, após 24 horas. A Figura 18 apresenta a reação do copolímero obtido.

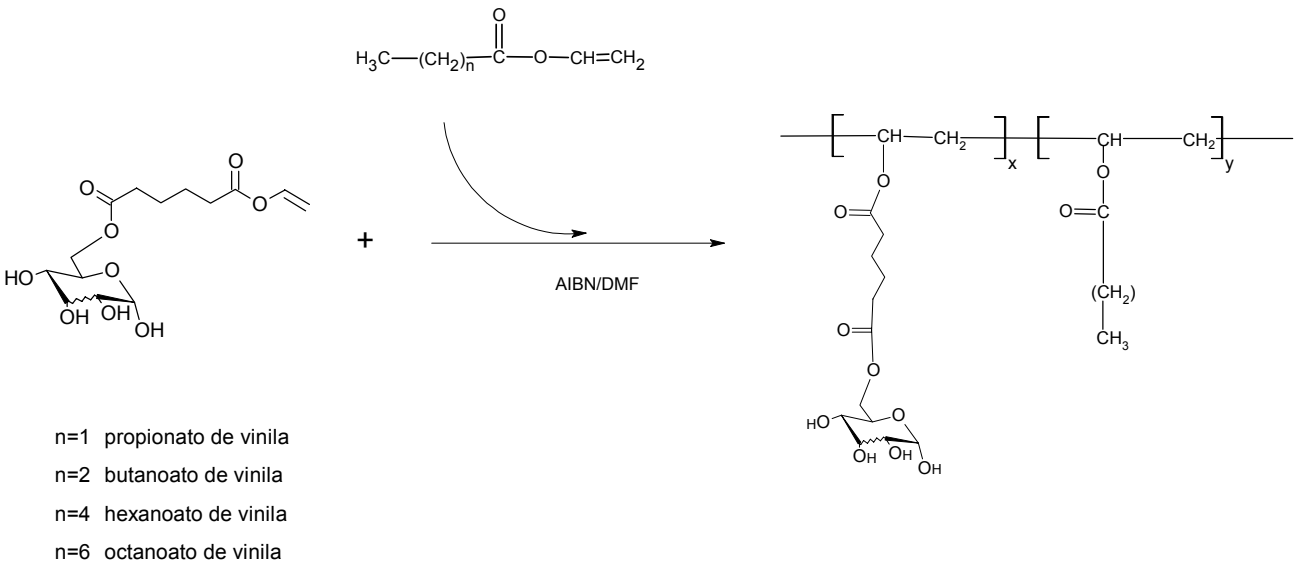


Figura 18: Copolimerização de 6-*O*-viniladipolil D-glicose (VAG) e ésteres de ácidos graxos.

A estrutura química da inulina é composta por uma mistura de oligômeros e polímeros, contendo entre 2 e 60 moléculas de D-frutose β-2,1 com uma unidade de D-glicose como resíduo inicial (ROBERFROID, 1998). A inulina não é digerida no trato intestinal superior, mas é hidrolisada no intestino grosso (cólon) pela flora intestinal. Assim, materiais contendo inulina podem ser usados como matrizes em sistemas carreadores de drogas no tratamento de desordens do cólon, como a doença de Crohn ou carcinomas do cólon, reduzindo os efeitos indesejáveis causados por drogas quimioterápicas (NINESS, 1999). Visando este tipo de aplicação, Ferreira et al. (2002) modificaram a inulina, através de sua esterificação com o acrilato de vinila (VA), em DMF, a 50°C, durante 96 horas, empregando protease de *Bacillus subtilis*. As taxas de conversão, medidas em HPLC, para diferentes concentrações de VA, foram superiores a 57%. A polimerização via radicalar do éster de inulina, em solução aquosa de APS (5'-adenilsulfato) e TEMED (N,N,N',N' tetrametiletilenodiamina), forma hidrogéis com ligações cruzadas, que apresentam distintas propriedades físicas e graus de inchamento. Cromatogramas obtidos em análises de GPC apresentaram valores de massas molares dos ésteres de inulina variando entre 12.180 e 31.640 Da, de acordo

com o grau de conversão obtido. A Figura 19 apresenta a síntese do éster de inulina.

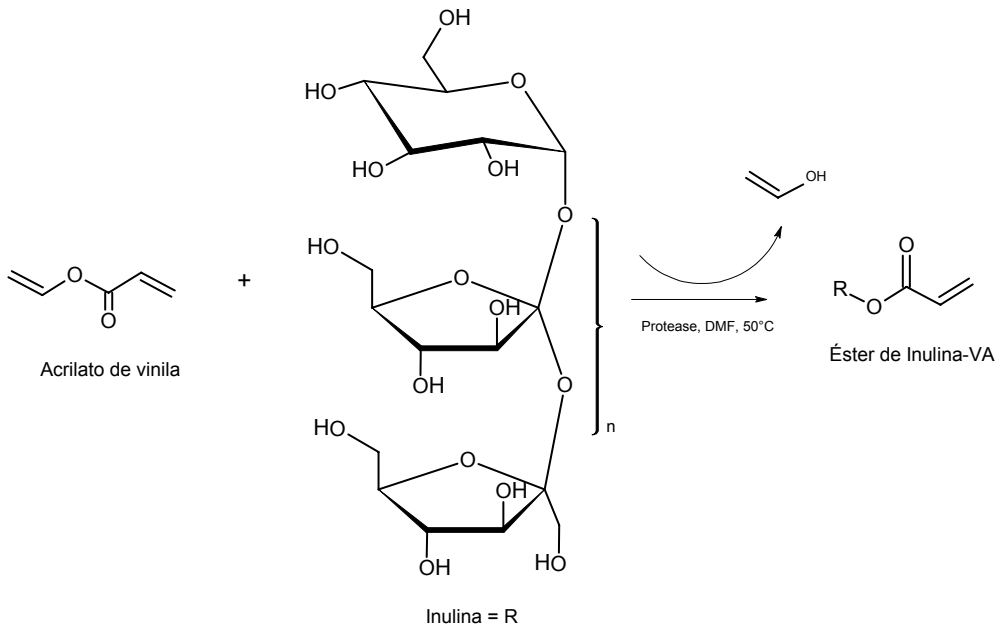


Figura 19: Esterificação enzimática de acrilato de vinila (VA), para formação do éster de inulina.

Lu et al. (2002) sintetizaram o polímero poli (1'-*O*-viniladipoil sacarose) por síntese químio-enzimática entre a sacarose e adipato de vinila, em piridina anidra, através de catálise com protease de *Bacillus subtilis*, a 60°C. Para a catálise química, foi empregado perssulfato de potássio e peróxido de hidrogênio. O rendimento da transesterificação foi de 55% em massa, em relação ao produto bruto, e o rendimento da polimerização foi de 62% em massa do produto obtido, em relação ao monômero de partida. O polímero obtido apresentou valores de M_n= 33.000, M_w= 53.200 e M_w/M_n= 1,61. A Figura 20 apresenta a obtenção do polímero obtido.

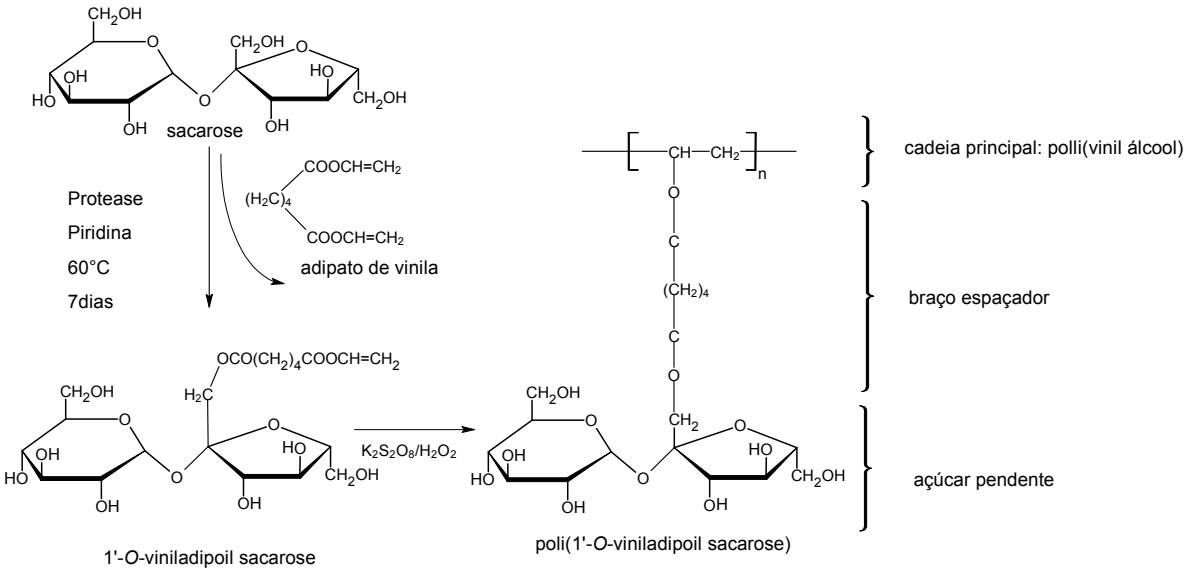


Figura 20: Reação químio-enzimática para obter poli (1'-*O*-viniladipoil sacarose) a partir de sacarose e adipato de vinila.

Tendo como objetivo produzir materiais biocompatíveis, Wu et al. (2002) obtiveram, por catálise enzimática, éster vinílico de lactose que, em seguida, foi polimerizado. A acilação da lactose ocorreu de forma regioseletiva, evitando a necessidade de múltiplas etapas de bloqueio/desbloqueio, comuns aos métodos químicos convencionais. A transestereficação do adipato de vinila com a lactose, em piridina, ocorreu após 3 dias de reação, a 50°C. O monômero 6'-*O*-viniladipoil sacarose foi obtido com 35% de rendimento (m/m), em relação ao produto bruto. O polímero poli (6'-*O*-viniladipoil lactose) foi obtido com 77% de rendimento (m/m), em relação ao monômero, e com valores de M_n= 21.200, M_w= 32.900, M_w/M_n= 1,56. A Figura 21 apresenta a síntese destes produtos.

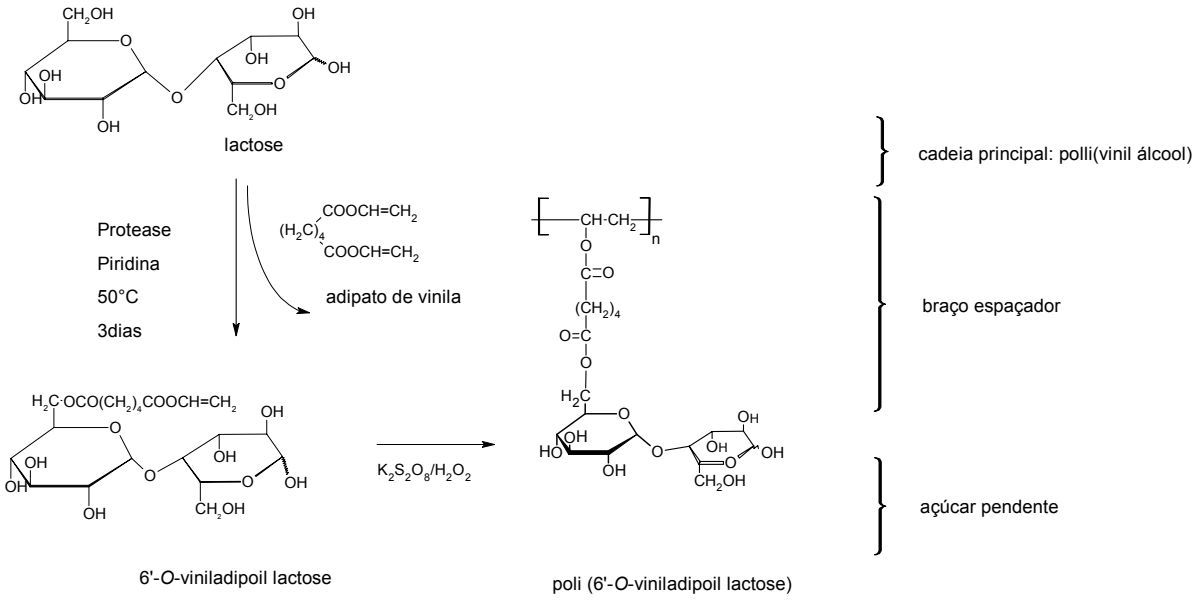
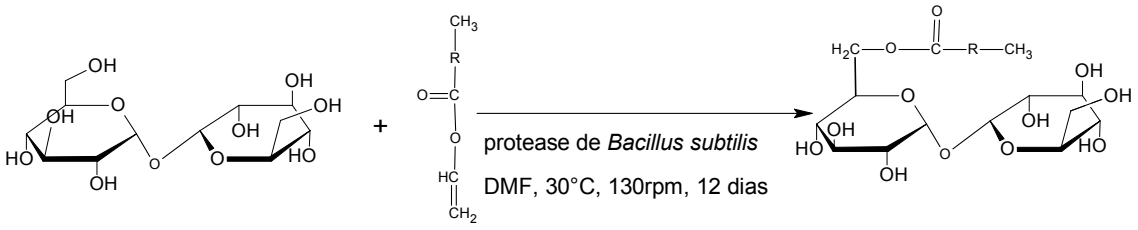


Figura 21: Transestereficação do adipato de vinila com lactose para a obtenção do polímero poli (6'-*O*-viniladipoil lactose).

Tokiwa et al. (2003) melhoraram a lipofilicidade da trehalose através de catálise enzimática regioseletiva de Protease de *Bacillus subtilis* com ésteres de ácidos graxos, em DMF. A modificação estrutural do açúcar (Figura 22) foi examinada, pelas medidas das tensões superficiais e biodegradabilidade.



$R = (CH_2)_{10}$ $R = (CH_2)_{16}$

$R = (CH_2)_{12}$ $R = (CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7$

$R = (CH_2)_{14}$ $R = (CH_2)_3(CH_2CH{=}CH)_2(CH_2)_7$

Figura 22: Esterificação enzimática de ésteres de trehalose, a partir de ésteres de ácido graxos.

A solubilidade em água do ácido 10-andecilênico, de propriedades anti-fúngicas, bactericidas e atividade antiviral, foi aumentada através da esterificação regioseletiva da D-glicose, trehalose e sacarose, em DMF, para formar os respectivos ésteres. As condições reacionais foram: 30°C por 7 dias, sob agitação de 130 rpm, empregando-se uma protease comercial (Bioprase conc.) de *Bacillus subtilis* como catalisador (RAKU, 2003). Os ésteres de açúcar obtidos foram: 6-*O*-(10-Andeciloil) D-glicose, 6-*O*-(10-Andeciloil) trehalose e 6-*O*-(10-Andeciloil) sacarose, com taxas de conversão de 64%, 41% e 75%, respectivamente, obtidas em HPLC equipado com uma coluna TOSOH TSK Gel amide-80, usando como eluente uma mistura de acetonitrila/água (3/1). A influência do açúcar incorporado sobre a estrutura do composto (Figura 23) foi analisada por ensaios de tensão superficial e biodegradabilidade.

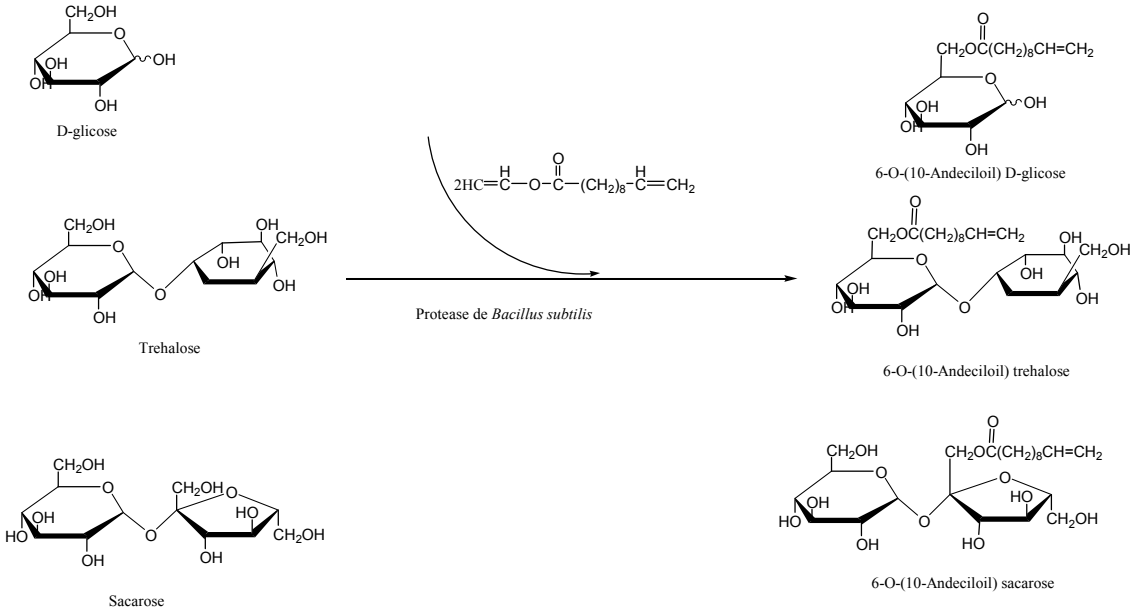


Figura 23: Esterificação regioseletiva entre a D-glicose, a trehalose e a sacarose com o éster de ácido 10-andecilênico.

Ésteres de açúcar também estão sendo empregados na inibição de *Streptococcus* cariogênicos. Demonstrou-se que o grupo *mutans* está relacionado com a cárie dental como seu principal agente etiológico (SHKLAIR,

1972), sendo conhecidas, atualmente, sete espécies do grupo *mutans* (HARDIE, 1986). Em amostras salivares, as espécies que se destacam em maior número de colônias isoladas são o *Streptococcus sobrinus* e o *Streptococcus mutans* (HÖFLING, 1999).

A Glicosiltransferase de *Streptococcus mutans* permite sintetizar polissacarídeos extracelulares aderentes (glucanas), a partir da sacarose *in situ*, servindo como sítios de aderência para o *Streptococcus*. Neste ambiente protegido pelas glucanas, o *Streptococcus sobrinus* e outros microorganismos formam uma comunidade protegida e estável (placa dentária), onde secretam grandes quantidades de ácidos metabólicos para desmineralizar o esmalte dos dentes e iniciar a cárie dentária (KONISHI, 1999).

Devulapalle et al. (2004) empregaram a inibição da Glicosiltransferase de *Streptococcus mutans* como estratégia para prevenção da cárie dentária. Assim, sintetizaram ésteres de sacarose, maltose e maltotriose, a partir dos respectivos açúcares com laurato de vinila, em uma mistura de 2-metil-2-butanol/DMSO, catalisada por lipase de *Humicola lanuginosa*, imobilizada em celite, a 40°C. Os açúcares foram acilados nas hidroxilas primárias do anel da glicose. Em seguida, os pesquisadores estudaram os efeitos inibidores destas bactérias em dois tipos de Glicosiltransferases. Os resultados comprovaram completa inibição de *Streptococcus sobrinus* em placas agar, viabilizando a introdução destes ésteres de açúcar em produtos de higiene oral, como agentes anti-placas e preventores de cáries dentárias. A Figura 24 apresenta a síntese destes três ésteres de açúcar.

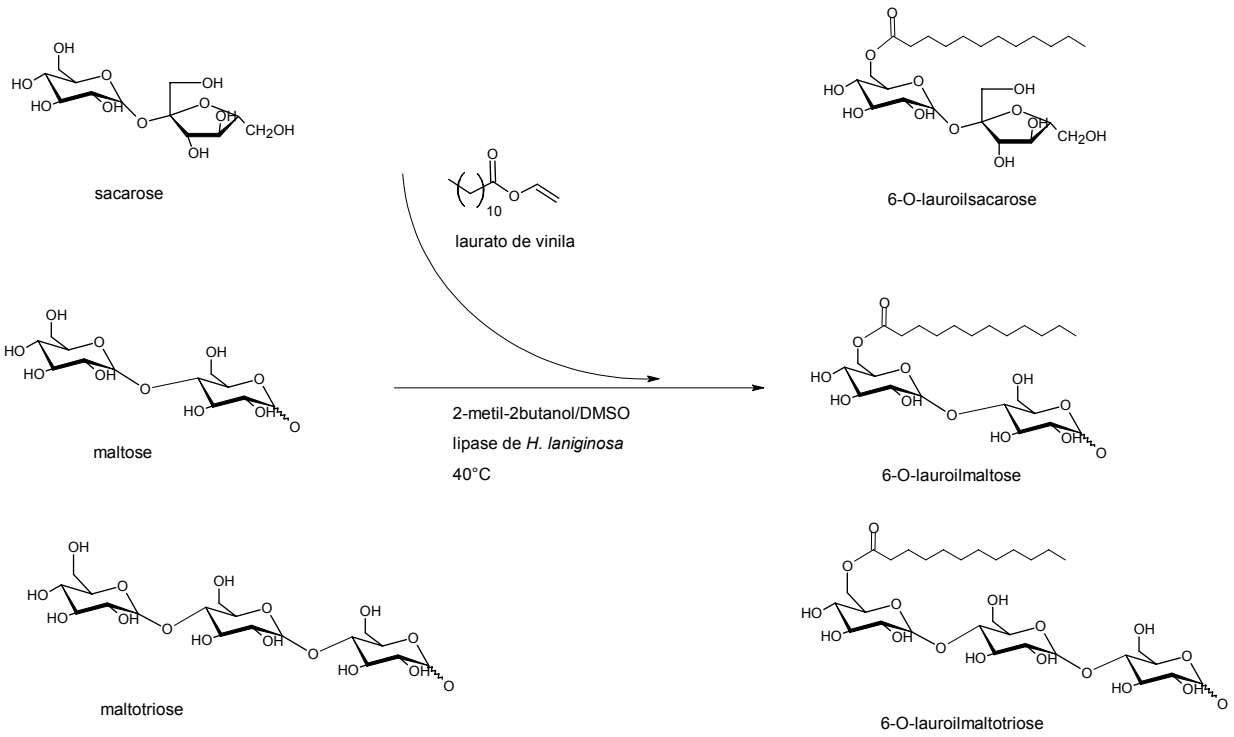


Figura 24: Síntese enzimática de ésteres de sacarose, maltose e maltotriose a partir dos respectivos açúcares com laurato de vinila, para uso como agentes anti-placa dentárias.

A isomaltulose ou Palatinose® é um isômero estrutural da sacarose, comercialmente utilizado na indústria de alimentos e, desde 1985, vem substituindo a sacarose no Japão (LINA, 2002). O interesse na isomaltulose é pelo fato deste ser um açúcar não cariogênico; com taxa de hidrólise muito baixa, quando comparada com a sacarose e maltose; com formação de monossacarídeos no organismo e possibilidade de se converter em uma mistura de açúcar-álcool com baixo valor calórico (KAWAGUTI, 2006). A isomaltulose apresenta um poder adoçante de 50% da sacarose, mas com propriedades orgalolépticas e físicas similares, além de ser recomendada como nutriente para diabéticos e não diabéticos (KAWAI, 1989). Em estudos experimentais com ratos, não apresentou nenhum efeito mutagênico ou teratogênico, nem qualquer tipo de toxicidade, sendo seguro seu uso em alimentos (LINA, 1997). A conversão de sacarose em isomaltulose pode ser obtida por enzimas livres (NAGAI, 1994), células livres (HEIKKILA, 2000) e células imobilizadas (SHIMIZU, 1982), empregando-se uma série de

microorganismos, como *Erwinia rhapontici*, *Klebsiella* sp. e outros. Kawaguti et al. (2006) empregaram a glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 imobilizada em células com diferentes soluções de alginato de sódio, a 30°C, por 96 horas. A Figura 25 apresenta a glicosiltransferase da sacarose para a obtenção da isomaltulose.

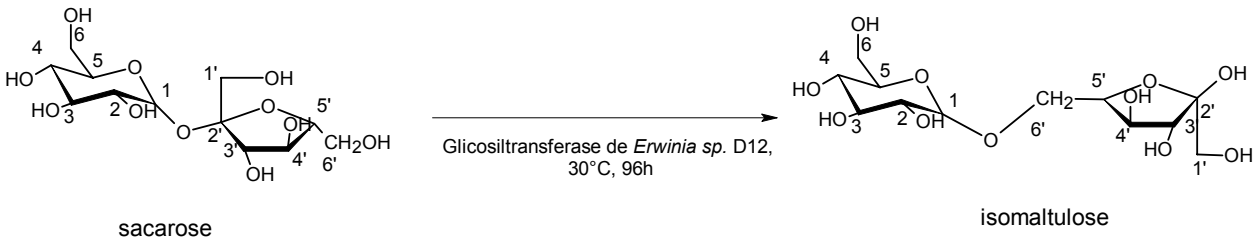


Figura 25: Conversão de sacarose em isomaltulose, através de catálise enzimática de glicosiltransferase de *Erwinia* sp. D12 imobilizada em células com diferentes soluções de alginato de sódio.

Despejos de hidrocarbonetos nos oceanos acarretam forte ação impactante nos sistemas biológicos (GARCIA-BORBOROGLU, 2006; LUCAS, 2006). Entretanto, populações naturais de microorganismos, que degradam óleo, atacam a maioria desses poluentes (ZINJARDE, 1997; CHAILLAN, 2004). Estes microorganismos modificam as superfícies celulares, ou produzem emulsificantes ao consumirem hidrocarbonetos solúveis ou insolúveis. Além da auto-produção de emulsificantes, muitos microorganismos melhoram a capacidade degradante, em resposta à adição de emulsificantes de origem química ou biológica (LEE, 2006).

Kelkar et al. (2006) sintetizaram, enzimaticamente, o éster lauroil glicose a partir de uma mistura de glicose e ácido láurico (1:2) em álcool *t*-butílico (TBA), a 50°C, após 96 horas, empregando lipase de *Thermomyces langinosus*, como catalisador. Este éster de açúcar foi capaz de emulsificar: (1) hidrocarbonetos aromáticos, como benzeno, tolueno e xileno; (2) alcanos de longa cadeia, como: o *n*-decano e o *n*-hexadecano; (3) brometos de alcano de longa cadeia, como 1-bromodecano e 1-bromohexadecano. Também foram investigados os efeitos desse éster de glicose como adjuvante na degradação

de óleo cru pela espécie tropical marinha *Rhodococcus* sp., conhecida por sua eficiência natural como degradante de óleos. A cultura mostrou aumento da degradação do óleo, quando o éster Lauroil glicose foi empregado como emulsificante. Foi possível degradar 70% da fração alifática de óleo cru de "Bombay High" na presença do éster de açúcar a 200mg/mL, comparado a 50% sem emulsificante.

No artigo o autor não revela a fórmula estrutural do éster Lauroil glicose, não sendo possível saber em qual hidroxila ocorreu a esterificação. Assim, a título de ilustração, a Figura 26 apresenta um esquema da síntese do emulsificante.

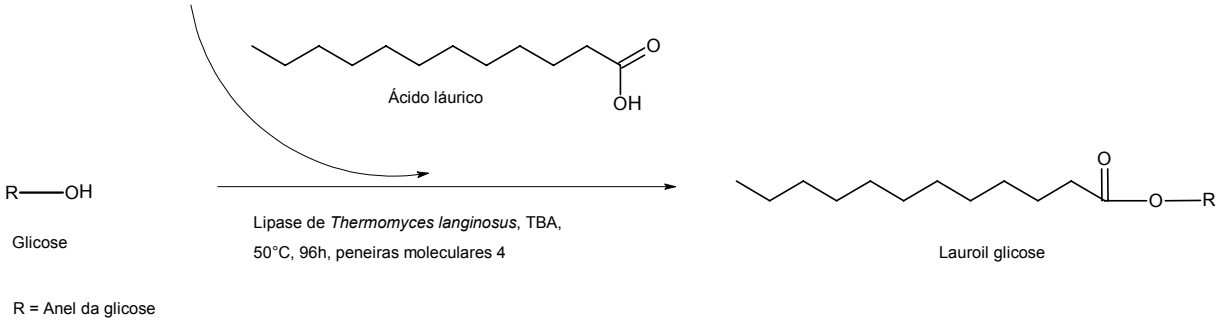
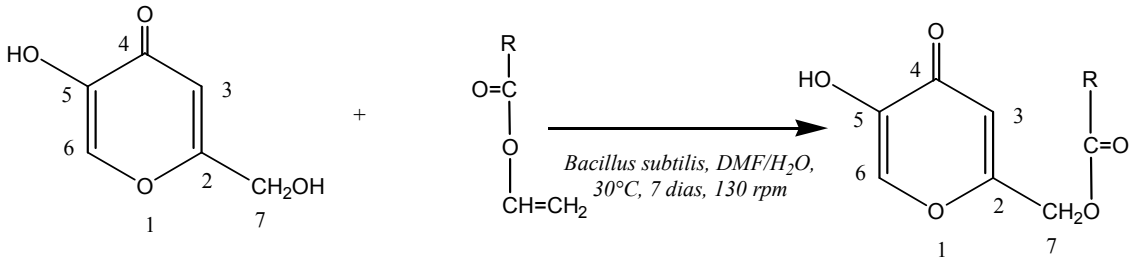


Figura 26: Síntese enzimática do éster lauroil glicose a partir de uma mistura de glicose e ácido láurico (1:2) em álcool *t*-butílico (TBA).

Ácido Kojic é um composto de baixo custo obtido a partir de carboidratos, particularmente de glicose e amido, por meio de microorganismos como *Aspergillus* sp.(WINDHOLZ, 1976). Caracteriza-se por ser um agente inibidor da tirosinase, sendo que as suas principais aplicações são: em cosméticos para clareamento de pele (KAHN, 1995); como antifúngico (KAYAHARA, 1990) e como removedor de manchas (UCHINO, 1988). Raku et al (2003) melhoraram a lipofilicidade do ácido kojic por transesterificação com uma série de ésteres vinílicos: adipato de vinila, hexanoato de vinila, octanoato de vinila e decanoato de vinila, usando protease de *Bacillus subtilis*, em DMF/água, a 30°C, durante 7 dias, sob agitação de 130rpm (Figura 27). As conversões em ésteres de ácido kojic variaram de 13 a 27%. Em todos os

casos, a esterificação ocorreu somente no grupo hidroxila do carbono primário (posição C-7), em uma única etapa de reação. Entretanto, seria muito difícil esterificar, regioseletivamente, o ácido kojic, nesta posição, por catálise química convencional (RAKU, 2003).



$R=(CH_2)_4COOCH=CH_2$	adipato de vinila	7-*O*-vinil adipoil kojic acid
$R=(CH_2)_4CH_3$	hexanoato de vinila	7-*O*-hexanoil kojic acid
$R=(CH_2)_6CH_3$	octanoato de vinila	7-*O*-octanoil kojic acid
$R=(CH_2)_8CH_3$	decanoato de vinila	7-*O*-decanoill kojic acid

Figura 27: Síntese enzimática de ésteres de ácido kojic, a partir de uma série de ésteres vinílicos: divinil adipato, vinil hexanoato, vinil octanoato e vinil decanoato.

CAPÍTULO 4

BIOSSURFACTANTES E BIOPOLÍMEROS DE AÇÚCAR PROPOSTOS

4 – BIOSSURFACTANTES E BIOPOLÍMEROS DE AÇÚCAR PROPOSTOS

Para atingir os objetivos propostos nesta pesquisa, fez-se necessário compreender a metodologia de transesterificação catalisada por enzimas, de uma maneira mais aprofundada, para a síntese efetiva de ésteres de polióis como reações modelo. Assim, o trabalho foi dividido em duas etapas. A primeira ocorreu no período entre julho de 2001 a agosto de 2002, no *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* (AIST), em Tsukuba, no Japão. Foram sintetizados quatro biossurfactantes, por catálise enzimática com protease de *Bacillus subtilis* em meio orgânico (DMF), onde a parte hidrofílica usada foi a sacarose e a parte hidrofóbica consistia de quatro ésteres vinílicos com diferentes tamanhos de cadeia carbônica: $CH_3(CH_2)_XCOOCHCH_2$ (x=4; 6; 8 e 10). Foi investigada a influência: (1) da concentração de enzima; (2) da razão água/ solvente orgânico (v/v) e (3) do tamanho da cadeia carbônica dos ésteres vinílicos nas conversões de sacarose em ésteres de sacarose. As conversões foram avaliadas por HPLC, através do decréscimo relativo das áreas dos picos de sacarose nos cromatogramas, em alíquotas tomadas periodicamente, em relação ao branco (meio reacional sem enzima no tempo zero).

Ainda nesta etapa, foi investigada a síntese de um polímero como reação modelo de síntese químio-enzimática. Para a obtenção do monômero, empregaram-se os substratos: ácido ascórbico e adipato de vinila, em DMF. Foi investigada a influência: (1) da concentração de enzima; (2) da razão água/ solvente orgânico (v/v) e (3) da temperatura, nas conversões de ácido ascórbico em éster de ácido ascórbico. Pelo fato do monômero obtido possuir uma insaturação na ponta da cadeia, foi possível polimerizá-lo, por catálise química, com α,α'-Azobis-isobutironitrila (AIBN).

A segunda etapa da pesquisa teve início em março de 2003 no Laboratório de Biopolímeros da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde foi necessária a aquisição de novos equipamentos e a adaptação de

outros existentes para a implementação da metodologia utilizada na síntese químico-enzimática dos biossurfactantes e polímeros propostos nesta tese.

Sacarose, D-glicose e L-arabinose foram selecionados para compor a parte hidrofílica dos ésteres de açúcar, enquanto que para a parte hidrofóbica foram selecionados os ésteres: laurato de vinila e adipato de vinila. Para a transesterificação enzimática, empregou-se protease alcalina de *Bacillus subtilis* e o solvente N,N-dimetilformamida (DMF).

Foram sintetizados três ésteres de açúcar não-polimerizáveis, empregando-se, como doador de acila, o laurato de vinila, e três ésteres de açúcar polimerizáveis, utilizando-se, como doador de acila, o adipato de vinila. A polimerização destes três últimos compostos, por catálise química com perssulfato de potássio e peróxido de hidrogênio, foi possível devido à presença de uma insaturação na ponta da cadeia.

Pelo fato da complexidade de interações entre todas as variáveis estudadas, recorreu-se a uma análise estatística experimental (*Design of Experiments*- DOE), para a determinação das condições ótimas de síntese. Assim, empregou-se metodologia de resposta de superfície (*Response Surface Metodology*- RSM), através do sistema MODDE 7.0™ (Umetrics AB, Sweden).

A Figura 28 ilustra a síntese enzimática dos produtos obtidos na primeira etapa da pesquisa (Japão) e a Figura 29 ilustra a síntese dos produtos obtidos na segunda etapa da pesquisa (Brasil).

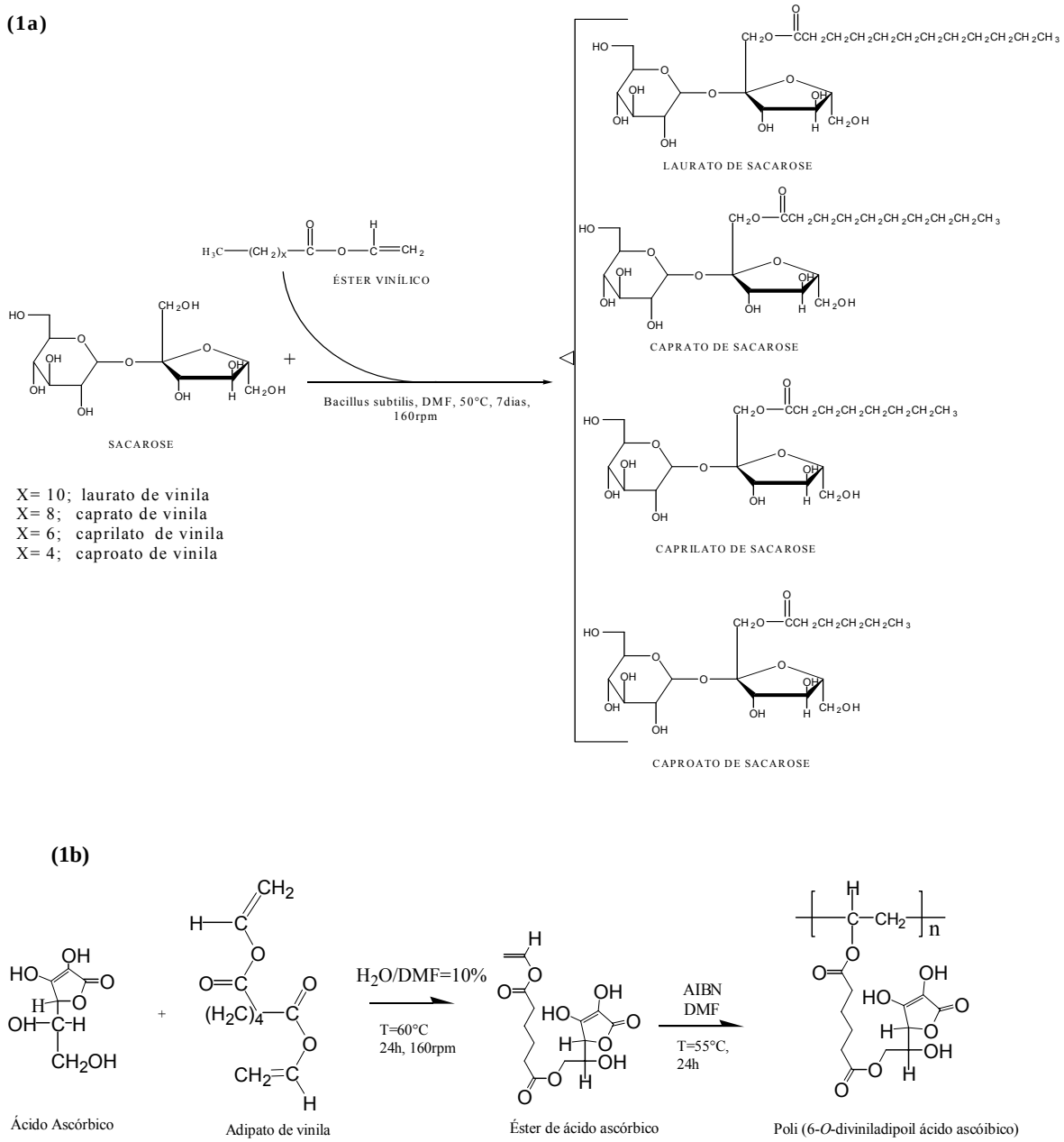


Figura 28: Produtos obtidos na primeira etapa da pesquisa (Japão). (1a) síntese enzimática dos ésteres de sacarose e; (1b) síntese do polímero de ácido ascórbico.

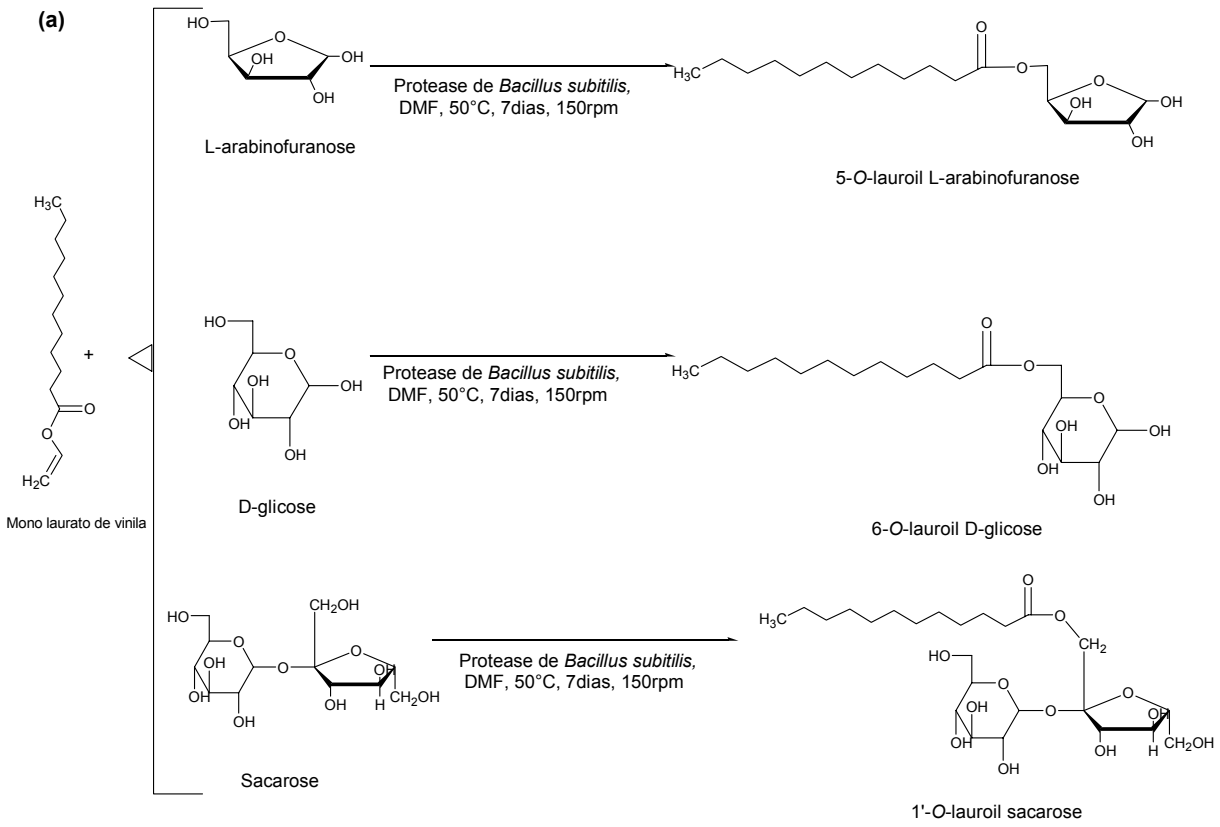


Figura 29a: Produtos obtidos na segunda etapa da pesquisa (Brasil): síntese enzimática dos ésteres de açúcar não polimerizáveis.

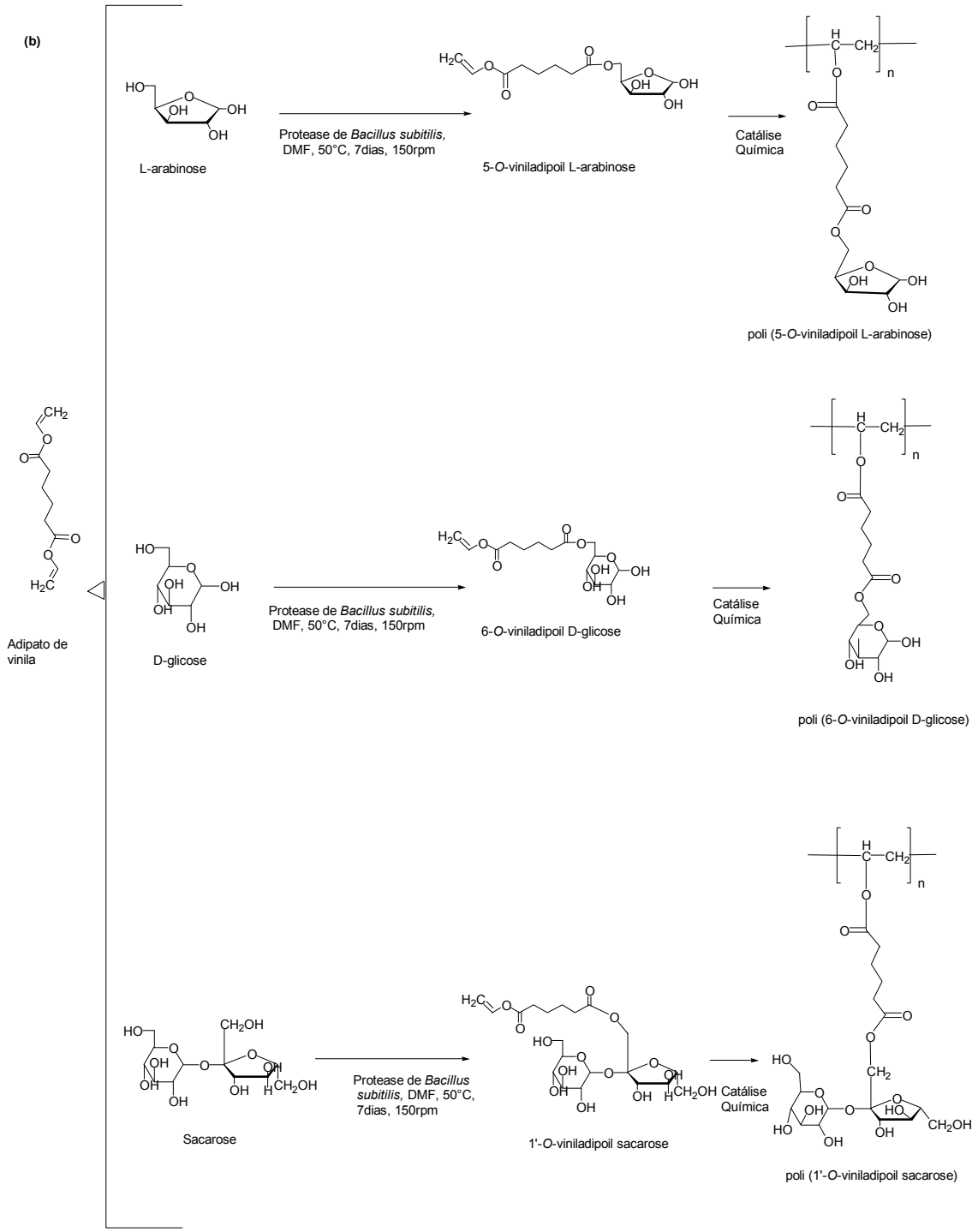


Figura 29b: Produtos obtidos na segunda etapa da pesquisa (Brasil): ésteres de açúcar polimerizáveis, seguida de catálise química para a obtenção dos polímeros.

Os detalhes da síntese de cada produto serão descritos no CAPÍTULO 5 (MATERIAIS E MÉTODOS).

CAPÍTULO 5

MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos ésteres de sacarose, de ácido ascórbico e do polímero de ácido ascórbico – 1ª etapa

5.1.1 Materiais

A protease alcalina de *Bacillus subtilis*, Bioprase (0,16 U/mg), foi adquirida da Nagase Chemex Co. LTD. A sacarose, o ácido ascórbico, as peneiras moleculares de 0,3nm, os ésteres vinílicos de ácido láurico (laurato de vinila), ácido cáprico (caprato de vinila), ácido caprílico (caprilato de vinila) e de ácido capróico (caproato de vinila) e o éster divinílico de ácido adípico (adipato de vinila) foram adquiridos da Wako Pure Chemical Ind. Ltd. O DMF; o DMSO-*d6* da Dojin Kagaku; o iniciador α,α'-Azobis-isobutironitrila (AIBN), o acetato de metila, o metanol e o ácido sulfúrico da Tokyo Kasei e a sílica gel da Merck. Todos os produtos químicos e solventes usados neste trabalho foram avaliados comercialmente como de alta pureza (grau analítico).

5.1.2 Equipamentos

Os principais equipamentos empregados nesta etapa foram:
- Sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), marca Shimadzu, equipado com detector de índice de refração e de UV-visível
- Espectrômetro de RMN JEOL: JNM-EX270, 67.8 MHz
- Sistema de cromatografia líquida de permeação em gel (GPC), marca TOSOH SC-8020, equipado com detector de índice de refração

5.1.3 Métodos analíticos

As análises qualitativas dos ésteres de sacarose e de ácido ascórbico foram realizadas por cromatografia de camada delgada (TLC) sobre placas de sílica gel 60F, (Merck), com solvente consistindo de acetato de metila/ metanol/ água (7/2/1). Os produtos foram revelados por pulverização de solução de H_2SO_4 (10%), após aquecimento.

As análises quantitativas para a determinação da conversão da sacarose e do ácido ascórbico, em seus respectivos ésteres, foram realizadas através de um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), marca Shimadzu, equipado com detector de índice de refração e de UV-visível e uma coluna para análise de carboidratos, TSK gel amide-80 (TOSOH: 4,6 mm x 25 cm). A fase móvel empregada foi uma solução constituída de 75% de acetonitrila e 25% de água, com fluxo de 1,0 mL/min. As taxas de conversão foram determinadas pela concentração da sacarose e do ácido ascórbico na mistura reacional.

As estruturas químicas dos produtos e a posição de acilação foram determinadas por ^{13}C-RMN (JEOL: JNM-EX270, 67.8 MHz). O solvente usado foi o DMSO-*d6* e a referência interna usada foi o trimetilsilano. A determinação da posição de acilação, baseou-se na técnica de análise de ^{13}C-RMN proposta por Yoshimoto (1980), que considera que a acilação de um grupo hidroxila geralmente causa uma mudança no deslocamento químico no sinal relativo ao carbono *O*-acilado, para campo baixo, e uma mudança no deslocamento químico do sinal relativo ao carbono vizinho para campo alto. As posições dos deslocamentos químicos foram identificadas com auxílio do programa CS ChemDraw Ultra da CambridgeSoft Corporation.

A massa molar numérica média (M_n), a massa molar ponderal média (M_w) e a polidispersão (PD) do polímero de ácido ascórbico foram determinados por cromatografia de permeação em gel (GPC), com detector de índice de refração em um HPLC TOSOH SC-8020 equipado com uma coluna de análise TSK gel α-M + α-4000, sendo a fase móvel constituída por uma solução de LiBr (10 mM) em DMF e com fluxo de 0,6mL/min.

5.1.4 A influência da concentração de enzima na taxa de conversão dos ésteres de sacarose

Foi investigada a influência da concentração de enzima na conversão de sacarose em ésteres de sacarose. As concentrações de protease de *Bacillus subtilis* empregadas foram de 5, 10, 20 e 40 mg/mL. Inicialmente, o DMF foi

colocado em um frasco tampado, contendo peneiras moleculares de 0,3 nm, durante 24 horas, sob agitação, para a retirada da água residual. Este procedimento foi adotado para todas as reações enzimáticas descritas nesta primeira etapa. As reações iniciaram logo após a adição da enzima no DMF, contendo sacarose (0,125 M) e os ésteres vinílicos (0,500 M). O volume total das amostras foi de 5 mL. As reações ocorreram em incubadora de agitação orbital, a 30°C, com agitação de 160 rpm, durante 7 dias. Alíquotas diárias de 150 µL foram retiradas e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos, para a separação da enzima do meio reacional, com a finalidade de interromper a reação. Em seguida, 10 µL de cada alíquota foi injetada no HPLC para a determinação da conversão de sacarose em éster de sacarose. Análises qualitativas por TLC das alíquotas confirmaram a obtenção dos produtos.

5.1.5 A influência do tamanho da cadeia dos ésteres vinílicos na taxa de conversão dos ésteres de sacarose

A partir dos resultados anteriores, considerando-se a concentração de enzima de 40mg/mL, foi possível fazer a correlação entre a influência do tamanho da cadeia carbônica dos doadores de acila nas conversões dos ésteres de sacarose. Os ésteres vinílicos utilizados foram o laurato de vinila (C10), o caprato de vinila (C8), o caprilato de vinila (C6) e o caproato de vinila (C4) à concentração de 0,500 M. As reações transcorreram nas mesmas condições descritas no item 5.1.4.

5.1.6 A influência da adição de água na taxa de conversão dos ésteres de sacarose

Tem sido reportado que a protease de *Bacillus subtilis* apresentou atividade catalítica em DMF (THERISOD, 1986; RIVA, 1988) e transesterificações apresentaram estabilidade no meio reacional, alcançando mais do que 80% de rendimento, mesmo após seu uso repetido por cinco vezes (KITAGAWA, 1997). Neste trabalho foi investigado o efeito da adição de água na síntese enzimática dos ésteres de sacarose, catalisada por protease de *Bacillus subtilis.* Para isto, sacarose (0,125 M) e laurato de vinila (0,500 M)

foram dissolvidos em uma série de razões água/DMF: 0/100; 10/90; 20/80; 40/60 e 100/0 (v/v). Em seguida, protease de *Bacillus subtilis* foi adicionada em duas concentrações: 5 e 40 mg/mL, para início imediato das reações. As amostras foram colocadas em uma incubadora de agitação orbital a 30°C, 160 rpm, por uma hora. Alíquotas de 150 µL foram retiradas a cada 10 minutos, centrifugadas a 10.000 rpm, por 15 minutos, para interromper a reação. As conversões foram determinadas por análises em HPLC, pelo mesmo processo descrito no item 5.1.4.

5.1.7 Síntese dos ésteres de sacarose

Para a síntese efetiva dos ésteres de sacarose, as condições reacionais adotadas foram aquelas que representaram os maiores valores para as conversões.

O volume total da fase líquida foi de 150 mL. A sacarose (0,125M) e os ésteres vinílicos (0,500M) foram dissolvidos na mistura água/DMF (10/90). A reação teve início logo após a adição da enzima (40 mg/mL). As amostras foram colocadas na incubadora de agitação orbital, a 30°C, durante 24 horas e a 130 rpm. Alíquotas de 150 µL foram retiradas a cada hora, para análise no HPLC, seguindo o mesmo procedimento já descrito anteriormente. Após 24 horas, as misturas foram filtradas, em papel de filtro, para a separação da enzima e interrupção da reação. Em seguida, o filtrado de cada mistura foi concentrado em um evaporador rotativo por 2 horas, a 50°C, sob alto vácuo, para a retirada do DMF. O produto obtido foi separado, secado a vácuo, a 40°C, por 24 horas, e pesado (produto bruto).

5.1.8 Purificação dos ésteres de sacarose e caracterização por ^{13}C-RMN

A purificação do produto bruto foi efetivada em uma coluna cromatográfica com placa porosa e preenchida com sílica-gel 200 mesh, na razão sílica/amostra 10:1 (m/m). A fase móvel foi constituída pela mistura $CHCl_3$/ CH_3OH: 1/0; 9/1; 1/1 (v/v), para a separação das fases. Este processo foi acompanhado por análises em TLC com uma fase móvel constituída de

acetato de etila/metanol/água (17/2/1). A fase contendo o éster de sacarose foi concentrada no evaporador rotativo a 30°C, seguida de secagem a vácuo a 40°C, por 24 horas. A massa do material purificado foi comparada com a massa do produto bruto. Amostras de, aproximadamente, 100 mg de sacarose e dos ésteres de sacarose foram dissolvidas em DMSO-*d6* na razão 100 mg/700 µL para a caracterização de suas estruturas por ^{13}C-RMN.

A determinação da posição de acilação, baseou-se na técnica de análise de ^{13}C-RMN proposta por Yoshimoto (1980), na qual afirma que a acilação de um grupo hidroxila, geralmente, causa deslocamento químico para campo baixo no sinal relativo ao carbono *O*-acilado e um deslocamento químico de campo alto no sinal relativo ao carbono vizinho.

5.1.9 Influência da concentração de enzima, da razão água/DMF e da temperatura na síntese do éster vinílico de ácido ascórbico

A transesterificação do adipato de vinila com o ácido ascórbico, em DMF, foi investigada, através de análise qualitativa por TLC, sob duas condições catalíticas: (a) com protease de *Bacillus subtilis*; (b) sem protease de *Bacillus subtilis*. Para ambos os casos, a influência da razão água/DMF (0, 5, 10 e 50 %) e da variação de temperatura (30 e 60°C) foram avaliadas qualitativamente, nas taxas de conversão dos produtos.

Ácido ascórbico (0,125 M) e adipato de vinila (0,500 M) foram dissolvidos nas soluções de água/DMF. Em quatro frascos foram adicionados 40 mg/mL de enzima e outros quatro frascos não receberam enzima. Os oito frascos foram colocados em uma incubadora de agitação orbital, a 30°C e 160 rpm de agitação, por 24 horas. Um outro frasco, que não recebeu nem enzima e nem água, foi colocado em outra incubadora de agitação orbital, nas mesmas condições, exceto em relação à temperatura (60°C).

Alíquotas foram retiradas a cada hora no intervalo de 1 a 8 horas. As amostras com enzima foram centrifugadas nas mesmas condições já mencionadas anteriormente e todas as alíquotas foram submetidas à análise de TLC, com uma fase móvel consistindo de acetato de etila/ metanol/ água

(7/2/1). A confirmação dos produtos foi conseguida através da verificação das marcas nas placas de sílica gel.

5.1.10 Síntese do éster vinílico de ácido ascórbico

Tomando-se por base os resultados obtidos no item 5.1.9, as condições reacionais para a síntese do éster vinílico de ácido ascórbico foram: ácido ascórbico (0,125 M), adipato de vinila (0,500 M) e razão água/DMF igual a 10/90 (v/v). Inicialmente, o ácido ascórbico foi diluído na solução água/DMF. Em seguida, foi adicionado o adipato de vinila. Não foi adicionada enzima, pois se verificou, por análise em TLC, que a reação iniciava imediatamente após a adição do adipato de vinila, ou seja, a reação era do tipo auto-catalisada. Imediatamente a mistura foi colocada na incubadora de agitação orbital (160 rpm) a 60°C, por 24 horas. Alíquotas foram retiradas a cada hora e analisadas em HPLC, equipado com detector de UV, para a determinação das conversões. Ao final da reação, a amostra foi concentrada em evaporador rotativo sob alto vácuo, à 50°C, para a retirada do DMF, e secada a vácuo por 24 horas, a 40°C, seguida de pesagem (produto bruto).

5.1.11 Purificação do éster vinílico de ácido ascórbico e caracterização por ^{13}C-RMN

A purificação do éster vinílico de ácido ascórbico, por coluna cromatográfica, seguiu o mesmo procedimento descrito para a purificação dos ésteres de sacarose. Para a caracterização das estruturas por ^{13}C-RMN, cerca de 100mg de ácido ascórbico e do éster de ácido ascórbico foram dissolvidos em DMSO-*d6*, na razão 100 mg/700 µL.

5.1.12 Determinação dos valores de HLB

Os valores de HLB dos ésteres de sacarose e do éster vinílico de ácido ascórbico foram obtidos a partir da equação de Griffin (1949).

$$HLB = 20 * \frac{M_h}{M} \quad (2)$$

Onde $\mathbf{M_h}$ representa a massa molar da parte hidrofílica e **M** corresponde à massa molar total do surfactante.

5.1.13 Polimerização do 6-*O*-(vinil adipoil - ácido ascórbico)

Uma mistura contendo 0,20 g do monômero, 0,20 mL de DMF e 2,0 mg (1% m/m) de AIBN foi colocada em um tubo selado, com atmosfera inerte de N_2(g), a 55°C, por 24 horas. O tubo selado foi aberto e o produto resultante foi lavado em acetona para posterior determinação da massa molar.

5.1.14 Determinação da massa molar do poli (6-*O*-vinil adipoil - ácido ascórbico) por GPC

Para a determinação da massa molar do poli (6-*O*-viniladipolil - ácido ascórbico), foi preparada uma solução de 1,00 mg/mL do polímero em DMF, contendo 10 mM de LiBr, e deixada sob agitação por 2 horas. Em seguida, a solução foi passada por um disco filtrante com tamanho de poros igual a 0,22 µm. Finalmente, 20 µL da amostra filtrada foi injetada no cromatógrafo (GPC). O cromatograma obtido forneceu, diretamente, os valores da massa molar numérica média (M_n), da massa molar ponderal média (M_w) e da Polidispersão (PD). Para a obtenção da curva de calibração foram usados padrões de poliestireno com massas de $500 \leq M_w \leq 8{,}42 \times 10^6$ TOSOH.

5.2 Obtenção dos ésteres de sacarose, D-glicose, L-arabinose e dos respectivos polímeros – 2ª etapa

5.2.1 Materiais

A protease de *Bacillus subtilis* alcalina (100 a 200 U/mg) foi, gentilmente, cedida pela BIOVET-PESHTERA (Bulgária), por intermédio da empresa REIZA-KERN INDÚSTRIA E COMÉRCIO. Os ésteres laurato de vinila e adipato de vinila foram adquiridos da Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd (Japão). A

sacarose e a D-glicose foram adquiridas da Labsynth (Brasil), a L-arabinose da Merck (EUA), o DMF da Quimex (Brasil) e o DMSO da Vetec (Brasil). Todos os produtos químicos e solventes usados neste trabalho foram avaliados comercialmente como de alta pureza (grau analítico).

5.2.2 Equipamentos

Os principais equipamentos empregados nesta etapa foram:

- sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), marca Varian 9002, equipado com injetor Rheodyne, modelo 7125, detector de índice de refração, modelo Star 9040 e interface STAR 800
- Espectrômetro de RMN Mercury 200 MHz
- Espectrofotômetro de Infravermelho, marca ABB Bomen
- Tensiômetro Thermo Cahn Dynamic Contact Angle (DCA) Series 300
- Lubricidímetro da Fann Instruments
- Incubadora de agitação orbital modelo CT-712 R da Cientec.

5.2.3 Métodos Analíticos

As análises qualitativas dos ésteres de açúcar foram realizadas por cromatografia de camada delgada (TLC) sobre placas de sílica gel 60F, adquiridas da Merck, utilizando o mesmo procedimento descrito no item 5.1.3.

As análises quantitativas para a determinação das conversões de sacarose em laurato de sacarose (reação modelo) foram feitas, empregando-se um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), marca Varian 9002, equipado com detector de índice de refração e uma coluna para análise de carboidratos, MetaCarb 87P (150 x 7,8) mm. A fase móvel empregada foi água deionizada, filtrada em membrana de acetato de celulose (0,45 µm). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min.

A estrutura química dos produtos e a posição de acilação (YOSHIMOTO, 1980) foram determinadas por ^{13}C-RMN, em espectrômetro de Ressonância

Magnética Nuclear Mercury 200 MHz. Os solventes usados foram o DMSO-*d6* e D_2O. A referência interna usada foi o trimetilsilano. As posições dos deslocamentos químicos foram identificadas com auxílio do programa CS ChemDraw Ultra da CambridgeSoft Corporation.

A determinação da estrutura química dos monômeros e polímeros também foi realizada por intermédio de um espectrofotômetro de Infravermelho, marca ABB Bomen, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1}.

A determinação das massas molares dos polímeros foi realizada através de Cromatografia de Permeação em Gel, em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência, marca Varian 9002-SDS, equipado com injetor Rheodyne, modelo 7125, detector de índice de refração, modelo Star 9040, interface STAR 800 e uma colunaTSK-GEL GMPWXL TOSOH (300 x 7,8) mm.

A concentração micelar crítica (CMC) de todos os ésteres de açúcar foram obtidos a partir das curvas de tensão superficial em função da concentração. Os ensaios de tensão superficial foram realizados em um equipamento Thermo Cahn Dynamic Contact Angle (DCA) Series 300.

Os coeficientes de lubricidade dos ésteres de açúcar não-polimerizáveis: 5-*O*-lauroil L-arabinose (laurato de L-arabinose), 6-*O*-lauroil D-glicose (laurato de D-glicose) e 1'-*O*-lauroil sacarose (laurato de sacarose) foram determinados em um lubricidímetro da Fann Instruments.

5.2.4 Otimização das variáveis por DOE ("Design of Experiments")

Para a otimização das variáveis independentes (fatores) na síntese dos ésteres de açúcar, tomou-se por base a reação entre o laurato de vinila e a sacarose. Os efeitos da concentração de enzima (E), da razão molar composto vinílico/sacarose (XM), da razão água/DMF (AG), da temperatura (TE) e do tempo (TPO) na síntese do laurato de sacarose foram determinados, usando-se análise fatorial por RSM (*Response Surface Methodology*)

RSM é uma técnica estatística de grande utilidade na investigação e otimização de trabalhos complexos, que permite a avaliação dos múltiplos parâmetros independentes, ou combinados entre si, na resposta final do processo. Sua principal vantagem é o número reduzido de experimentos necessários para permitir resultados aceitáveis estatisticamente.

O sistema MODDE 7.0™ foi utilizado na combinação estratégica entre E, XM, AG, TE e TPO, através do método dos mínimos quadrados, também conhecido na literatura como MLR (*Multiple Linear Regression*), para o caso de múltiplos fatores. Esta combinação de variáveis foi arquitetada de acordo com um modelo fatorial completo (*D-Optimal*) com 22 experimentos, mais 3 pontos centrais, totalizando 25 ensaios. Um modelo quadrático pode gerar uma superfície tridimensional, representando a resposta (conversão em produtos) em função das variáveis independentes. O modelo polinomial das curvas da função CONVERSÃO, em função das variáveis independentes, pode ser representado como:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{5} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{5} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{4} \sum_{j=i+1}^{5} \beta_{ij} X_i X_j \qquad (1)$$

Onde:

Y = conversão

X_i (i=1 a 5) = variáveis independentes

β_0 = coeficiente linear

β_i = coeficientes para o modelo de primeira ordem

β_{ii} = coeficientes quadráticos para as i-ésimas variáveis

β_{ij} = coeficientes para as interações das variáveis i e j

O modelo quadrático completo inclui as variáveis independentes e suas interações, fornecendo os seus respectivos coeficientes. Para o caso em questão, a Equação 3 pode ser escrita como:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 TPO + \beta_3 XM + \beta_4 AG + \beta_5 TE + \beta_{11} E*TPO + \beta_{12} E*XM + \beta_{13} E*AG + \beta_{14} E*TE + \beta_{22} TPO*XM + \beta_{23} TPO*AG + \beta_{24} TPO*TE + \beta_{34} XM*TE + \beta_{44} AG*TE \quad (4)$$

A Tabela 2 apresenta os fatores e seus limites investigados por este modelo fatorial.

Tabela 2: Fatores e seus limites no modelo fatorial.

FATORES	*UNIDADES*	*QUANTITATIVO*	**ESCALA MLR**
Concentração de enzima	E (mg/mL)	10; 20; 40	Ortogonal
Tempo	TPO (dias)	1; 3; 5; 7	Ortogonal
Razão molar vinil/sacarose	XM	1; 2; 4	Ortogonal
Razão H2O/DMF	A/DMF (%)	0; 10; 20	Ortogonal
Temperatura	TE (°C)	30; 50	Ortogonal

Em seguida, o sistema gerou uma matriz de experimentos para os fatores investigados, na qual os resultados das taxas de conversão (respostas), obtidos no HPLC, devem ser incluídos após os ensaios em laboratório.

5.2.5 Síntese dos ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose

Inicialmente, os açúcares (0,125 M) foram dissolvidos em DMF a 50°C. Em seguida, foI introduzido o laurato de vinila (0,500 M). A transesterificação teve início, logo após a introdução da enzima (40 mg/mL). As suspensões foram colocadas em uma incubadora de agitação orbital a 150rpm, durante 7 dias, a 50°C. As reações foram encerradas pela retirada da enzima do meio reacional, por filtração. O DMF foi retirado por intermédio de um evaporador rotativo acoplado a uma bomba de alto-vácuo.

5.2.6 Purificação dos ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose e caracterização por ^{13}C-RMN

Foram utilizadas duas metodologias distintas para a purificação destes ésteres: (1) coluna cromatográfica e (2) extração em acetona a quente (50°C). O primeiro método foi empregado, apenas, na amostra de 1'-*O*-lauroil sacarose, para fins de comparação de resultados. O segundo método foi adaptado do trabalho de Yan (2001) e empregado na purificação dos três produtos. Para a caracterização estrutural por ^{13}C-RMN, cerca de 100 mg dos açúcares e de seus ésteres foram dissolvidos em DMSO-*d6*, na razão 100 mg/700µL.

5.2.6.1 Purificação do éster 1'-*O*-lauroil sacarose por coluna cromatográfica

A purificação do produto bruto foi efetivada em uma coluna cromatográfica preenchida com sílica-gel 230 mesh, na razão sílica/amostra 10:1 (m/m). A fase móvel foi constituída pelas misturas $CHCl_3$/ CH_3OH: 1/0; 9/1; 1/1 (v/v), até a separação completa das fases. O processo de separação foi acompanhado por análises em TLC com uma fase móvel constituída de acetato de etila/metanol/ água (17/2/1). A fase contendo o éster de sacarose foi concentrada no evaporador rotativo a 30°C, seguida de secagem a vácuo a 40°C, por 24 horas. A massa do material purificado foi comparada com a massa do produto bruto. Os produtos purificados foram submetidos à caracterização estrutural por ^{13}C-RMN, de acordo com o procedimento descrito no item 5.2.6.

5.2.6.2 Purificação dos ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose por extração em acetona a quente

Ésteres de açúcar, que possuam longas cadeias carbônicas, podem ser purificados por recristalização em acetona ou metanol e o procedimento por coluna cromatográfica, geralmente, não é necessário. Em contraste, os ésteres de açúcar com pequenas cadeias carbônicas devem ser purificados em coluna

cromatográfica. Para a purificação de um determinado éster de açúcar o procedimento deve ser modificado, levando-se em conta as suas propriedades, como por exemplo, a solubilidade, o tamanho da cadeia carbônica e o tipo de açúcar pendente (YAN, 2001).

Neste trabalho, a metodologia proposta por Yan (2001) foi adaptada e os ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose foram obtidos com alto grau de pureza, pela recristalização em acetona, seguindo o procedimento descrito a seguir.

Após o sétimo dia, a reação foi interrompida pela separação da enzima do meio reacional por filtração. O filtrado foi submetido à evaporação em alto vácuo (10^{-1} mbar), por 3 horas, a 50°C, em evaporador rotativo, para a retirada do DMF. O material viscoso resultante (produto bruto) foi lavado em acetona à 50°C e filtrado (três vezes) para a retirada do açúcar. Este filtrado foi concentrado em baixo vácuo, por 30 minutos, a 30°C, em evaporador rotativo, para a retirada da acetona. O éster puro obtido foi secado à 40°C, sob vácuo, por 24 horas e pesado. A massa do material purificado foi comparada com a massa do produto bruto.

A Figura 30 apresenta o fluxograma dos procedimentos para a purificação dos produtos.

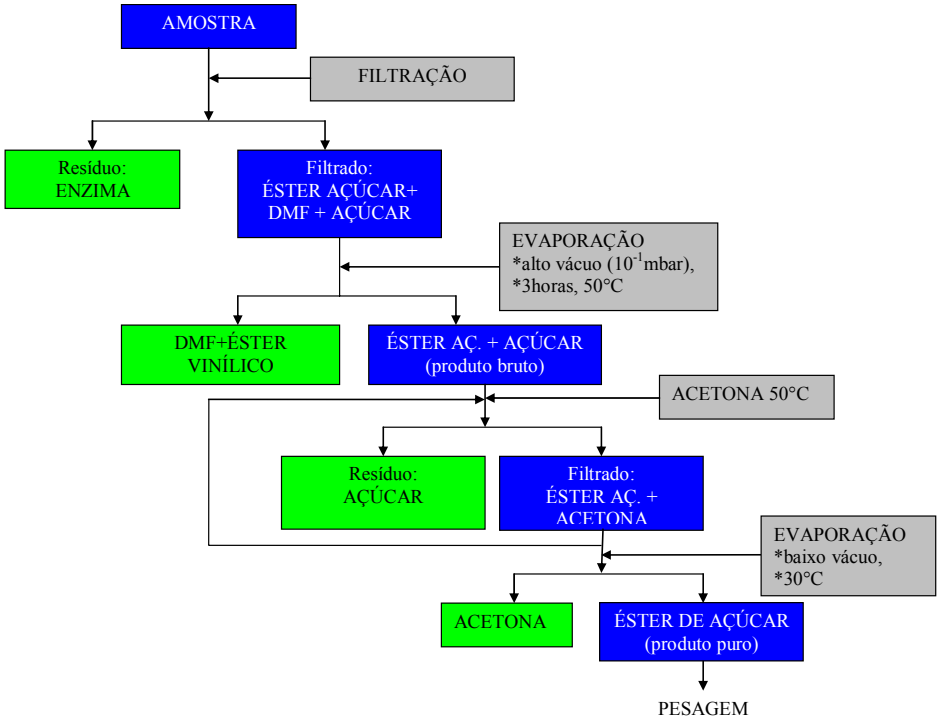


Figura 30: Metodologia usada para a purificação dos ésteres de açúcar, por extração em acetona a quente.

5.2.7 Síntese dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose

Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 5.2.5.

5.2.8 Purificação dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose e caracterização por ^{13}C-RMN

Foram empregadas as mesmas metodologias de purificação dos ésteres de açúcar não-polimerizáveis, descritas anteriormente. Foram purificados por extração em acetona a quente (50°C) os ésteres 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 5-*O*-viniladipoil L-arabinose e em coluna cromatográfica os ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose. Os produtos purificados foram submetidos à caracterização estrutural por ^{13}C-RMN, de acordo com o procedimento descrito no item 5.2.6.

5.2.9 Polimerização dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose

A polimerização dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose foi levada a cabo, através do seguinte procedimento: amostras dos monômeros foram pesadas e diluídas, em água deionizada, dentro de tubos de ensaio. A solução de cada monômero foi submetida à borbulhamento de N_2(g), por 10 minutos, para a retirada do O_2(g) dissolvido. Em seguida, foi adicionado o iniciador, constituído de uma mistura de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A Tabela 3 apresenta a quantidade dos monômeros e demais reagentes usados na polimerização. Após a adição dos reagentes, o tubo foi imediatamente tapado e levado para o dispositivo ilustrado na Figura 31a. Primeiramente, a mistura reacional foi congelada em N_2 (l). Em seguida, uma válvula de três posições permitiu a retirada de ar residual (posição 2) por meio de uma bomba de alto vácuo. Após cinco minutos, a válvula permitiu a introdução de N_2 (g) (posição 3) e o tubo de ensaio foi colocado em água, à temperatura ambiente, para descongelar e sofrer agitação por alguns minutos. O ciclo foi repetido por três vezes. Em seguida, o tubo de ensaio foi desconectado do restante do dispositivo e colocado em outro dispositivo (Figura 31b), onde ocorreu a catálise química. A mistura foi agitada por 24 horas, a 60°C. O produto resultante foi precipitado em acetona, lavado e secado a 45°C por 24 horas e, por fim, pesado.

Tabela 3: Quantidade dos monômeros e demais reagentes empregados na polimerização dos ésteres de açúcar.

MONÔMEROS (g)		**$K_2S_2O_8$ (mg)**	**H_2O_2 (µL)**	**H_2O (mL)**
ALA[a]	0,4995	5,0	5,0	2,5
ADG[b]	0,5022	5,3	5,0	2,5
AS[c]	0,4009	4,0	4,0	2,0

a: 5-*O*-viniladipoil L-arabinose
b: 6-*O*-viniladipoil D-glicose
c: 1'-*O*-viniladipoil sacarose

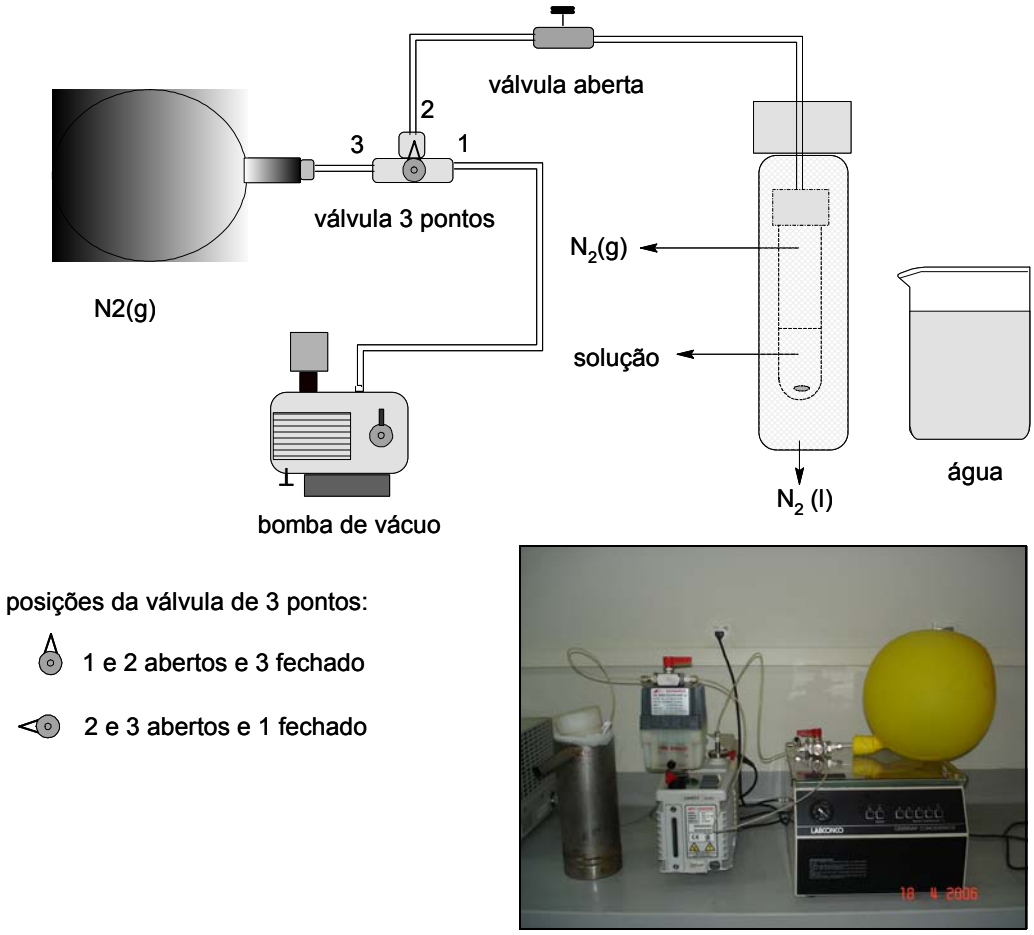


Figura 31a: Dispositivo para polimerização. Arranjo para a obtenção de atmosfera inerte.

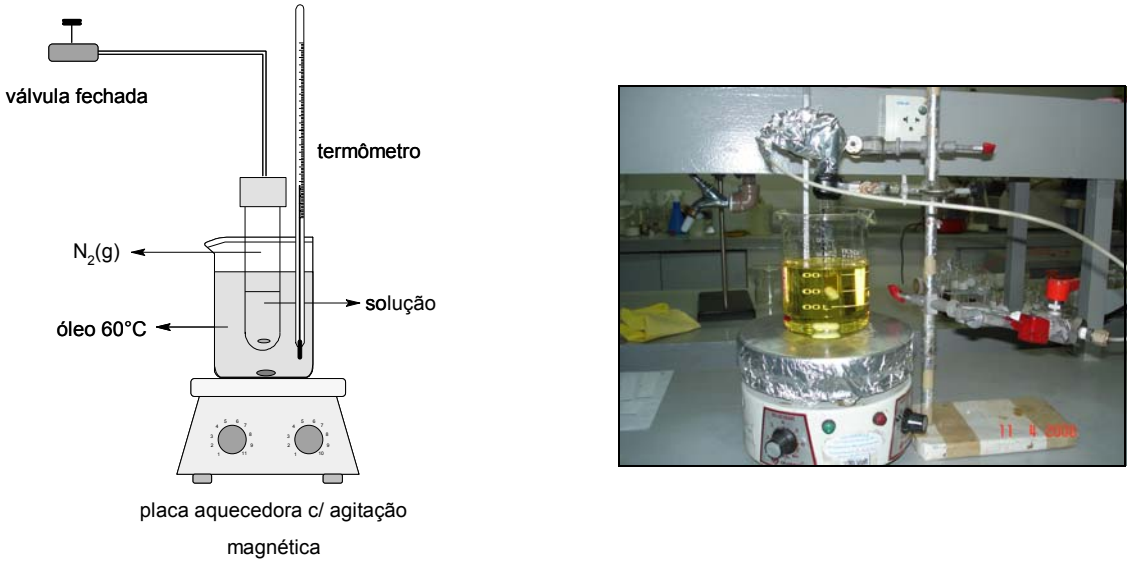


Figura 31b: Dispositivo para polimerização. Arranjo para a catálise química com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

5.2.10 Caracterização por FTIR dos polímeros poli (5-*O*-viniladipoil L-arabinose), poli (6-*O*-viniladipoil D-glicose), poli (1'-*O*-viniladipoil sacarose) e dos seus monômeros de partida

Os espectros de absorção na região do infravermelho dos monômeros e dos polímeros foram obtidos, através de um Espectrofotômetro FTIR marca ABB Bomen, utilizando pastilhas de KBr.

5.2.11 Determinação das massas molares por GPC

Amostras monodispersas de dextrana DXT 5000K, 165K, 97K, 27K, 6K, com massas molares numéricas médias 1.500.000, 110.800, 67.700, 19.300, 3.325, respectivamente, foram usadas para a elaboração da curva de calibração. A fase móvel foi uma solução aquosa de NaCl 0,1 M. As análises foram realizadas a 50°C e vazão de 0,6 mL/min.

Soluções de concentração 5,0 mg/mL de amostra dos polímeros e padrões foram preparadas a partir da mesma solução de NaCl, usada na fase móvel, e ficaram sob agitação, na temperatura ambiente, por 24 horas. Em seguida, as amostras dos polímeros e dos padrões foram filtradas em membranas Durapore, marca Millipore, de 0,22 µm e injetadas, manualmente no GPC, com volumes de 50 µL. Os cromatogramas obtidos foram processados pelo sistema GALAXIE GPC (Varian Inc, USA), para os cálculos dos valores de M_n, M_w e PD (polidispersão).

5.2.12 Determinação das CMC dos ésteres de açúcar

Os ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose, 1'-*O*-lauroil sacarose, 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose foram diluídos em água deionizada para concentrações que variaram entre 1 ppm e 10^4 ppm. As soluções aquosas dos ésteres de açúcar foram ensaiadas no tensiômetro de superfície, de acordo com o método Washburn (1921), a 20°C.

5.2.13 Emprego dos ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose como lubrificantes em fluidos de completação

A completação é a fase posterior à perfuração de um poço de petróleo e visa deixar o poço em condições de operar, de forma segura e econômica, durante toda a sua vida produtiva (LIMA, 1992). Ao conjunto de operações destinadas a equipar o poço para produzir óleo, gás, ou injetar fluidos, denomina-se "completação", que tem reflexos em toda a vida produtiva do poço e envolve altos custos (GARCIA, 1997).

Durante as manobras das colunas em operações de completação, alguns poços de petróleo apresentam problemas de arraste por atrito. Para minimizar este fato indesejável, utilizam-se lubrificantes comerciais a fim de aumentar a lubricidade do fluido de amortecimento. Estes lubrificantes comerciais, geralmente, são muito caros, tóxicos e não-biodegradáveis. Assim, foram investigadas aplicações dos ésteres laurato de L-arabinose, laurato de D-glicose e laurato de sacarose, com o objetivo de substituir alguns destes produtos comerciais.

Os ésteres de açúcar foram adicionados a um fluido de completação à base de água, contendo KCl, NaCl e UltraWet™, isoladamente, ou combinados com outras bases oleofílicas e, em seguida, as misturas foram ensaiadas em um lubricidímetro, para a determinação dos coeficientes de lubricidade (CL). Ao mesmo tempo, três lubrificantes comerciais foram adicionados, isoladamente, ao fluido base, e as misturas foram ensaiadas nas mesmas condições. Em seguida, procedeu-se a uma análise comparativa da eficiência destes aditivos naturais com os três lubrificantes comerciais. A composição do fluido base foi a seguinte: água (QSP), KCl (4lb/bbl), NaCl (9lb/bbl), UltraWet (0,1% vol/vol) e peso específico de 8,5 lb/gal (1020 Kg/m^3). Foram empregados como aditivos, além dos ésteres de açúcar, um éster comercial, um óleo vegetal e glicerina P.A. A Tabela 4 apresenta a formulação dos 16 lubrificantes analisados e as concentrações dos lubrificantes.

Tabela 4: Formulação e concentração dos lubrificantes analisados.

Lubrificante	Concentração lubrificante (g/mL)	Formulação
Branco	0,00000	Fluido base
L1	0,01500	P1
L2	0,01500	P2
L3	0,01500	P3
L4	0,01564	LDG
L5	0,00704	L4+3% vol éster
L6	0,00704	L4+3% vol óleo soja
L7	0,01564	LS
L8	0,00704	L7 + 3% vol éster
L9	0,00704	L7 + 3% éster + 2% glicerina (vol)
L10	0,00704	L7 + 3% vol óleo
L11	0,00704	L7 + 3% óleo + 2% glicerina (vol)
L12	0,0156	LLA
L13	0,00704	L12 + 3% vol éster
L14	0,00704	L12 + 3% éster + 2% glicerina (vol)
L15	0,00704	L12 + 3% vol óleo
L16	0,00704	L12 + 3% óleo + 2% glicerina (vol)

P1: Produto comercial 1; P2: Produto comercial 2; P3: Produto comercial 3; LDG: Laurato de D-glicose; LS: Laurato de sacarose; LLA: Laurato de L-arabinose

CAPÍTULO 6
RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Obtenção dos ésteres de sacarose e de ácido ascórbico – 1ª etapa

6.1.1 A influência da concentração de enzima na conversão dos ésteres de sacarose

Em geral, o aumento da concentração de enzima favorece a conversão de substratos em produtos, em reações envolvendo catálise enzimática (YAN, 2001; RAKU, 2003). A seguir, são apresentadas as curvas das conversões de sacarose em ésteres de sacarose, mostrando a influência do aumento da concentração de enzima na conversão. Em todos os casos analisados nesta primeira etapa, as condições reacionais mantidas constantes foram a temperatura (30°C), a razão molar éster de vinila/sacarose (4/1) e a agitação (130rpm).

6.1.1.1 Caproato de sacarose (x = 4):

A Figura 32 mostra a influência do aumento da concentração de enzima sobre a conversão de sacarose em caproato de sacarose, bem como a confirmação da obtenção dos produtos por análises qualitativas em TLC. Pode-se notar que as conversões foram maiores para maiores valores de concentração de enzima. Com 40 mg/mL e 20 mg/mL de enzima, em 7 dias de reação, as conversões foram de 98,7% e 100%, respectivamente. Assim, para a síntese deste produto, convém o emprego de 20mg/mL de enzima, para ensaios com 7 dias de duração. As análises em TLC apresentaram manchas mais escuras na parte superior de todas as placas (produtos), comprovando a formação dos ésteres.

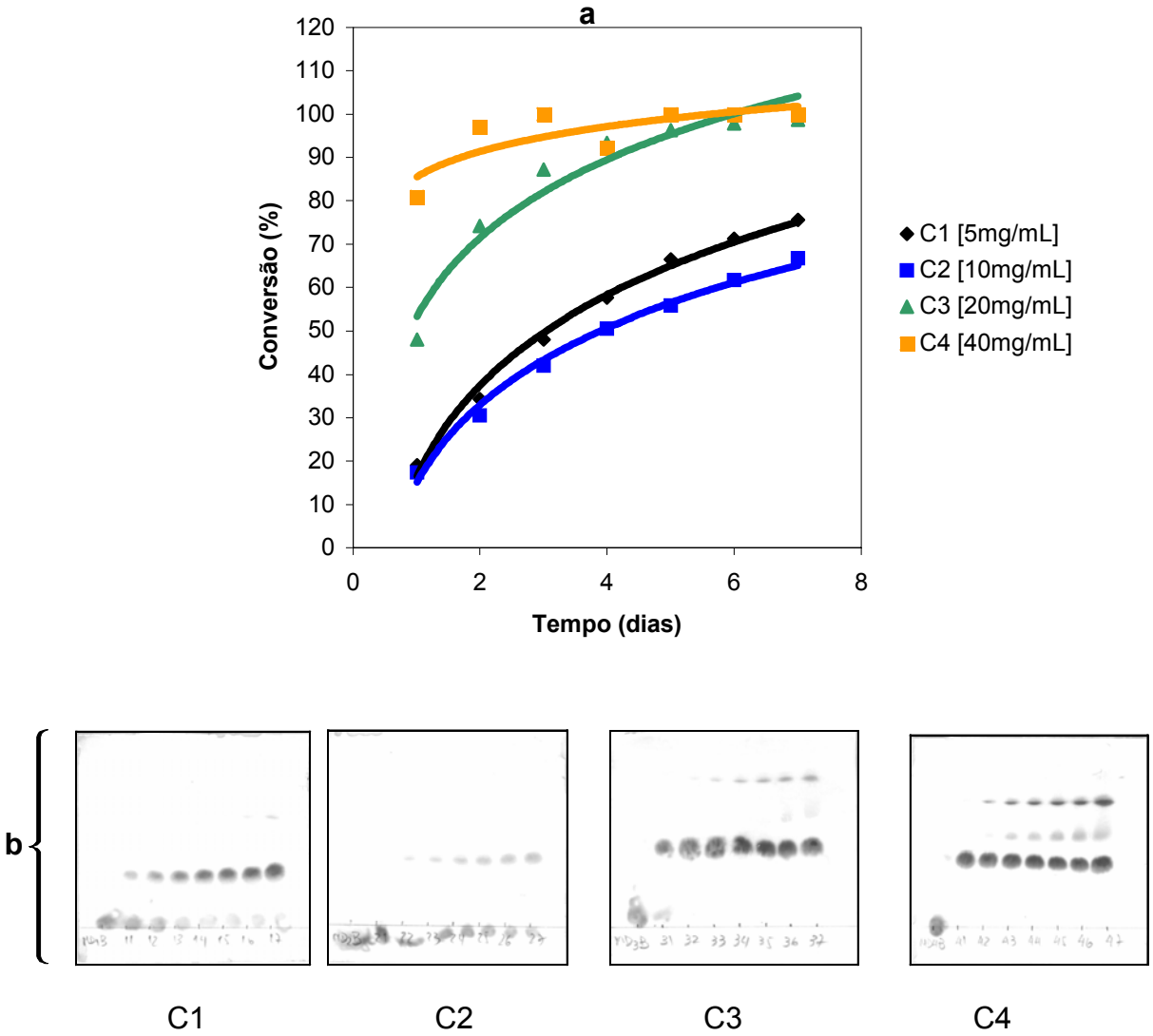


Figura 32: (a) Porcentagem de conversão de sacarose em caproato de sacarose e (b) confirmação da obtenção dos produtos por cromatografia em camada delgada – TLC.

6.1.1.2 Caprilato de sacarose (x = 6):

A Figura 33 apresenta a influência do aumento da concentração de enzima na conversão de sacarose em caprilato de sacarose, assim como a confirmação da obtenção dos produtos por análises qualitativas em TLC.

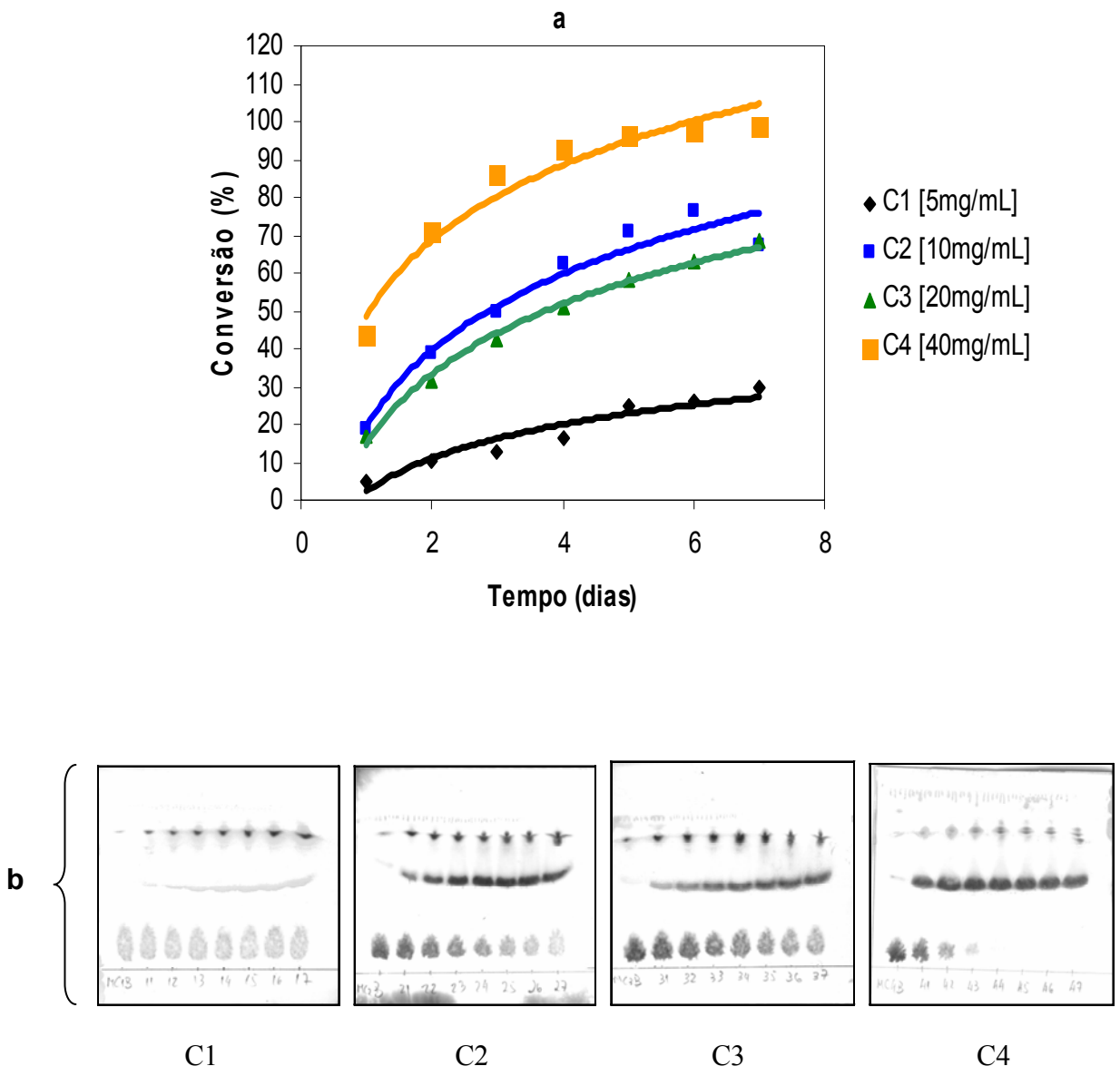


Figura 33: (a) Influência da concentração de enzima sobre a conversão de sacarose em caprilato de sacarose e (b) confirmação da obtenção dos produtos por cromatografia em camada delgada – TLC.

Neste caso, em 7 dias de reação, a conversão de sacarose em caprilato de sacarose foi de 68,4% e de 98,6%, para 20 mg/mL e 40 mg/mL de enzima, respectivamente. Assim, para a síntese deste produto, convém o emprego de 40 mg/mL de enzima, para ensaios com 7 dias de duração. As análises em TLC apresentaram manchas mais escuras na parte superior de todas as placas (produtos), comprovando a formação dos ésteres.

6.1.1.3 Caprato de sacarose (x = 8):

A Figura 34 apresenta a influência do aumento da concentração de enzima na conversão de sacarose em caprato de sacarose e a confirmação da obtenção dos produtos por análises qualitativas em TLC.

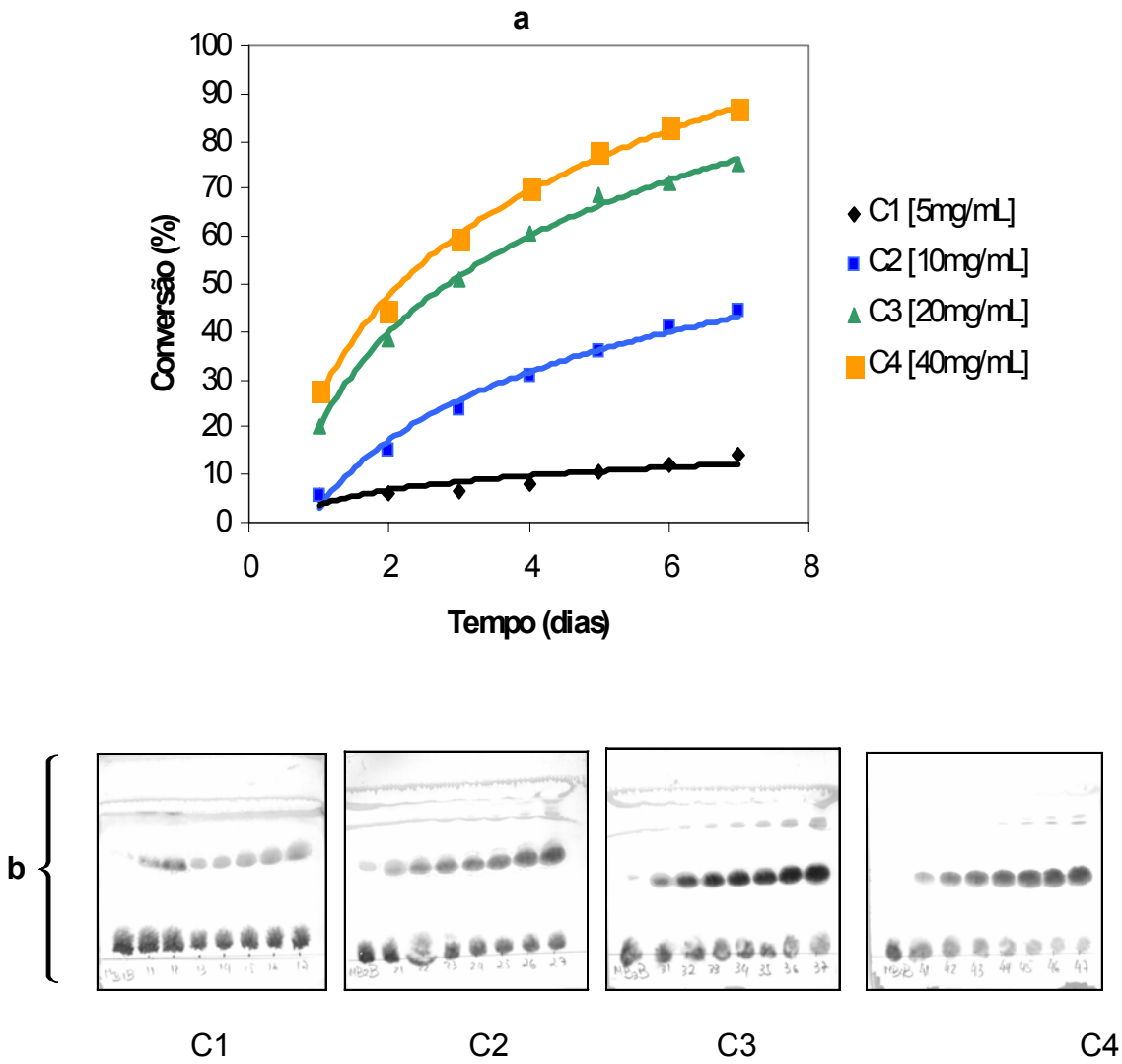


Figura 34: (a) Influência da concentração de enzima sobre a conversão de sacarose em caprato de sacarose e (b) confirmação da obtenção dos produtos por cromatografia em camada delgada – TLC.

Da mesma forma que os casos anteriores, a conversão aumentou com o aumento da concentração de enzima. Em 7 dias de reação, a conversão de

sacarose em caprato de sacarose foi de 75,1% e 86,2%, para 20mg/mL e 40 g/mL de enzima, respectivamente.

6.1.1.4 Laurato de sacarose (x = 10):

A Figura 35 apresenta a influência do aumento da concentração de enzima na conversão de sacarose em laurato de sacarose e a confirmação da obtenção dos produtos por análises qualitativas em TLC.

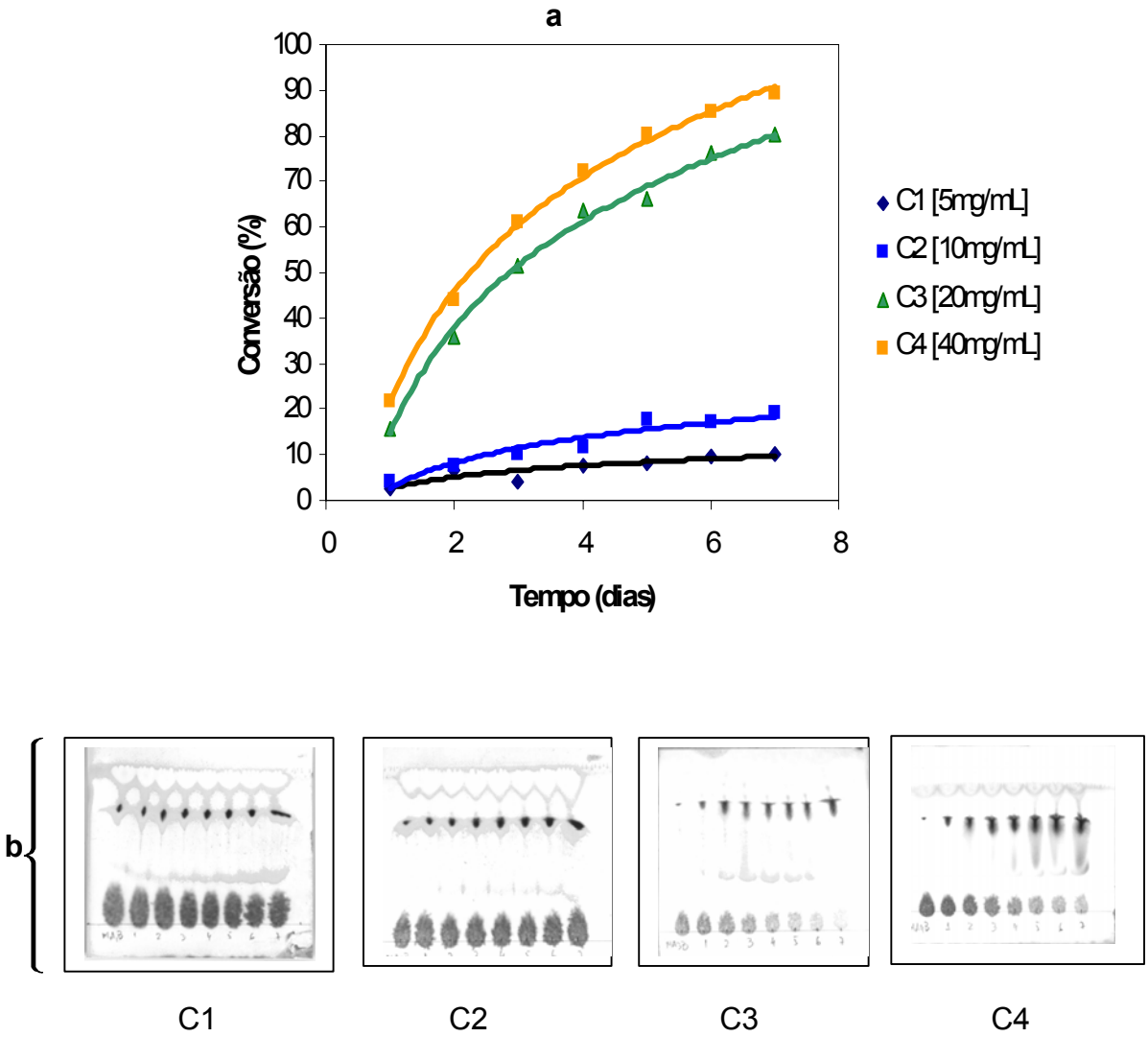


Figura 35: (a) Influência da concentração de enzima sobre a conversão de sacarose em laurato de sacarose e (b) confirmação da obtenção dos produtos por cromatografia em camada delgada – TLC.

Em 7 dias de reação, a conversão de sacarose em laurato de sacarose, para concentrações de enzima de 20 mg/mL e 40 mg/mL, ficaram razoavelmente próximas, com valores de 80,4% e 89,2%, respectivamente.

Os resultados apresentados nas Figuras 32 a 35 mostram claramente o ótimo desempenho da protease de *Bacillus subtilis* na conversão da sacarose nos diferentes ésteres estudados.

6.1.2 A influência do tamanho da cadeia do éster vinílico na conversão do éster de sacarose

A partir dos resultados anteriores, considerando-se a concentração de enzima de 40mg/mL, foi possível fazer a correlação entre o tamanho da cadeia carbônica dos doadores de acila e os valores de conversão nas transesterificações enzimática para a obtenção dos ésteres de sacarose. A Figura 36 apresenta esta correlação.

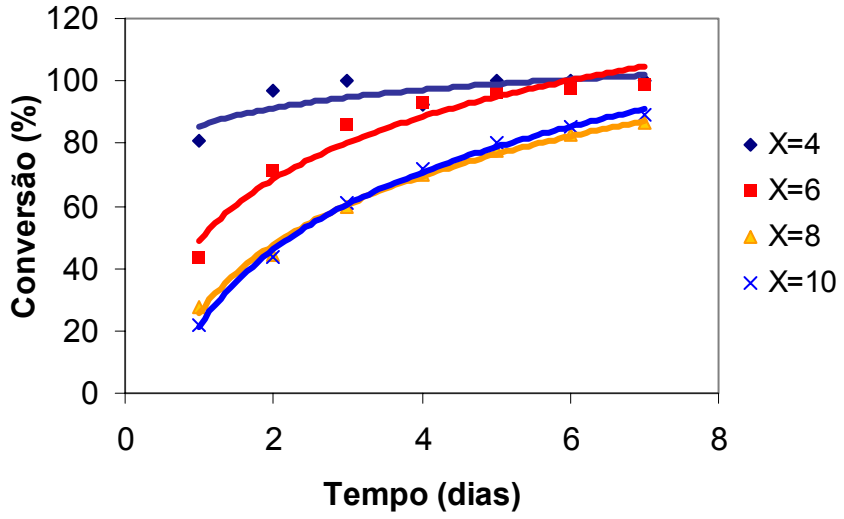


Figura 36: Conversão de sacarose em ésteres de sacarose para diferentes tamanhos de cadeia carbônica dos ésteres vinílicos: x=4 (caproato de vinila); x=6 (caprilato de vinila); x=8 (caprato de vinila) e x=10 (laurato de vinila).

Como citado no item 3.2.3, em acilações catalisadas por lipases, longas cadeias carbônicas de doadores de acila, geralmente, favorecem o aumento das conversões (FERRER, 2000a; YAN, 2001). No entanto, se os catalisadores forem proteases, o comportamento se inverte e as conversões são maiores para doadores de acila com menores cadeias carbônicas, como se pode constatar na Figura 36.

Este comportamento ocorre, provavelmente, devido à natureza do catalisador. Para o caso da protease, por exemplo, cadeias carbônicas menores se encaixam mais perfeitamente no sítio de ligação substrato/ enzima. O efeito inverso acontece, quando o catalisador é uma lipase. Certamente, cada tipo de enzima apresenta uma especificidade que deve ser investigada na síntese de determinado produto.

6.1.3 A influência da adição de água nas conversões dos ésteres de sacarose

Como citado no item 3.2.4, a água desempenha um papel polêmico no meio reacional das reações enzimáticas, podendo aumentar, diminuir ou, até mesmo, impedir a formação do produto (THIMASHEFF, 1993; VALIVETY, 1993). No entanto, existe uma concentração de água ótima para cada tipo de reação, que poderá aumentar, significativamente, a formação dos produtos. Esta informação é importantíssima em processos industriais, por representar economia significativa nos custos do processo.

A Figura 37 apresenta a variação da conversão de sacarose em laurato de sacarose em função da adição de água, com 5 mg/mL de enzima, assim como a confirmação da obtenção dos produtos por análises qualitativas em TLC. Pode-se notar que, empregando-se somente 5 mg/mL de enzima, a conversão chegou a 16%, em 60 minutos, com a adição de 20% de água. No entanto, com 40 mg/mL de enzima, foi possível atingir 50% de conversão em 60 minutos, com a adição de 10% de água (Figura 38).

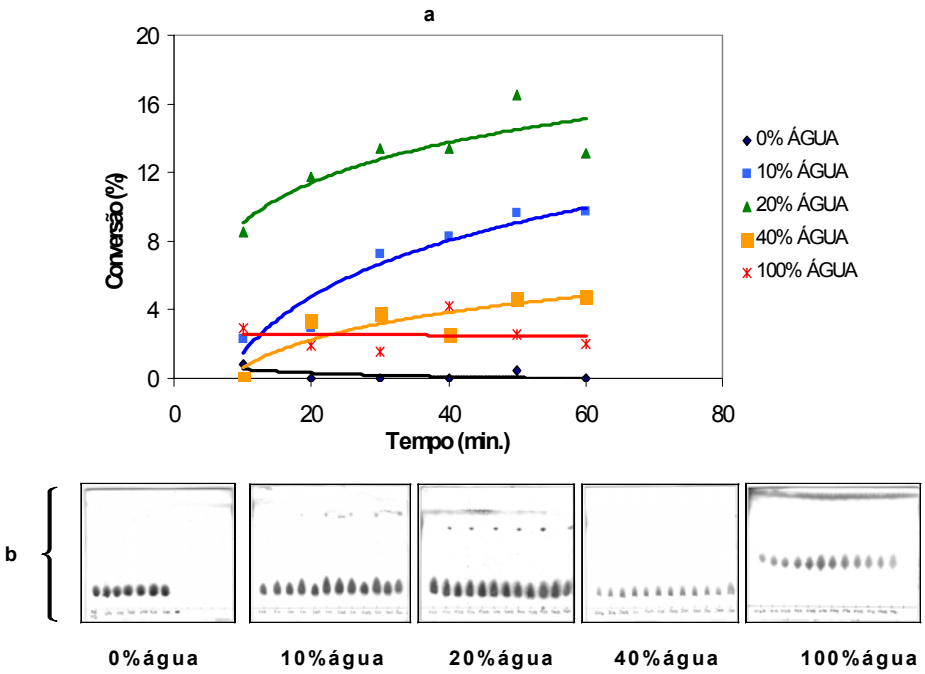


Figura 37: (a) Conversão de sacarose em laurato de sacarose em função da adição de água, para 5 mg/mL de enzima e (b) confirmação da obtenção dos produtos por análises qualitativas em TLC.

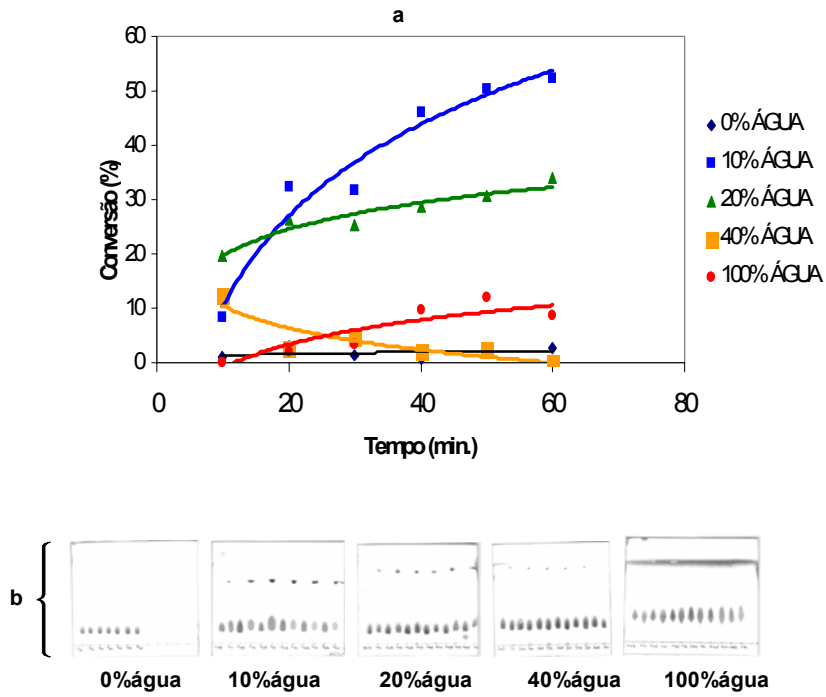


Figura 38: (a) Conversão de sacarose em laurato de sacarose em função da adição de água, para 40 mg/mL de enzima e (b) confirmação da obtenção dos produtos por análises qualitativas em TLC).

6.1.4 Síntese dos ésteres de sacarose

Com base nos resultados obtidos para as conversões de sacarose em ésteres de sacarose, apresentados nas Figuras 32 a 38, adotaram-se as seguintes condições reacionais para a síntese dos ésteres de sacarose: concentração de enzima: 40 mg/mL; razão molar éster vinílico/ sacarose: 4/1; razão água/DMF: 1/9 (10%); temperatura: 30°C; tempo: 25 horas; agitação: 130 rpm.

6.1.4.1 Laurato de sacarose (1'-O-lauroil sacarose)

6.1.4.1.1 Variação da conversão com o tempo nas condições ótimas de síntese do produto

A Figura 39 apresenta os valores da conversão de sacarose em laurato de sacarose, obtidos em HPLC, para as condições reacionais mencionadas no item 6.1.4. O produto bruto obtido apresentou uma massa de 20,00g.

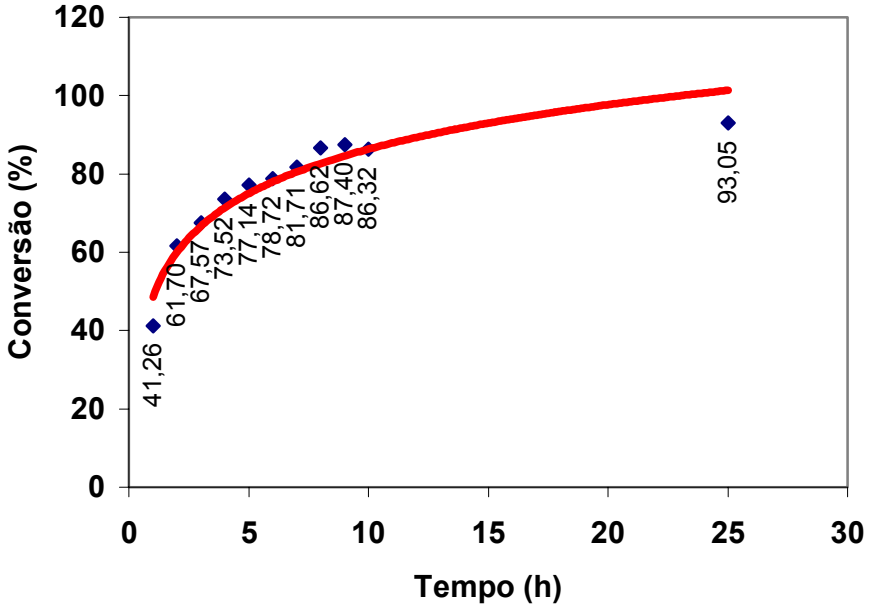


Figura 39: Conversão do laurato de sacarose nas condições ótimas de síntese.

6.1.4.1.2 Purificação em coluna cromatográfica

A Figura 40 apresenta o resultado da análise qualitativa em TLC do laurato de sacarose, antes e após separação e purificação em coluna cromatográfica. A fase 2/II (provável laurato de sacarose), após concentração, apresentou uma massa de 5,19 g. Assim, em relação ao produto bruto, a porcentagem de massa obtida foi de 25,95%.

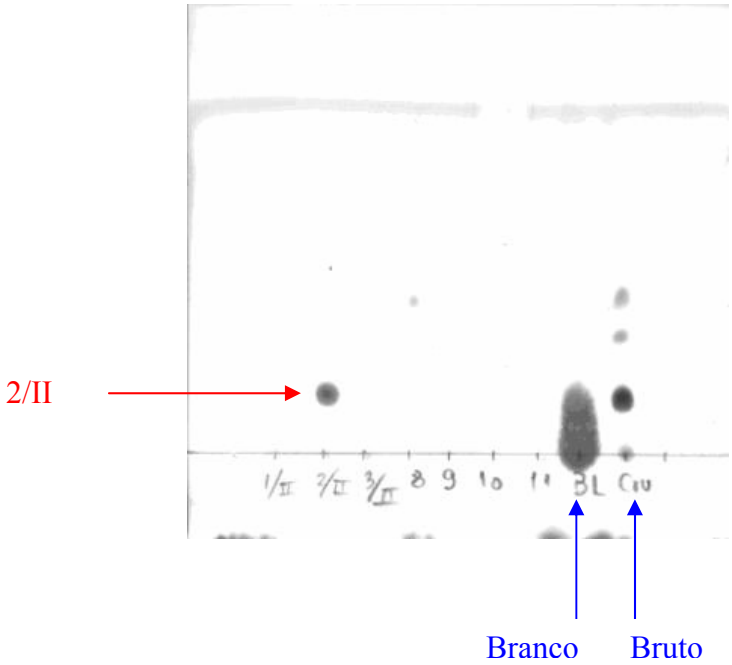


Figura 40: Análise em TLC do laurato de sacarose, após separação e purificação em coluna cromatográfica.

6.1.4.1.3 Identificação da estrutura química e da posição de acilação por ^{13}C-RMN

A Figura 41 apresenta os espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e do laurato de sacarose. Os resultados mostram alterações no deslocamento químico dos diferentes átomos de carbono, após a transesterificação e uma forte mudança para campo alto no sinal relativo ao carbono C2'. Também foi observado um deslocamento do sinal correspondente ao C1' para campo baixo. As alterações observadas nesses dois sinais são fortes indicativos de

que a reação de substituição ocorreu no carbono C1'. Outras evidências fortes da formação do éster de sacarose são os sinais referentes à carbonila e os grupos CH_2 e CH_3 no espectro do produto formado. Estes deslocamentos químicos sugerem a síntese do éster de sacarose substituído em C1', de aspecto viscoso e coloração castanho-escuro: 1' -*O*-lauroil sacarose. ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*): δ(ppm): 22,18; 24,53; 28,54; 28,81; 28.98; 29,00; 29,10; 31,38; 33,41; 33,59(-CH2-); 92,15(C1); 71,43(C2); 72,99(C3); 68,85(C4); 72,83(C5); 60,52(C6); 65,66(C1'); 102,23(C2'); 76,61(C3'); 82,81(C4'); 73,28(C5'); 61,94(C6'); 172,42(C=O); 14,00(CH_3).

A Tabela 5 reúne as mudanças no deslocamento químico entre a sacarose e o laurato de sacarose, identificadas no espectro da Figura 41.

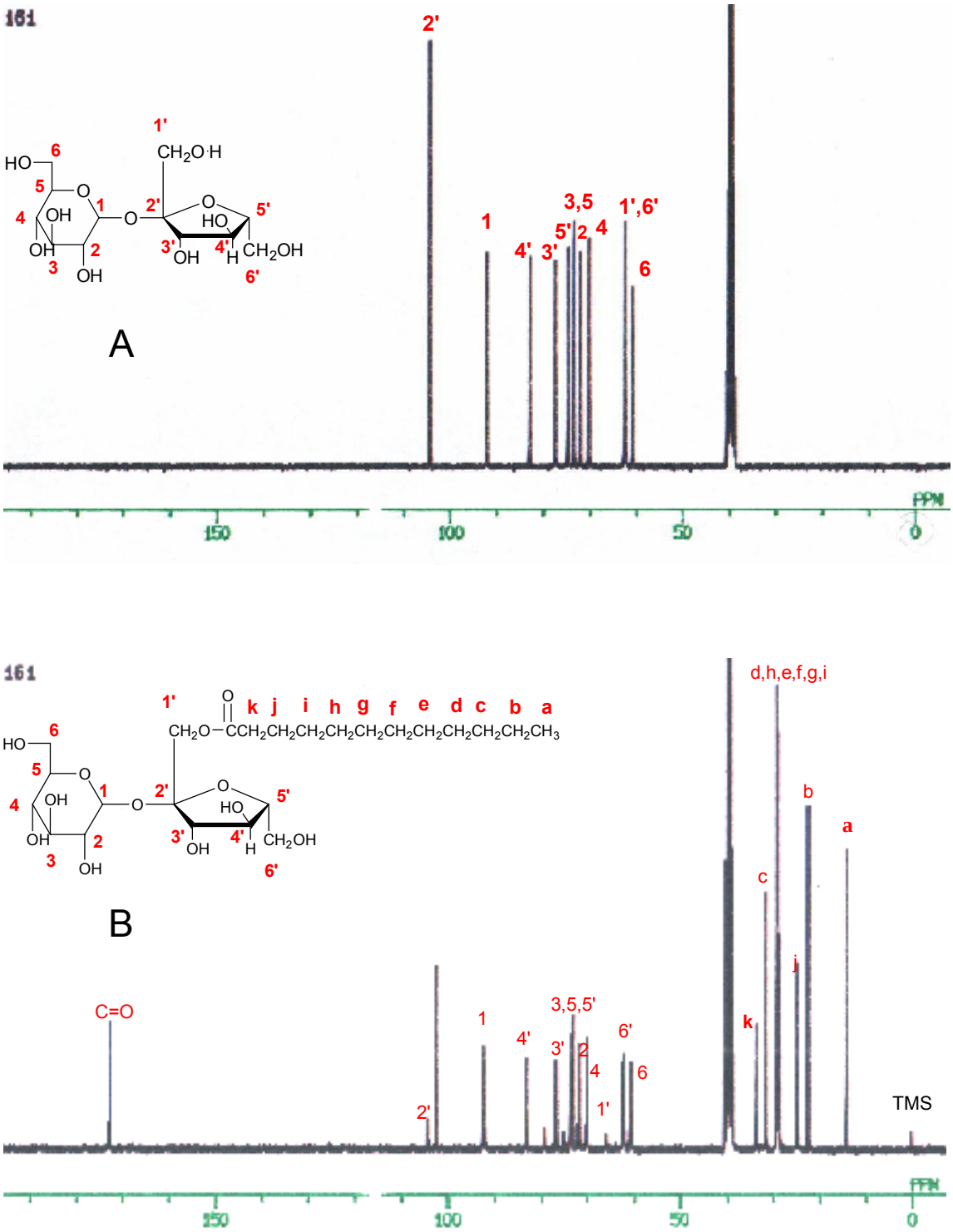
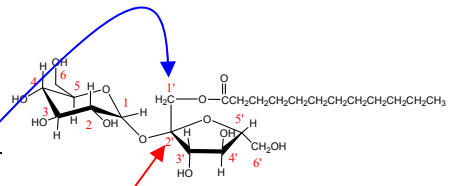


Figura 41: (A) Espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e (B) do laurato de sacarose.

Tabela 5: Mudanças nos deslocamentos químicos entre sacarose e o éster laurato de sacarose.



Posição	*Sacarose* δ(ppm)	*Laurato de sacarose* δ(ppm)	*Baixo campo*	*Alto campo*
C_1	91,84	92,15	0,31	-
C_2	71,72	71,43		0,29
C_3	72,98	72,99	0,01	-
C_4	69,94	69,85	-	0,09
C_5	72,92	72,83	-	0,09
C_6	60,60	60,52	-	0,08
$C_{1'}$	62,23	65,66	3,43	-
$C_{2'}$	**104,12**	**102,23**	-	**1,89**
$C_{3'}$	77,13	76,61		0,52
$C_{4'}$	82,63	82,81	0,18	-
$C_{5'}$	74,38	73,28	-	1,10
$C_{6'}$	62,23	61.94	-	0,29
C=O	-	172,42	-	-
CH_2(k)	-	33,59	-	-
CH_2(c)	-	33,41	-	-
CH_2(d)	-	31,78	-	-
CH_2(h)	-	29,10	-	-
CH_2(e)	-	29,00	-	-
CH_2(f)	-	28,98	-	-
CH_2(g)	-	28,81	-	-
CH_2(i)	-	28,54	-	-
CH_2(j)	-	24,53	-	-
CH_2(b)	-	22,18	-	-
CH_3(a)	-	14,00	-	-

6.1.4.2 Caprato de sacarose (1'-*O*-caproil sacarose)

6.1.4.2.1 Variação da conversão com o tempo nas condições ótimas de síntese do produto

A Figura 42 apresenta os valores da conversão de sacarose em caprato de sacarose em função do tempo, obtidos em HPLC, para as condições reacionais citadas no item 6.1.4. O produto bruto obtido apresentou uma massa de 19,89g.

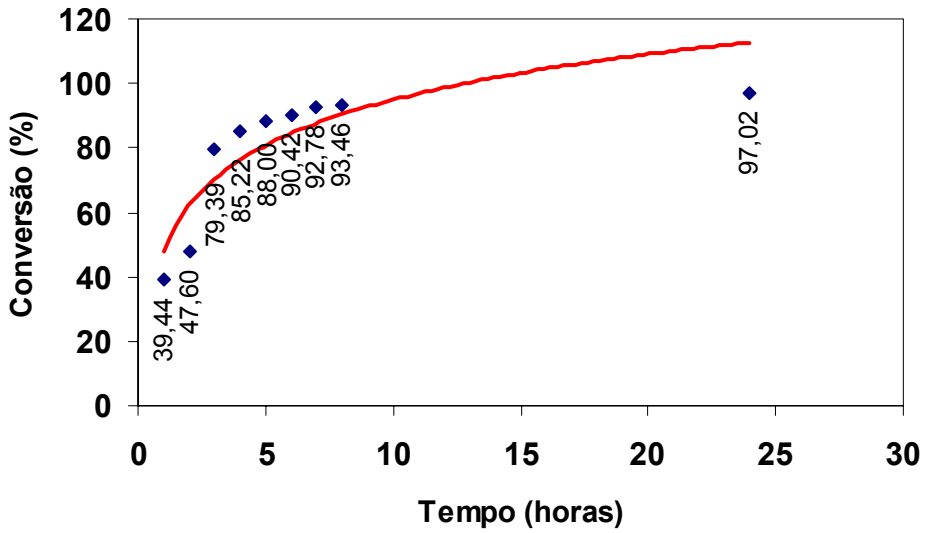


Figura 42: Conversão com o tempo do caprato de sacarose nas condições ótimas de síntese.

6.1.4.2.2 Purificação em coluna cromatográfica

A Figura 43 apresenta o resultado da análise qualitativa em TLC do caprato de sacarose, antes e após separação e purificação em coluna cromatográfica. A fase A11 (provável caprato de sacarose), após concentração, apresentou uma massa de 4,76g. Assim, em relação ao produto bruto (19,89g), a porcentagem de massa obtida foi de 23,93%.

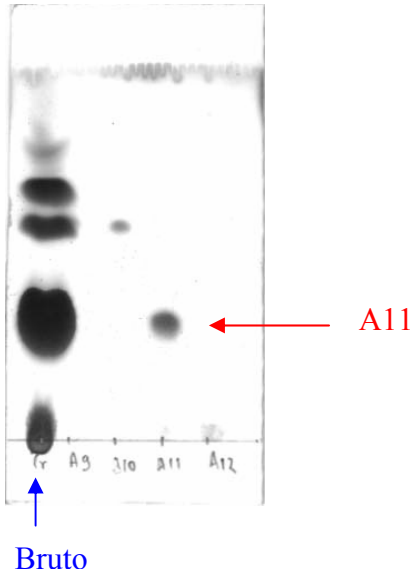


Figura 43: Análise em TLC do caprato de sacarose, após separação e purificação em coluna cromatográfica.

6.1.4.2.3 Identificação da estrutura química e da posição de acilação por ^{13}C-RMN

A Figura 44 apresenta os espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e do caprato de sacarose. Como observado anteriormente, para o laurato de sacarose, foram detectadas alterações no deslocamento químico dos diferentes átomos de carbono, após a transesterificação. Uma forte mudança para campo alto no sinal relativo ao carbono C2' e uma alteração do sinal referente a C1' para campo baixo. Estas mudanças associadas ao aparecimento de sinais referentes à carbonila e grupos CH_2 e CH_3, sugerem a síntese do éster de sacarose substituído em C1', de aspecto viscoso e coloração castanho-escuro: 1'-*O*-caproil sacarose. ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*): δ(ppm): 22,16; 24,51; 28,74; 28,79; 28.92; 31,34; 33,57; 33,41;(-CH2-); 91,81(C1); 71,70(C2); 72,83(C3); 69,87(C4); 72,98(C5); 60,52(C6); 65,64(C1'); 102,23(C2'); 76,62(C3'); 82,79(C4'); 72,98(C5'); 61,96(C6'); 172,42(C=O); 14,00(CH_3). (YOSHIMOTO, 1980)

A Tabela 6 reúne as mudanças no deslocamento químico entre a sacarose e o caprato de sacarose, identificadas no espectro da Figura 44, como descrito para o laurato de sacarose

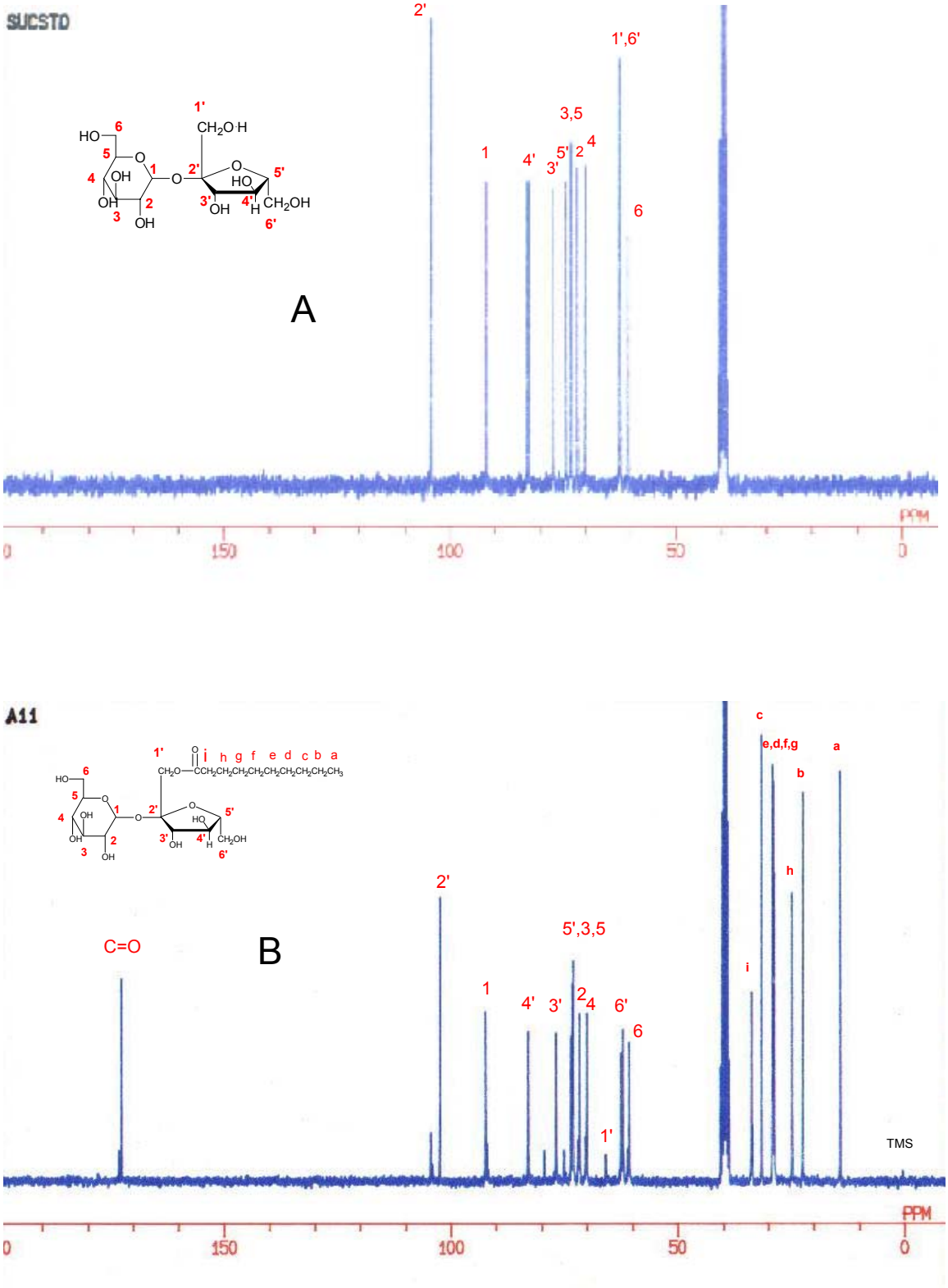
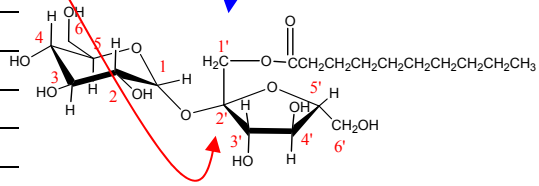


Figura 44: (A) Espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e (B) do caprato de sacarose.

Tabela 6: Mudanças nos deslocamentos químicos entre sacarose e o éster caprato de sacarose.

Posição	*Sacarose* δ(ppm)	*Caprato de sacarose* δ(ppm)	*Baixo campo*	*Alto campo*
C1	91,86	91,81		0,05
C2	71,74	71,70		0,04
C3	72,92	72,83		0,09
C4	69,96	69,87		0,09
C5	72,99	72,98		0,02
C6	60,61	60,52		0,09
C1'	62,23	65,64	3,41	
C2'	104,12	102,23		1,89
C3'	77,16	76,62		0,54
C4'	82,83	82,79		0,04
C5'	74,40	72,98		1,42
C6'	62,23	61,96		0,27
C=O		172,42		
CH_2(i)		33,57		
CH_2(c)		33,41		
CH_2(e)		31,34		
CH_2(d)		28,92		
CH_2(f)		28,79		
CH_2(g)		28,74		
CH_2(h)		24,51		
CH_2(b)		22,16		
CH_3(a)		14,00		



6.1.4.3 Caprilato de sacarose (1'-*O*-capriloil sacarose)

6.1.4.3.1 Variação da conversão com o tempo nas condições ótimas de síntese do produto

A Figura 45 apresenta os valores da conversão de sacarose em caprilato de sacarose, obtidos em HPLC, para os diferentes tempos de reação e nas demais condições citadas no item 6.1.4. O produto bruto obtido apresentou uma massa de 16,38g.

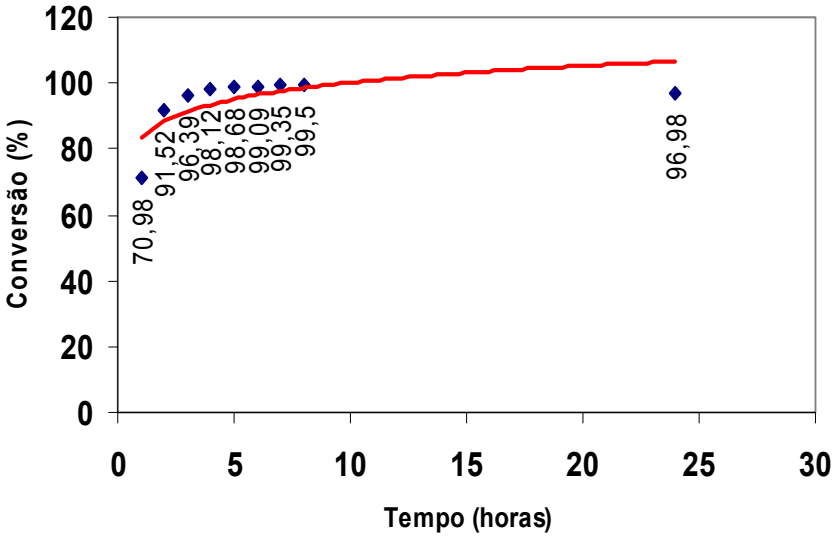


Figura 45: Variação da conversão com o tempo para o caprilato de sacarose nas condições ótimas de síntese.

6.1.4.3.2 Purificação em coluna cromatográfica

A Figura 46 apresenta o resultado da análise qualitativa em TLC do caprilato de sacarose antes e após a separação e purificação por coluna cromatográfica. A fase B9 (provável caprilato de sacarose), após concentração, apresentou uma massa de 6,26 g. Assim, em relação ao produto bruto (16,38 g), a porcentagem de massa obtida foi de 38,24%.

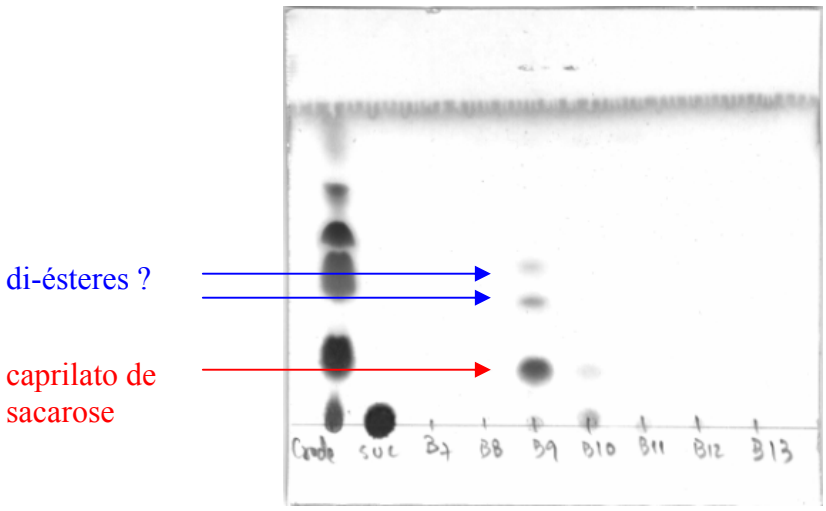


Figura 46: Análise em TLC do caprilato de sacarose, após separação e purificação em coluna cromatográfica.

A fase B9 apresentou duas manchas, de fraca intensidade, acima do provável caprilato de sacarose. Acredita-se que sejam relativas a di-ésteres que se formaram como subprodutos. Mesmo assim, a fase B9 foi submetida à identificação da estrutura por ^{13}C-RMN.

6.1.4.3.3 Identificação da estrutura química e da posição de acilação por ^{13}C-RMN

A Figura 47 apresenta os espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e do caprilato de sacarose. Mudanças semelhantes às observadas nos ésteres anteriores (laurato e caprato de sacarose) ocorreram para o caprilato de sacarose, sugerindo a síntese do éster de sacarose, substituído em C1', de aspecto viscoso e coloração castanho-escuro: 1'-*O*-capriloil sacarose. ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*): δ(ppm): 22,20; 24,60; 28,54; 31,27; 33,55; 33,68(-CH2-); 92,26(C1); 71,50(C2); 74,14(C3); 70,21(C4); 73,41(C5); 60,96(C6); 66,16(C1'); 102,57(C2'); 76,26(C3'); 82,84(C4'); 73,07(C5'); 62,01(C6'); 172,52(C=O); 14,04(CH_3). (YOSHIMOTO, 1980)

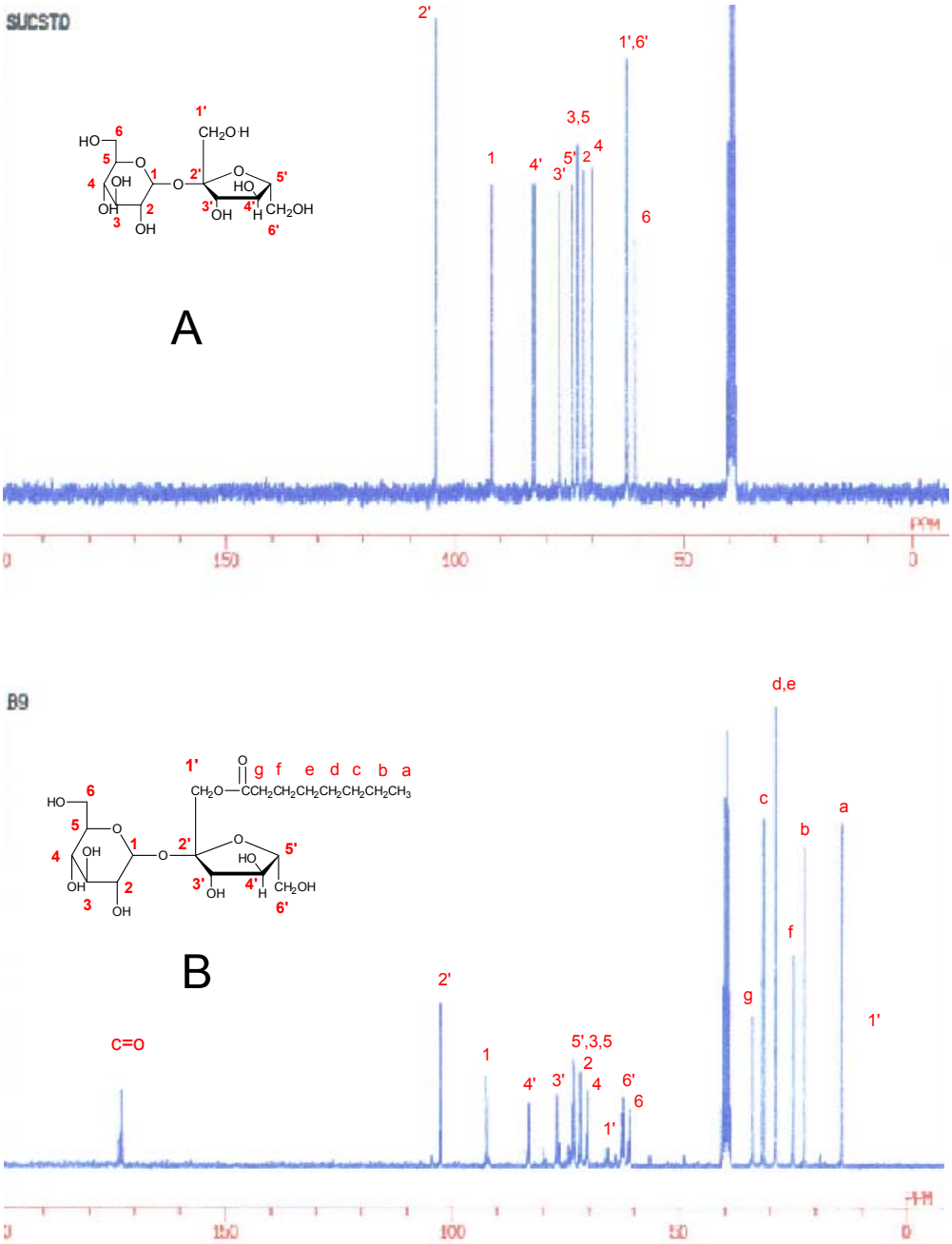
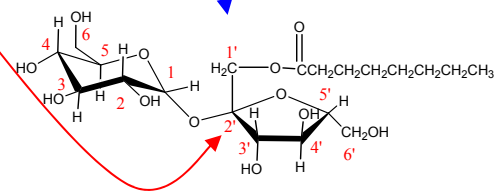


Figura 47: Espectros de ^{13}C-RMN da sacarose (A) e do caprilato de sacarose (B).

A Tabela 7 apresenta as mudanças nos deslocamentos químicos entre a sacarose e o caprilato de sacarose.

Tabela 7: Mudanças nos deslocamentos químicos entre sacarose e o éster caprilato de sacarose.

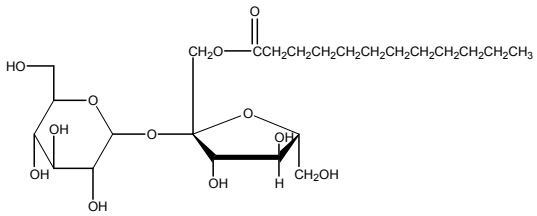
Posição	*Sacarose* δ(ppm)	*Caprilato de sacarose* δ(ppm)	*Baixo campo*	*Alto campo*
C1	91,86	92,26	0,40	
C2	71,74	71,50		0,23
C3	72,92	74,14	1,22	
C4	69,96	70,21	0,25	
C5	72,99	73,41	0,41	
C6	60,61	60,96	0,34	
C1'	62,23	66,16	3,93	
C2'	104,12	102,57		1,54
C3'	77,16	76,26		0,90
C4'	82,83	82,84	0,02	
C5'	74,40	73,07		1,33
C6'	62,23	62,02		0,22
C=O		172,52		
CH_2(g)		33,68		
CH_2 (c)		33,55		
CH_2(d)		31,27		
CH_2(e)		28,54		
CH_2(f)		24,60		
CH_2(b)		22,20		
CH_3(a)		14,04		



6.1.5 Determinação dos valores de HLB dos ésteres de sacarose

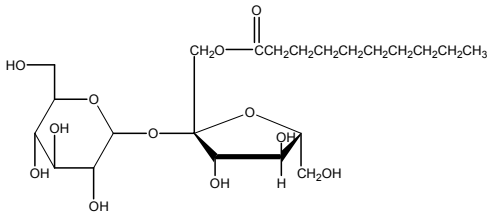
A Figura 48 apresenta a fórmula estrutural dos ésteres de sacarose com os seus respectivos valores de HLB, obtidos pela equação de Griffin (Equação 2). Como se pode notar, maiores cadeias carbônicas representam menores valores de HLB.

LAURATO DE SACAROSE



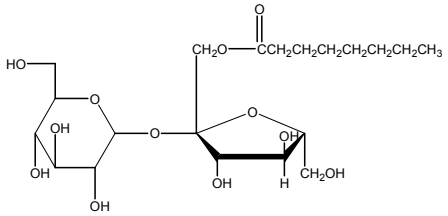
PARTE HIDROFÍLICA	MASSAMOLAR TOTAL	VALOR DE HLB
$C_{12}H_{21}O_{11}^{\bullet}$ Massa Mol.: 341,29 C. 42,23; H. 6,20; O. 51,57	$C_{24}H_{44}O_{12}$ Massa Mol.: 524,60 C. 54,95; H. 8,45; O. 36,60	HLB = 20*(341,29/524,60) HLB = 13,01

CAPRATO DE SACAROSE



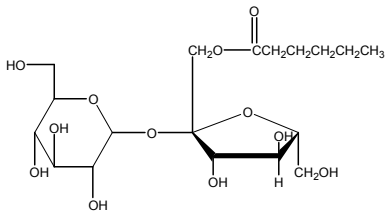
PARTE HIDROFÍLICA	MASSA MOLAR TOTAL	VALOR DE HLB
$C_{12}H_{21}O_{11}^{\bullet}$ Massa Mol.: 341,29 C. 42,23; H. 6,20; O. 51,57	$C_{22}H_{40}O_{12}$ Massa Molar: 496,55 C. 53,21; H. 8,12; O. 38,67	HLB = 20*(341,29/496,55) HLB = 13,74

CAPRILATO DE SACAROSE



PARTE HIDROFÍLICA	MASSA MOLAR TOTAL	VALOR DE HLB
$C_{12}H_{21}O_{11}^{\bullet}$ Massa Mol.: 341,29 C. 42,23; H. 6,20; O. 51,57	$C_{20}H_{36}O_{12}$ Mssa Mol.: 468,49 C. 51,27; H. 7,75; O. 40,98	HLB = 20*(341,29/468,49) HLB = 14,57

CAPROATO DE SACAROSE



PARTE HIDROFÍLICA	MASSA MOLAR TOTAL	VALOR DE HLB
$C_{12}H_{21}O_{11}^{\bullet}$ Massa Mol.: 341,29 C. 42,23; H. 6,20; O. 51,57	$C_{18}H_{32}O_{12}$ Massa Mol.: 440,44 C. 49,09; H. 7,32; O. 43,59	HLB = 20*(341,29/440,44) HLB = 15,50

Figura 48: Fórmulas estruturais e valores de HLB dos ésteres de sacarose de acordo com a equação de Griffin.

A Tabela 8 apresenta um resumo dos valores de HLB dos ésteres de sacarose.

Tabela 8: Valores de HLB dos ésteres de sacarose, obtidos pela Equação de Griffin, com propriedades surfactantes.

SURFACTANTE	*MM HIDROFÍLICA*	*MM TOTAL*	**HLB**
Laurato de sacarose (x=10)	311,26	524,60	13,01
Caprato de sacarose (x=8)	311,26	496,55	13,74
Caprilato de sacarose (x=6)	311,26	468,49	14,57
Caproato de sacarose (x=4)	311,26	440,44	15,50

MM = Massa Molar

6.1.6 A influência dos valores de HLB nas conversões dos ésteres de sacarose

Como foi visto na Figura 36, compostos com maiores cadeias carbônicas implicaram em menores conversões, que por sua vez resultaram em produtos de menores valores de HLB (Tabela 8). Assim, pode-se concluir que menores valores de HLB, implicam em menores conversões para as condições reacionais apresentadas. De fato, a Figura 49 apresenta este comportamento.

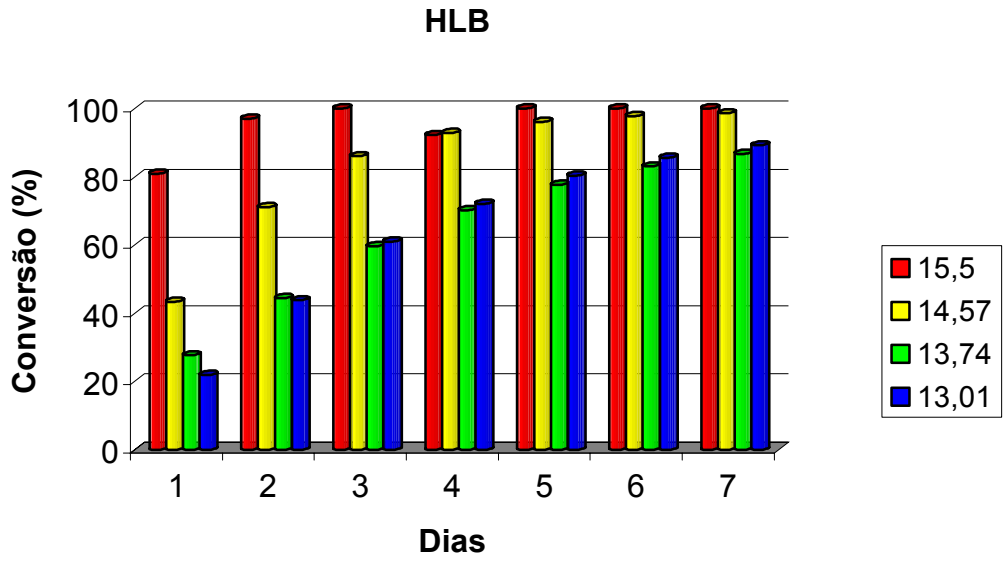


Figura 49: Influência dos valores de HLB nas conversões dos ésteres de sacarose.

6.1.7 Adipato de ácido ascórbico (6-*O*-diviniladipoil ácido ascórbico)

6.1.7.1 A influência da concentração de enzima, da razão água/DMF e da temperatura na síntese do adipato de ácido ascórbico

As Figuras 50(a) e 50(b) apresentam os resultados e comparações das análises, por TLC, da síntese do adipato de ácido ascórbico sem e com a adição de enzima, respectivamente, para várias razões de água/ DMF.

Foi constatado (por TLC) que a reação iniciava, assim que o adipato de vinila era adicionado ao meio reacional, mesmo antes da introdução da enzima. Na Figura 50a (condição sem enzima), pode-se perceber pelas placas A, B, C e D que houve formação de adipato de ácido ascórbico em todas as placas (linha 1). As marcas com maior intensidade ocorreram nas placas B (5% de água) e C (10% de água). No entanto, em todas elas (com exceção da "C") foi constatado que havia ácido ascórbico residual (linha 2) e este fato prejudica o processo de purificação.

Na Figura 50b (condição com enzima), da mesma forma, todas as placas indicaram a formação do éster de ácido ascórbico, sendo que somente as placas F e G apresentaram marcas discretas de substrato residual.

Por outro lado, a placa I (condição sem enzima), apresentou a formação do adipato de ácido ascórbico e nenhuma marca relativa ao substrato residual. Assim, optou-se por efetivar esta síntese nas seguintes condições reacionais: ácido ascórbico (0,125M), adipato de vinila (0,500M), 10% de água, sem enzima, 60°C e 130 rpm.

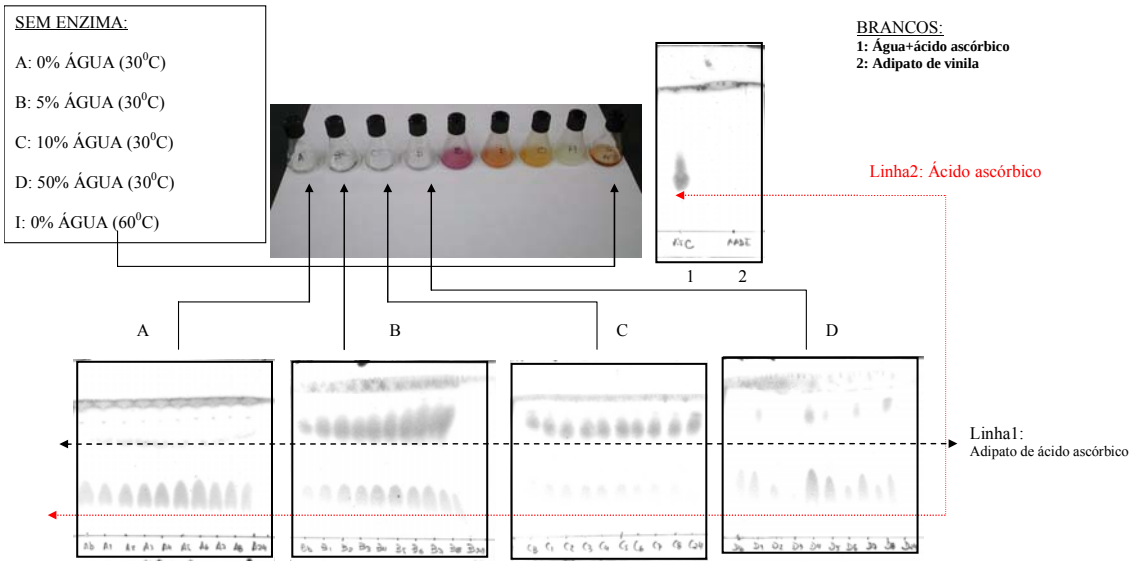


Figura 50(a): Resultados das análises, por TLC, da síntese do adipato de ácido ascórbico sem a adição de enzima, para várias razões de água/ DMF.

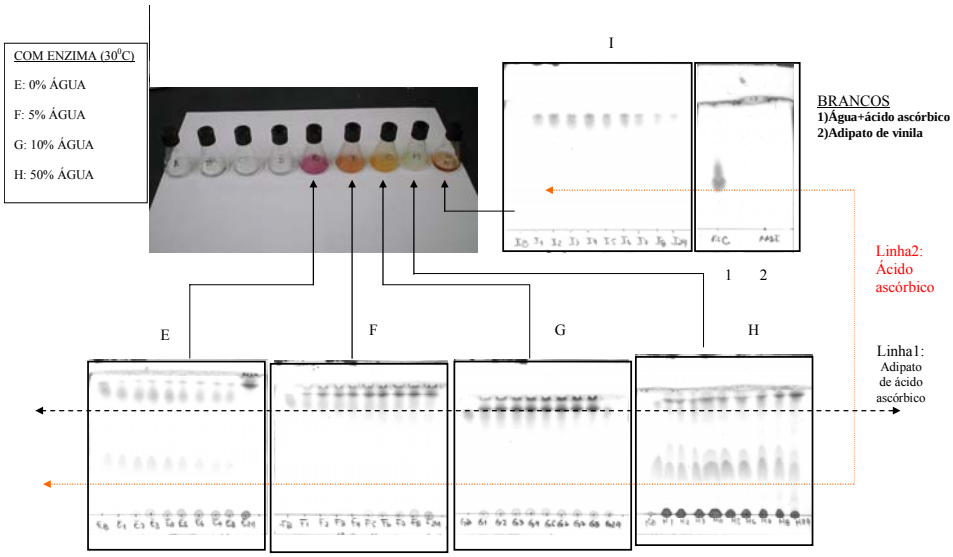


Figura 50(b): Resultados das análises, por TLC, da síntese do adipato de ácido ascórbico, com a adição de enzima, para várias razões de água/DMF.

6.1.7.2 Conversão do ácido ascórbico em adipato de ácido ascórbico

A Figura 51 apresenta os valores da conversão de ácido ascórbico em adipato de ácido ascórbico, ao longo do tempo, obtidos em HPLC. As condições reacionais utilizadas foram: razão molar adipato de vinila/ ácido ascórbico: 4/1; razão água/ DMF: 1/9; concentração de enzima: sem enzima; temperatura: 60°C; agitação: 160 rpm; tempo: 24 horas. Ao final da reação a mistura foi concentrada, para retirar o DMF (procedimento descrito no item 5.1.10) e pesada. O produto bruto obtido apresentou uma massa de 20,00 g.

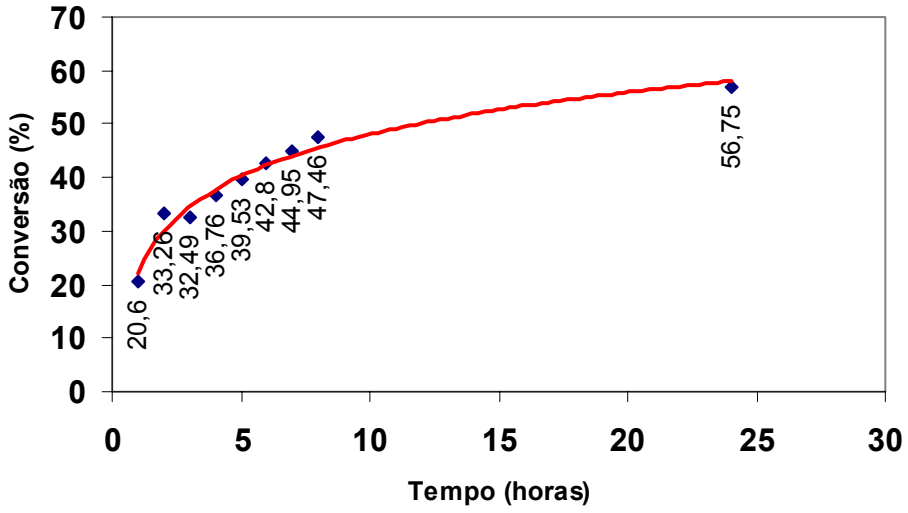


Figura 51: Variação da conversão com o tempo na síntese do adipato de ácido ascórbico, a 60°C, 160 rpm, 24 horas, na ausência de enzima.

6.1.7.3 Purificação em coluna cromatográfica

A Figura 52 apresenta o resultado da análise qualitativa em TLC do adipato de ácido ascórbico, após separação e purificação em coluna cromatográfica. A fase C9 (provável adipato de ácido ascórbico), após concentração, apresentou uma massa de 0,46 g. Assim, em relação ao produto bruto (20,00g), a porcentagem de massa obtida foi de 2,30%.

Este rendimento foi muito baixo em relação aos ésteres de açúcar, que apresentaram valores entre 25,95 e 38,24%. Yan (2001) investigou a síntese catalisada por lipases de vários ésteres de vitamina C: 6-*O*-octanoil L-ácido

ascórbico, 6-*O*-decanoil L-ácido ascórbico, 6-*O*-lauroil L-ácido ascórbico e 6-*O*-palmitoil L-ácido ascórbico. O autor revela que, inicialmente, tentou-se purificar os produtos brutos destes ésteres por coluna cromatográfica. Entretanto, este método acarretou em perdas consideráveis no processo. Assim, foi desenvolvido um processo de purificação, através de extração em acetona a 30°C para a retirada de subprodutos, seguido de lavagem com água, para remover ácido ascórbico residual, bem como oxidar o excesso de éster vinílico para ácido graxo. Por fim, a extração com *n*-hexano permitiu separar o ácido (solúvel) do éster (insolúvel) no solvente. Os rendimentos variaram de 38 a 86% em relação às massas dos produtos brutos obtidos.

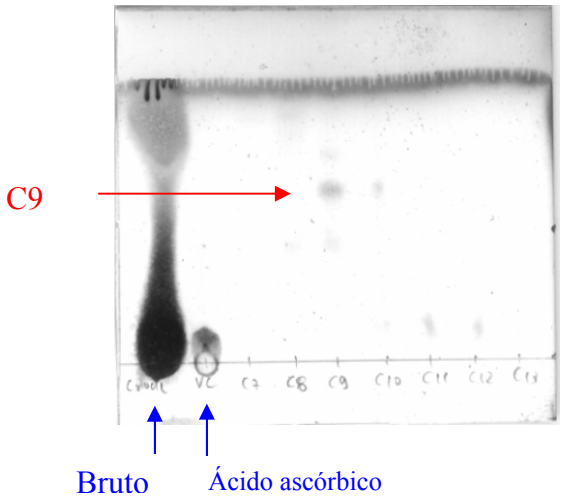


Figura 52: Análise em TLC da coluna cromatográfica para a separação e purificação do adipato de ácido ascórbico.

6.1.7.4 Identificação da estrutura química e da posição de acilação por ^{13}C-RMN

A Figura 53 apresenta os espectros de ^{13}C-RMN do ácido ascórbico e do adipato de ácido ascórbico, com as respectivas atribuições dos sinais aos grupos presentes na molécula. Foi observada uma forte mudança no deslocamento químico do sinal relativo ao carbono C5 para campo alto, assim como uma mudança no deslocamento químico do carbono C6 para campo baixo. Estas mudanças sugerem a obtenção do éster de ácido ascórbico

substituído em C6, de aspecto viscoso e coloração castanho-claro: 6-*O*-viniladipoil-ácido ascórbico: ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*): δ 23,67; 23,56; 23,44; 32,73; 35,89; (-CH2-), 64,66 (C5); 65,64 (C6); 75,15 (C4); 118,31(C3); 152.29 (C2); 162,44 (C1); 170,46 (C=O); 172,63 (C=O).

A Tabela 9 ilustra melhor as mudanças nos deslocamentos químicos entre o ácido ascórbico e o adipato de ácido ascórbico.

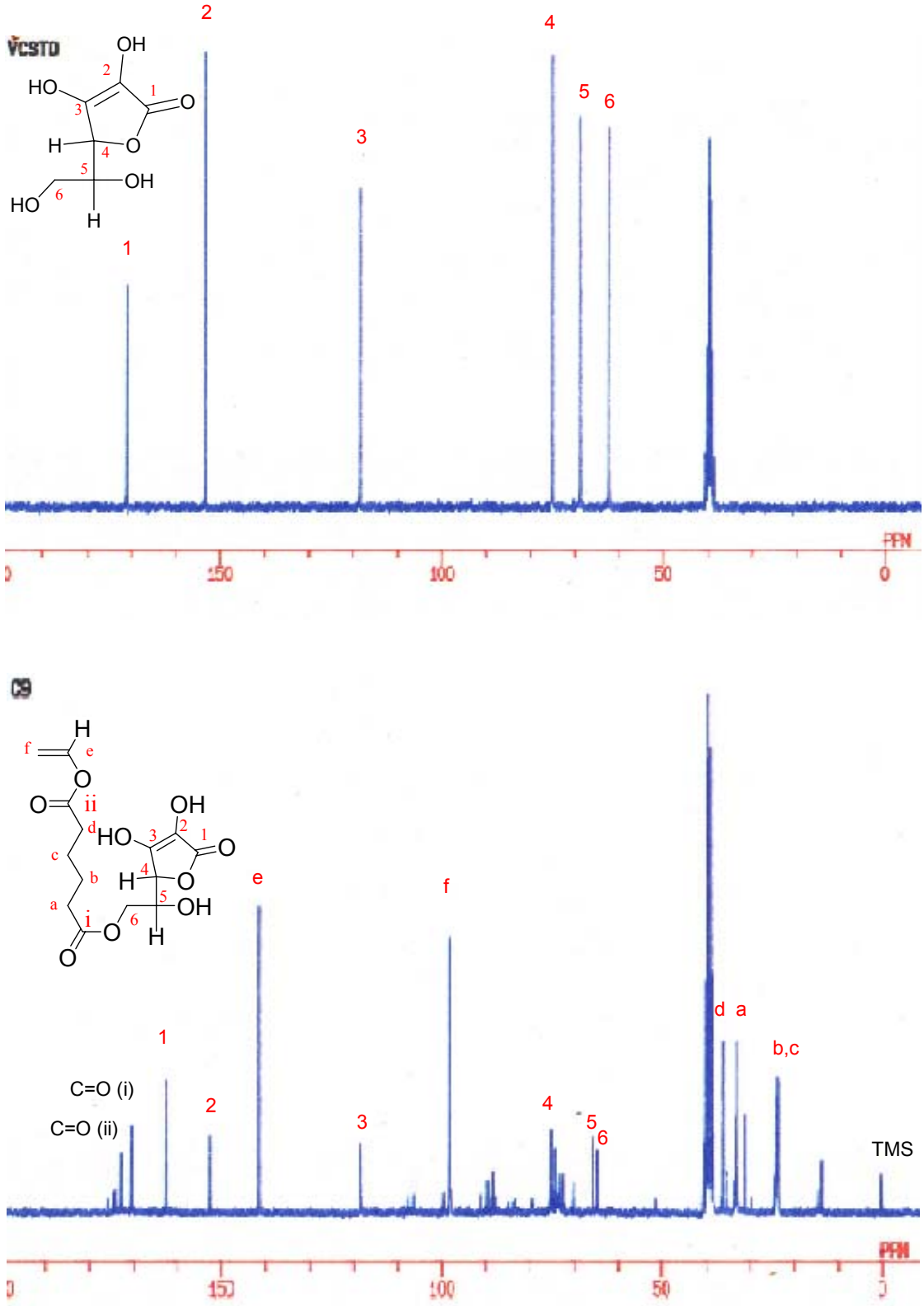
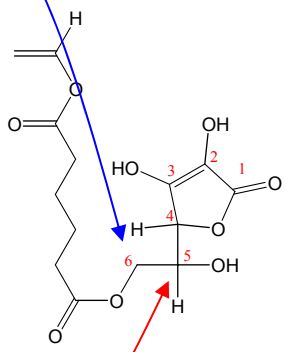


Figura 53: Espectro de ^{13}C-RMN do ácido ascórbico (A) e do adipato de ácido ascórbico (B).

Tabela 9: Mudanças nos deslocamentos químicos entre o ácido ascórbico e o adipato de ácido ascórbico.

Posição	*Ácido ascórbico* δ(ppm)	*Adipato de ácido ascórbico* δ(ppm)	*Baixo campo*	*Alto campo*
C1	170,93	162,44		0,47
C3	118,20	118,31	0,11	
C2	153,21	152,29		0,92
C4	74,90	75,15	0,25	
C5	68,65	64,66		3,99
C6	62,25	65,64	3,40	
C=O (i)		170,46		
C=O(ii)		172,63		
-CH_2- (d)		35,89		
-CH_2- (a)		32,73		
-CH_2- (c)		23,67		
-CH_2- (b)		23,56		
=CH_2 (f)		97,95		
=CH-(e)		141,31		



6.1.7.5 Determinação do valor de HLB para o adipato de ácido ascórbico

A Figura 54 apresenta o resultado do valor de HLB obtido para o adipato de ácido ascórbico, calculado pela equação de Griffin (Equação 2). Os valores das massas molares foram obtidos com o auxílio do programa CS Chem DrawUltra da CambridgeSoft Corporation.

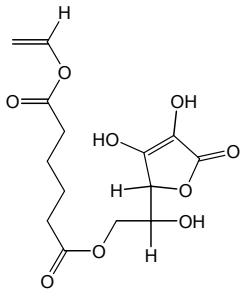
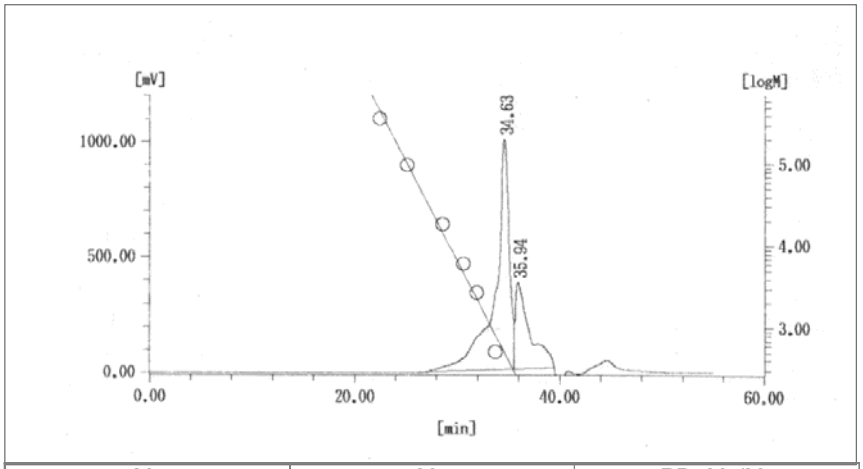
ADIPATO DE ÁCIDO ASCÓRBICO	PARTE HIDROFÍLICA	MASSA MOLAR TOTAL	VALOR DE HLB
	$C_6H_7O_6^{\bullet}$ Massa Mol. Wt.: 175,12 C. 41,15; H. 4,03; O. 54,82	$C_{14}H_{18}O_9$ Massa mol.: 330,29 C. 50,91; H. 5,49; O. 43,60	HLB = 20*(175,12/330,29) HLB = 10,60

Figura 54: Estrutura química e valor de HLB, de acordo com a equação de Griffin (Equação 2), para o adipato de ácido ascórbico sintetizado.

6.1.7.6 Polimerização do 6-*O*-viniladipoil ácido ascórbico e determinação da massa molar

Seguindo as condições reacionais, purificação e polimerização relatadas nos itens 5.1.10, 5.1.11 e 5.1.13, respectivamente, a formação do polímero poli (6-*O*-viniladipoil ácido ascórbico) acarretou um aumento de viscosidade no meio reacional. Ao final do processo de polimerização, algumas gotas da solução, contendo o polímero, foram colocadas em um frasco com acetona sob forte agitação e verificou-se a formação de um precipitado, indicando um possível sucesso na polimerização. A solução, contendo o polímero, foi lavada em acetona e secada em vácuo, apresentando uma coloração amarelo-claro. Em seguida, uma solução, contendo o polímero, como descrito no item 5.1.14 foi injetada no HPLC para análise por cromatografia de exclusão por tamanho (GPC).

A Figura 55 apresenta o cromatograma, a curva de calibração e os valores da massa molar numérica média (M_n), da massa molar ponderal média (M_w) e da polidispersão (PD), obtidos para o polímero de ácido ascórbico.



M_n	M_w	PD=M_w/M_n
$6,1x10^2$	$1,4x10^3$	2,3

Figura 55: Cromatograma, curva de calibração e os valores de massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e da Polidispersão (PD) obtidos para o polímero de ácido ascórbico.

A vitamina C possui alta eficiência antioxidante em meios aquosos. Entretanto seu elevado caráter hidrofílico não permite a sua aplicação em produtos que contenham óleos e gorduras. O polímero de vitamina C obtido, pode superar esta dificuldade por possuir uma boa lipofilicidade. Seu monômero de origem, com valor de HLB de 10,50 permite sua aplicação como estabilizador de emulsões de óleo em água (Tabela 1). Os resultados obtidos por GPC, indicaram a formação de um polímero de baixa massa molar e baixa polidispersão, contendo uma molécula de vitamina C pendurada na cadeia principal. Esse tipo de material pode apresentar aplicabilidade em formulações injetáveis de sistemas de liberação controlada de fármacos (LAWRENCE, 2000).

6.2 Obtenção dos ésteres de sacarose, D-glicose, L-arabinose e dos respectivos polímeros – 2ª etapa

6.2.1 Otimização das variáveis por DOE

Considerando-se a quantidade de experimentos para a síntese enzimática de seis ésteres de açúcar, envolvendo três tipos de açúcar e dois tipos de ésteres de vinila, tomou-se por base a reação entre o laurato de vinila e a sacarose para o estudo dos efeitos da concentração de enzima (E), da razão molar éster vinílico/sacarose (XM), da razão água/DMF (AG), da temperatura (TE) e do tempo (TPO) na síntese enzimática destes compostos, através de análise fatorial por RSM (*Response Surface Methodology*).

6.2.1.1 Resultados das conversões de sacarose em laurato de sacarose

O sistema MODDE 7.0™ gerou, automaticamente, uma matriz de experimentos (“worksheet”) a serem realizados no laboratório, contendo uma seqüência aleatória de ensaios com diversas condições reacionais. Em seguida, foram introduzidas, na matriz, as respostas (conversões) obtidas, através de análises no HPLC. A Tabela 10 apresenta esta programação de trabalho, com os resultados experimentais obtidos na síntese do laurato de sacarose.

Tabela 10: Matriz de experimentos gerada pelo sistema para a análise dos cinco fatores.

Experimento	E(mg/mL)	TPO(dias)	XM	AG(%)	TE (°C)	Y(%)
N1	40	1	1	0	30	8,17
N2	40	7	4	20	30	65,00
N3	10	7	1	0	30	8,33
N4	10	1	4	0	30	10,63
N5	40	7	4	0	30	69,12
N6	20	1	1	10	30	4,37
N7	40	7	4	10	30	67,64
N8	40	7	4	10	30	70,00
N9	40	7	1	20	30	29,30
N10	10	3	2	20	30	4,20
N11	40	1	4	20	30	33,54
N12	10	7	4	20	30	10,00
N13	10	1	1	0	50	6,56
N14	40	7	4	0	50	98,00
N15	40	1	4	0	50	29,37
N16	20	3	4	0	50	43,41
N17	10	7	4	0	50	69,70
N18	20	7	2	10	50	32,71
N19	40	7	4	10	50	65,00
N20	10	7	1	20	50	12,87
N21	10	1	4	20	50	6,31
N22	40	7	4	20	50	22,03
N23	40	7	4	20	50	23,66
N24	40	7	4	20	50	22,52
N25	40	7	4	20	50	27,08

*Y = Valores das conversões obtidas no HPLC.

6.2.1.2 Valores de R2, Q2, Validade do Modelo e Reprodutibilidade

Em Metodologia de Superfície de Resposta, R2 significa a porcentagem da variação da resposta gerada pelo modelo, indicando o quanto este se aproxima dos dados experimentais. Um alto valor de R2 (próximo de 1,0) é condição necessária, mas não suficiente para um bom modelo. Para que este seja bem representativo, ainda são necessárias uma boa reprodutibilidade e uma boa validade do modelo. Q2 é a porcentagem de variação das respostas obtidas numericamente. Valores de Q2 menores que 0,8 indicam que termos insignificantes do modelo devem ser eliminados. Para a Validade do Modelo, valores acima de 0,25 indicam que não existem falhas significantes, ou seja, o erro do modelo é da mesma ordem de grandeza que o erro puro. A

Reprodutibilidade é a variação da resposta sob as mesmas condições. Quando a Reprodutibilidade é igual a 1,0, significa que o erro puro é zero, ou seja, para as mesmas condições os valores das respostas são idênticas.

Para o estudo da síntese do laurato de sacarose, os valores obtidos foram R2: 0,9967; Q2: 0,9395; Validade do Modelo: 0,7146 e Reprodutibilidade: 0,9938. A Figura 56 apresenta, graficamente, estes valores.

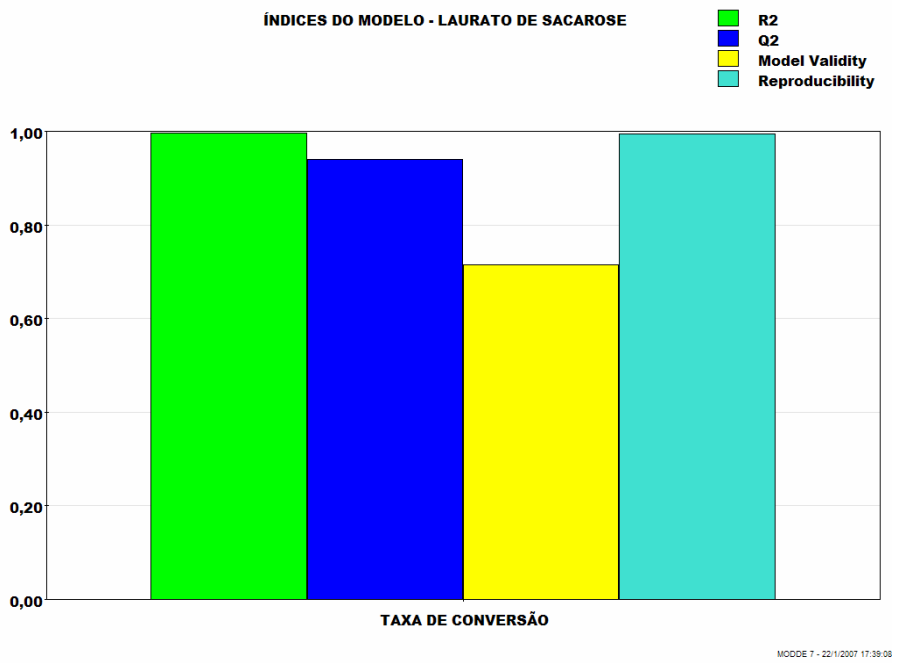


Figura 56: Resumo dos parâmetros para a validade do modelo na otimização de variáveis para a síntese do laurato de sacarose.

6.2.1.3 Resultados experimentais *versus* resultados numéricos

Os resultados numéricos foram bem próximos dos resultados experimentais. A Figura 57 apresenta a comparação entre os resultados experimentais e os resultados numéricos. Os pontos da curva ficaram próximos à curva de 45°. Isto implica que o modelo representa bem as relações entre os parâmetros reacionais.

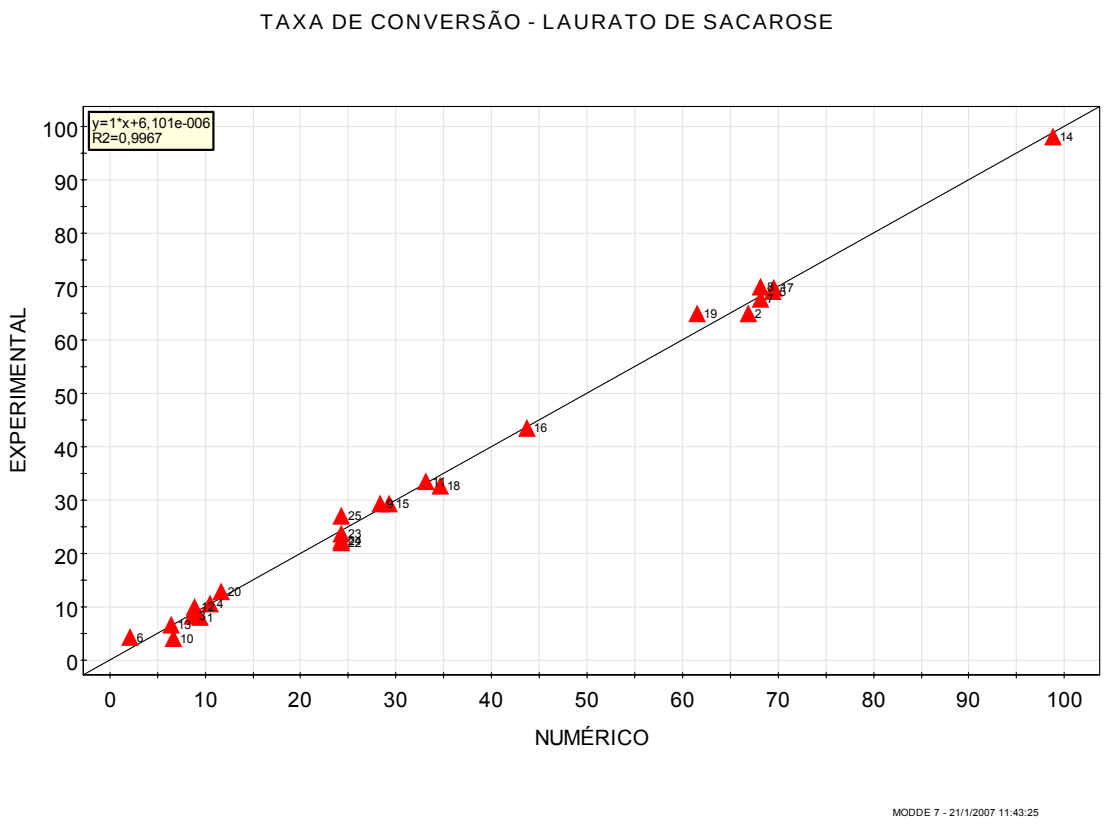


Figura 57: Comparação entre os resultados experimentais e os resultados numéricos.

6.2.1.4 Principais efeitos dos fatores na resposta

A Figura 58 apresenta a influência e os efeitos dos fatores reacionais na transesterificação enzimática de açúcar em éster de açúcar e, no caso, de sacarose em laurato de sacarose. Como esperado, os resultados obtidos no presente trabalho foram coerentes com os resultados alcançados por outros autores (DORDICK, 1994; TOKIWA, 1998; RAKU, 2003). Entretanto, poucos trabalhos abordam o estudo da síntese enzimática de ésteres de açúcar por análise fatorial. Verificou-se que o rendimento da reação é favorecido pelo aumento do tempo de reação (TPO), pelo aumento da razão molar laurato de vinila/ sacarose (XM), pelo aumento da concentração de enzima (E) e pelo aumento da temperatura (TE). Entretanto, é desfavorecido pelo aumento da razão água/solvente (AG).

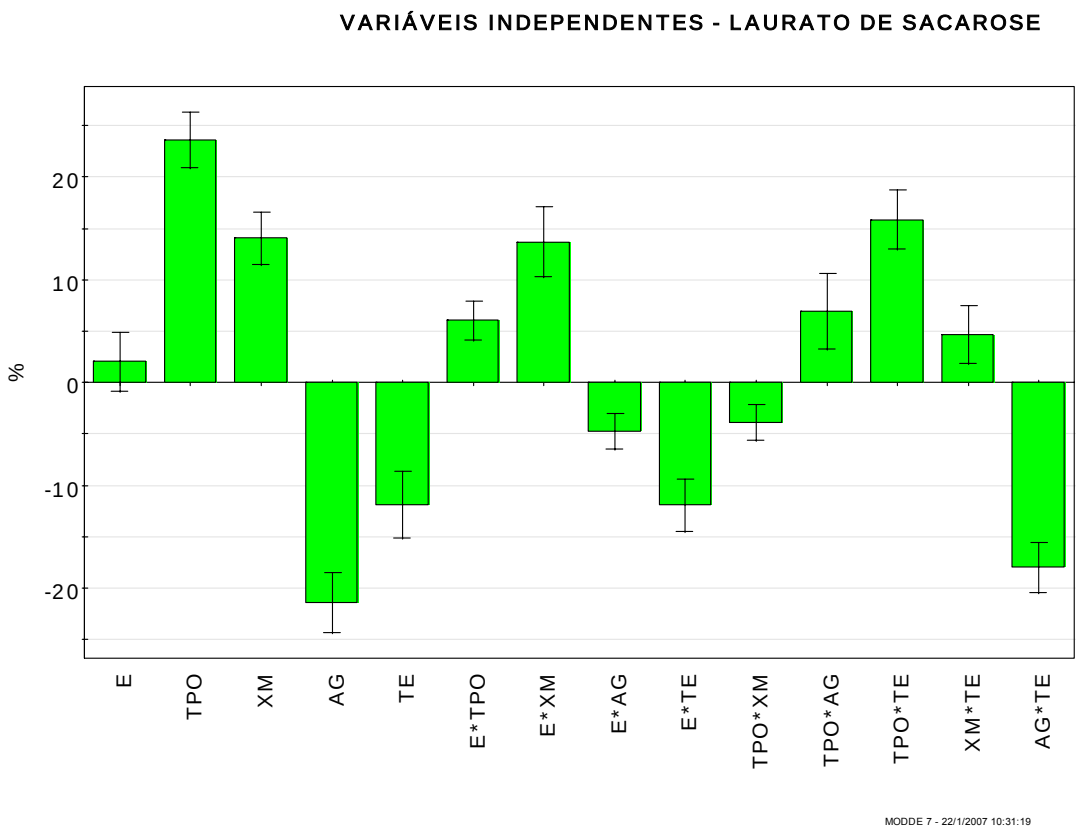


Figura 58: Influência e efeito dos fatores reacionais na transesterificação enzimática de sacarose em laurato de sacarose.

Uma vez determinados os coeficientes de primeira ordem e quadráticos, a Equação 4 fica definida como:

$$Y = 9{,}20 + 23{,}61TPO + 14{,}06XM - 21{,}41AG - 11{,}89TE + 6{,}07E*TPO + 13{,}71E*XM - 4{,}77E*AG - 11{,}93E*TE - 3{,}82TPO*XM + 6{,}91TPO*AG + 15{,}86TPO*TE + 4{,}67XM*TE - 18{,}00AG*TE \quad \textbf{(5)}$$

6.2.1.5 Otimização das variáveis independentes

O emprego de Metodologia de Superfície de Resposta permite avaliar as relações entre cada variável e o resultado, assim como predizer os resultados e comportamento sob dadas condições reacionais. No entanto, deve-se observar que os limites para cada parâmetro foram pré-definidos, antes da otimização, de acordo com a Tabela 2. A principal vantagem do uso desta metodologia neste estudo é viabilizar a produção industrial de ésteres de açúcar com o menor custo possível. Em outras palavras, são desejados altos rendimentos em curto espaço de tempo, com temperatura moderada e sem formação de subprodutos.

Gráficos de superfície com curvas de nível são bem apropriados para se avaliar as relações entre as variáveis independentes deste processo. Em geral, altas concentrações de enzima, altas razões molares entre os substratos e longos tempos de reação contribuem, favoravelmente, na conversão de substratos em produtos (YAN, 2001). Entretanto, as variáveis “temperatura” e “razão água/DMF” apresentam um comportamento mais complexo. Pela análise da Figura 58 é possível se perceber que estas duas variáveis, isoladamente, contribuíram desfavoravelmente nas conversões.

A Figura 59 apresenta a influência do aumento da concentração de enzima nas conversões de sacarose em laurato de sacarose, para as seguintes condições reacionais: razão molar entre laurato de vinila e sacarose igual a 4; razão água/DMF igual a zero e temperatura 50°C.

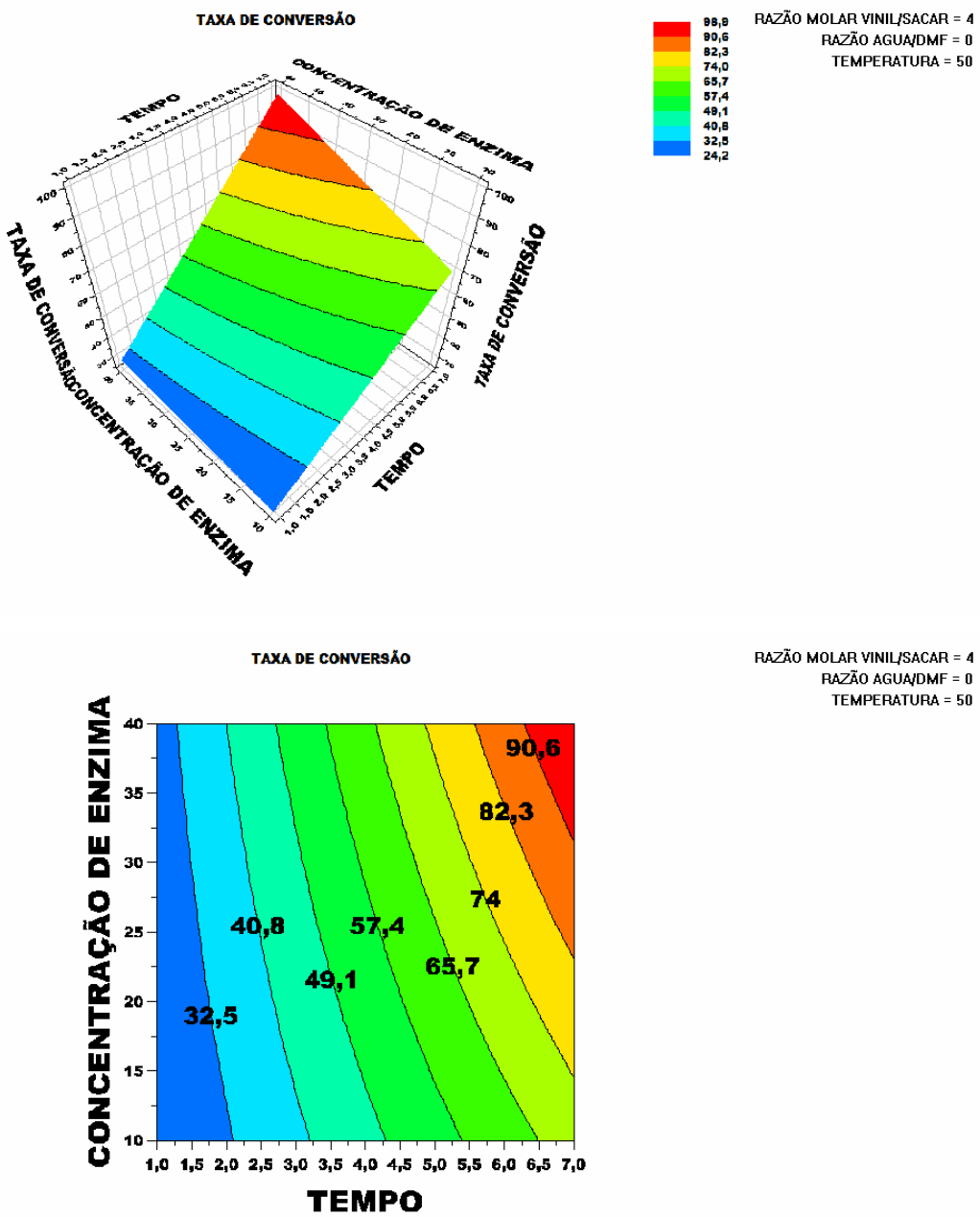
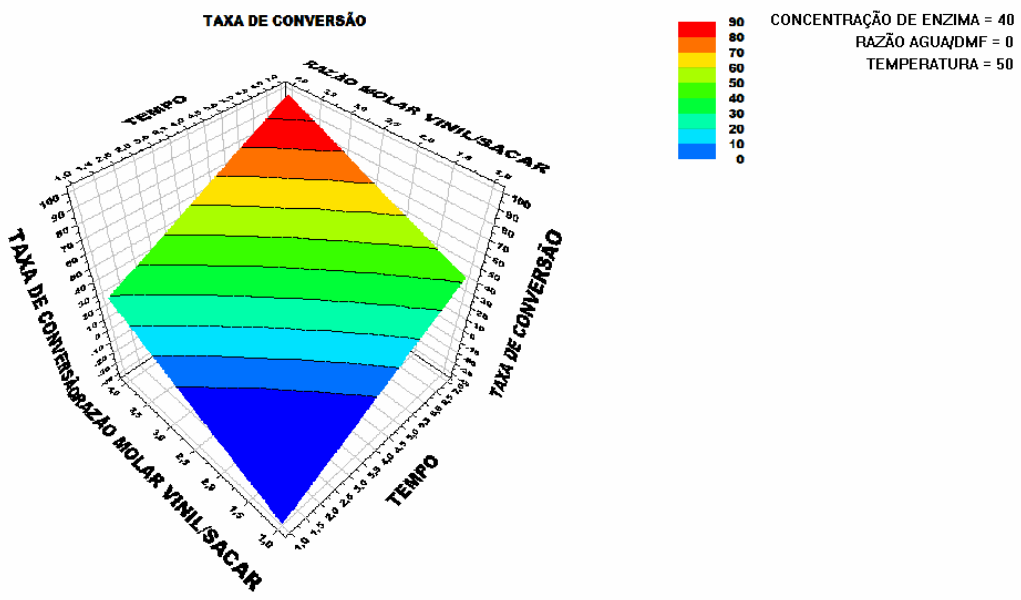


Figura 59: Previsão da conversão de sacarose em laurato de sacarose gerada através de análise fatorial por RSM. Efeito da concentração de enzima e tempo de reação.

A Figura 60 apresenta a influência do aumento da razão molar dos substratos na conversão de sacarose em laurato de sacarose, para as seguintes condições reacionais: concentração de enzima igual a 40 mg/mL; razão água/DMF igual a zero e temperatura 50°C.



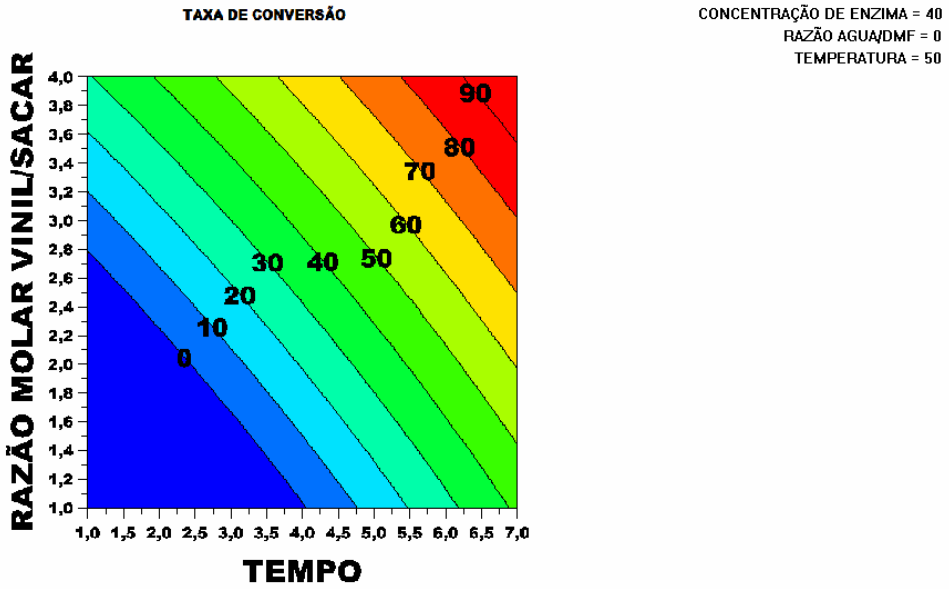
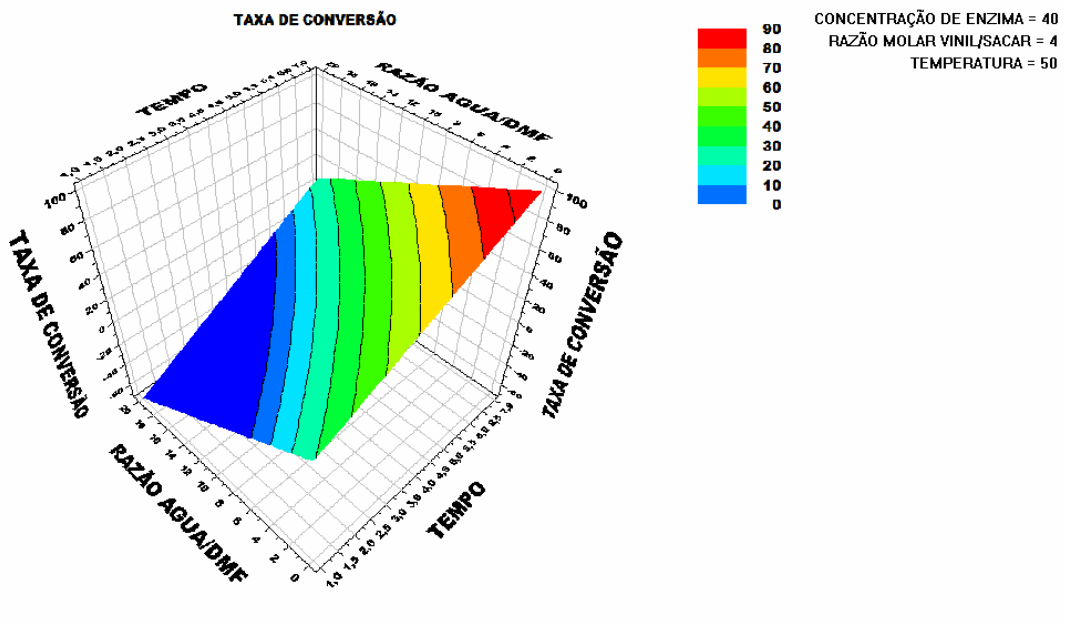


Figura 60: Previsão da conversão de sacarose em laurato de sacarose gerada através de análise fatorial por RSM. Efeito da razão molar dos substratos e do tempo de reação.

A Figura 61 apresenta a influência do aumento da adição de água na conversão de sacarose em laurato de sacarose, para as seguintes condições reacionais: concentração de enzima igual a 40 mg/mL; razão molar laurato de vinila/ sacarose igual a 4 e temperatura 50°C.



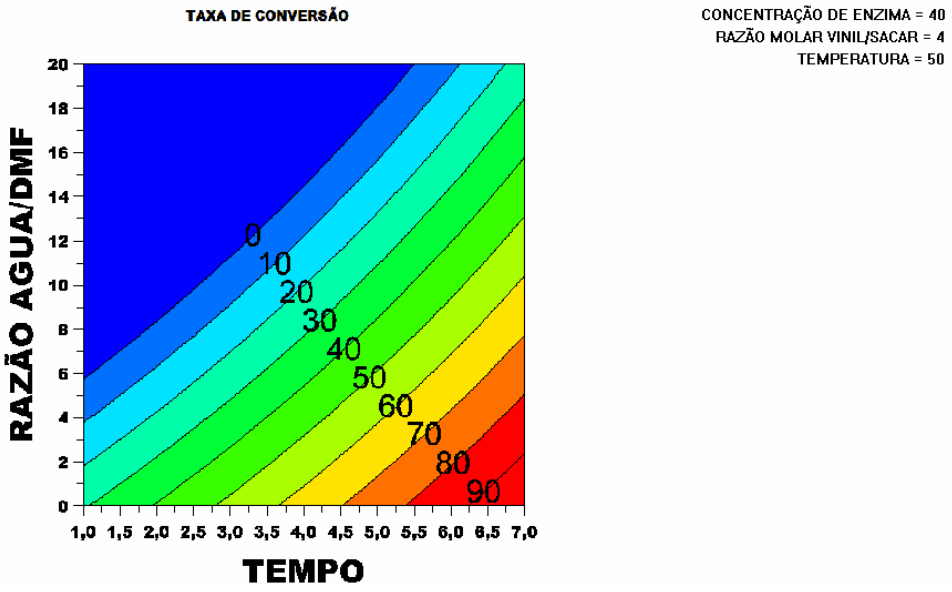


Figura 61: Previsão da conversão de sacarose em laurato de sacarose gerada através de análise fatorial por RSM. Efeito da adição de água e do tempo de reação.

No caso específico da razão água/DMF, a previsão mostrada na Figura 61 está em desacordo com o apresentado na síntese do mesmo produto descrito na Etapa 1 (Figuras 37 e 38), onde a adição de 10% de água aumentou, significativamente, o rendimento da reação em apenas 60 minutos (52%), para as mesmas condições reacionais. Isto pode ser explicado com base em dois fatores: (1) na Etapa 1, o solvente DMF foi previamente

desidratado através do uso de peneiras moleculares de tamanho de poro 0,3nm, sob agitação, durante 24 horas, antes do início da reação; (2) a protease de *Bacillus subtilis* empregada foi liofilizada antes do seu uso, enquanto que a enzima usada na Etapa 2 deste trabalho não recebeu o mesmo tratamento, sendo utilizada da forma como recebida. Segundo o fabricante, nestas condições, a protease de *Bacillus subtilis* fornecida apresenta teor de umidade de até 10%. Entretanto, com certeza, a adição de água favorece a síntese enzimática (MEDINA, 1999; RAKU, 2003) e uma faixa menor de razões água/DMF, como por exemplo, entre 0 e 5% (v/v) deve ser investigada.

A Figura 62 apresenta a influência do aumento da temperatura na conversão de sacarose em laurato de sacarose, para as seguintes condições reacionais: concentração de enzima igual a 40 mg/mL; razão água/DMF igual a zero e razão molar laurato de vinila/ sacarose igual a 4.

Embora a temperatura apresente um coeficiente de primeira ordem negativo (-11,89), influenciando na queda de rendimento da reação, a Equação 5, como um todo, reproduz um aumento na conversão com o aumento da temperatura, certamente devido à contribuição dos coeficientes positivos de segunda ordem.

A otimização deste processo com cinco fatores e uma resposta não pode ser calculada analiticamente, através da Equação 5, por existir mais do que uma condição ótima. No entanto, estas podem ser obtidas diretamente do sistema, através de cálculos iterativos para uma faixa de valores de variáveis independentes. A Tabela 11 apresenta uma seqüência de iterações com três diferentes condições ótimas para conversões superiores a 97%.

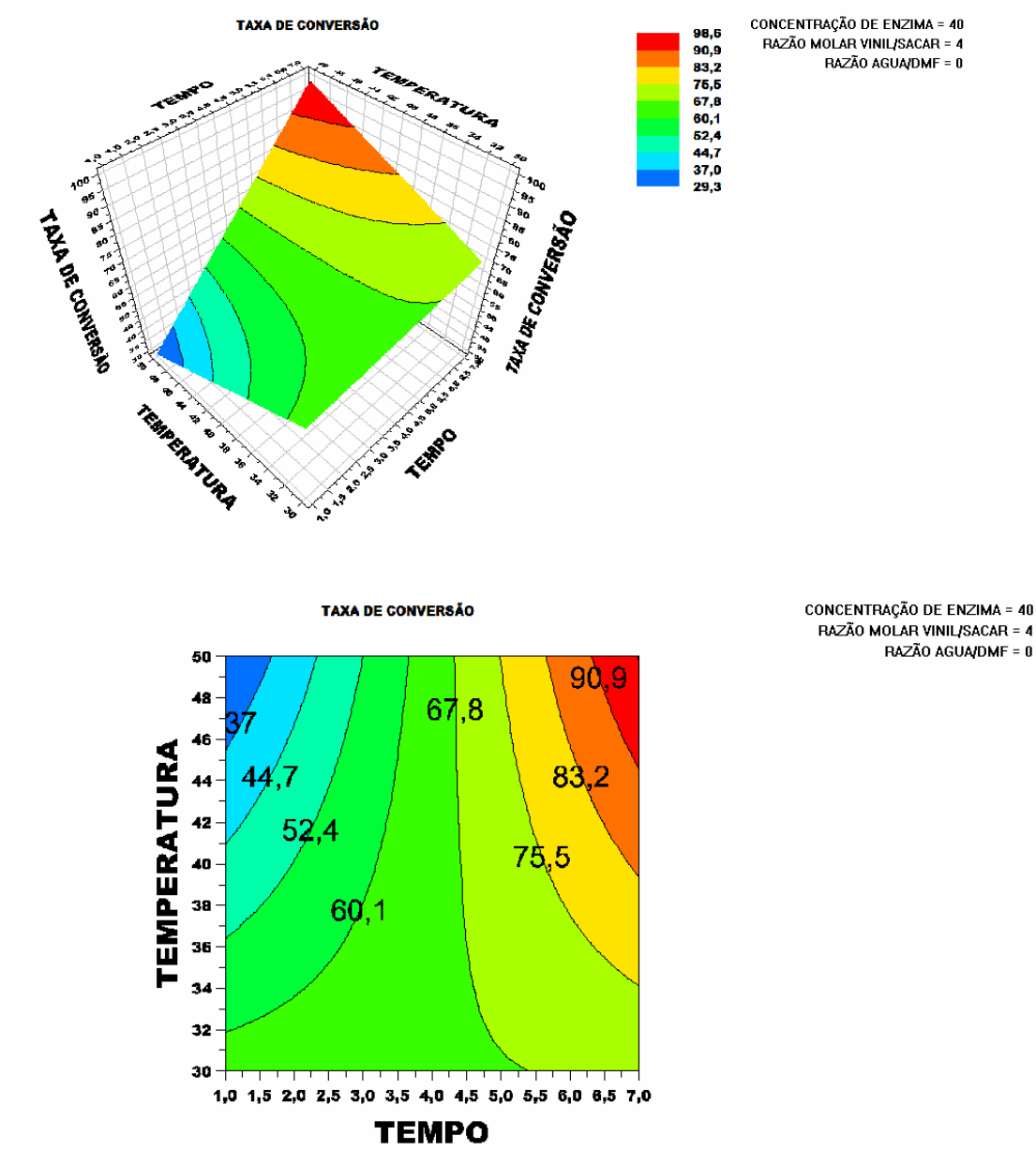


Figura 62: Previsão da conversão de sacarose em laurato de sacarose gerada através de análise fatorial por RSM. Efeito da temperatura e do tempo de reação.

Tabela 11: Seqüência de iterações com três diferentes condições ótimas para conversões superiores a 97%.

E (mg/mL)	TPO (dias)	XM	AG (%)	TE (°C)	Y(%)	Iterações
39,9996	6,976	3,5635	19,9956	31,492	57,735	370
37,6204	6,9999	3,9952	0,0003	41,827	82,885	377
40	6,7208	4	1,4281	30,445	69,354	271
37,9547	6,9933	4	0,0296	42,006	83,683	410
39,8053	7	3,969	0,0374	36,773	78,495	591
39,8158 *	6,9842	3,9884	0	49,997	98,265	442
40 *	7	4	0	50	98,852	136
39,9989 *	6,9304	4	0,016	49,499	97,267	332

* Condições ótimas

A Figura 63 apresenta a influência geral das variáveis na conversão para o laurato de sacarose.

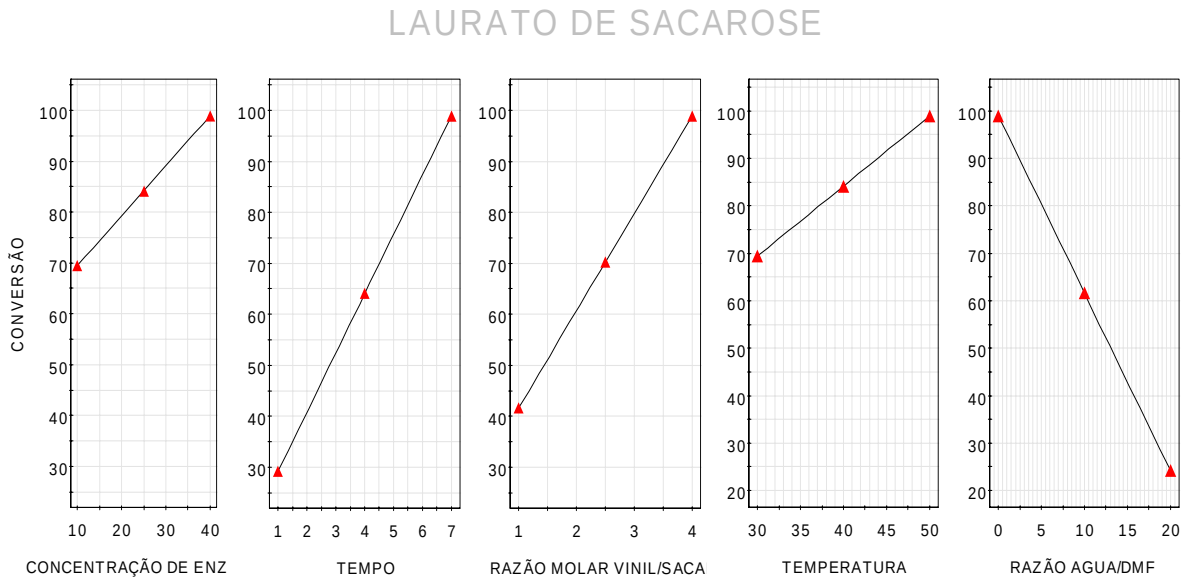


Figura 63: Influência das variáveis reacionais: concentração de enzima, tempo, razão molar laurato de vinila/ sacarose, temperatura e razão água/DMF na conversão de sacarose em laurato de sacarose (nesta ordem).

6.2.2 Síntese dos ésteres laurato de L-arabinose, laurato de D-glicose e laurato de sacarose

Com base nos resultados apresentados na Tabela 11, adotaram-se as seguintes condições reacionais para a síntese destes ésteres de açúcar: concentração de enzima: 40 mg/mL; razão molar éster vinílico/ açúcar: 4/1; razão água/DMF: 0; temperatura: 50°C; tempo: 7 dias; agitação: 160 rpm.

A Figura 64 apresenta as análises em TLC das amostras de laurato de L-arabinose (5-*O*-lauroil L-arabinose), de laurato de D-glicose (6-*O*-lauroil D-glicose) e de laurato de sacarose (1'-*O*-lauroil sacarose). As três primeiras manchas, da esquerda para a direita, são relativas à L-arabinose (A), à D-glicose (G) e à sacarose (S). As manchas seguintes são relativas ao laurato de L-arabinose (A'), laurato de D-glicose (G') e laurato de sacarose (S'). Pode-se notar pela figura, que a distância de migração para o laurato de L-arabinose foi maior do que a do laurato de D-glicose, que por sua vez foi maior do que a do laurato de sacarose. Isto pode ser explicado pelo fato de que, no laurato de sacarose, a parte hidrofílica é mais polar do que nos outros dois ésteres, interagindo mais fortemente com a fase estacionária polar (sílica gel).

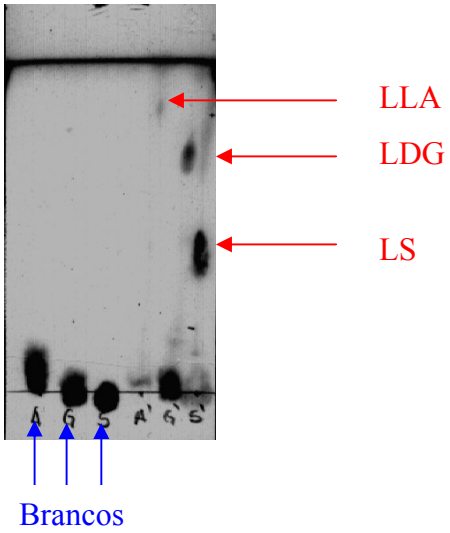


Figura 64: Análises em TLC das amostras brutas de laurato de L-arabinose (A'), de laurato de D-glicose (G') e de laurato de sacarose (S').

6.2.3 Purificação dos ésteres laurato de L-arabinose, laurato de D-glicose e laurato de sacarose

6.2.3.1 Por coluna cromatográfica

Este método foi empregado, apenas, na amostra de laurato de sacarose, para fins de comparação dos resultados com o método por extração em acetona a quente. A Figura 65 apresenta a análise por TLC das fases separadas na coluna.

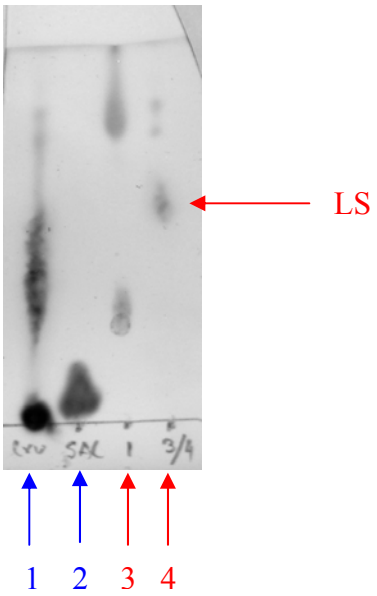


Figura 65: Análise por TLC do produto de síntese do laurato de sacarose evidenciando a separação das fases na coluna cromatográfica.

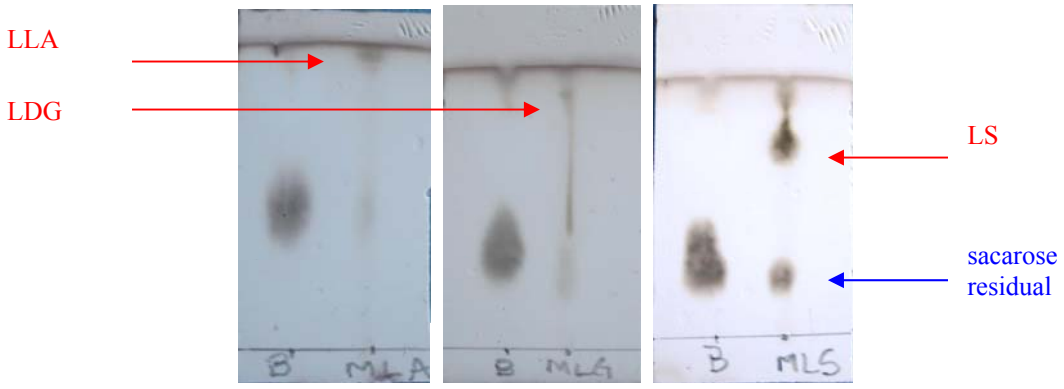
Da esquerda para a direita, as marcas representam: (1) o produto bruto obtido, após a filtração, para a retirada da enzima, seguido de concentração no evaporador rotativo; (2) solução de sacarose 0,125M em DMF; (3) fase consistindo de dois subprodutos, provavelmente di-ésteres. (4) possível laurato de sacarose na marca mais expressiva.

Nas duas fases selecionadas, não foram observados traços de sacarose. No entanto, decidiu-se concentrar, somente, a fase mais à direita da placa (indicada como 3/4).

A massa do produto bruto obtido foi de 0,6306 g e a massa da fase concentrada foi de 0,0733 g, representando 11,62% de produto purificado.

6.2.3.2 Por extração em acetona a quente (50°C)

A Figura 66 apresenta as análises em TLC das amostras de laurato de L-arabinose (a), de laurato de D-glicose (b) e de laurato de sacarose (c), após purificação por extração em acetona a quente (50°C). Em cada placa, a mancha mais à esquerda é relativa aos açúcares e a mancha mais à direita é relativa ao éster de açúcar. Pode-se notar que na placa do laurato de sacarose (c), a mancha relativa ao produto apresentou uma intensidade significativa na linha do açúcar. Em comparação ao método de purificação por coluna cromatográfica (Figura 65) é possível concluir que o método em questão não é o mais indicado para a purificação do laurato de sacarose. No entanto, para o laurato de L-arabinose e o laurato de D-glicose, as manchas relativas aos açúcares foram de fraca intensidade. Dessa forma, a extração em acetona a quente mostra-se um método satisfatório para a purificação destes dois produtos.



(a) (b) (c)

Figura 66: Análises em TLC das amostras de laurato de L-arabinose (a), laurato de D-glicose (b) e laurato de sacarose (c), purificadas por extração com acetona a quente.

A Tabela 12 apresenta um resumo dos valores das massas dos produtos brutos, das fases purificadas e dos rendimentos das purificações destes três ésteres de açúcar.

Tabela 12: Massa dos produtos brutos, das fases purificadas e as relações percentuais das massas, após as purificações para os ésteres: laurato de L-arabinose (LLA), laurato de D-glicose (LDG) e laurato de sacarose (LS).

PRODUTOS	Massa (bruto) g	Massa (puro) g	η %*
LLA[1]	11,15	10,07	90,31
LDG[1]	17,14	9,74	56,83
LS[1]	18,38	9,20	50,05
LS[2]	0,6306	0,0733	11,62

* relação percentual das massas em relação ao produto bruto.
1: purificação por extração em acetona a quente
2: purificação em coluna cromatográfica

Em relação ao laurato de sacarose, a purificação por extração em acetona a quente apresentou um rendimento, aproximadamente, quatro vezes maior do que a purificação em coluna cromatográfica. No entanto, para a determinação da estrutura química por ^{13}C-RMN, selecionou-se a amostra purificada na coluna cromatográfica, com base nos resultados apresentados na Figura 66. Yan et al. (2001) purificaram ésteres de glicose por extração em acetona a 50°C e obtiveram produtos com pureza superior a 99%, confirmada em análise de HPLC.

6.2.4 Identificação da estrutura química e da posição de acilação por ^{13}C-RMN

6.2.4.1 Laurato de arabinose

A Figura 67 apresenta os espectros de ^{13}C-RMN da L-arabinose e do laurato de L-arabinose. Os espectros evidenciaram uma forte mudança no deslocamento químico do sinal relativo ao carbono C4α para campo alto e um deslocamento para campo baixo do sinal relativo ao carbono C5α. Estas mudanças sugerem a síntese do éster de arabinose substituído em C5, 5-*O*-lauroil L-arabinose.

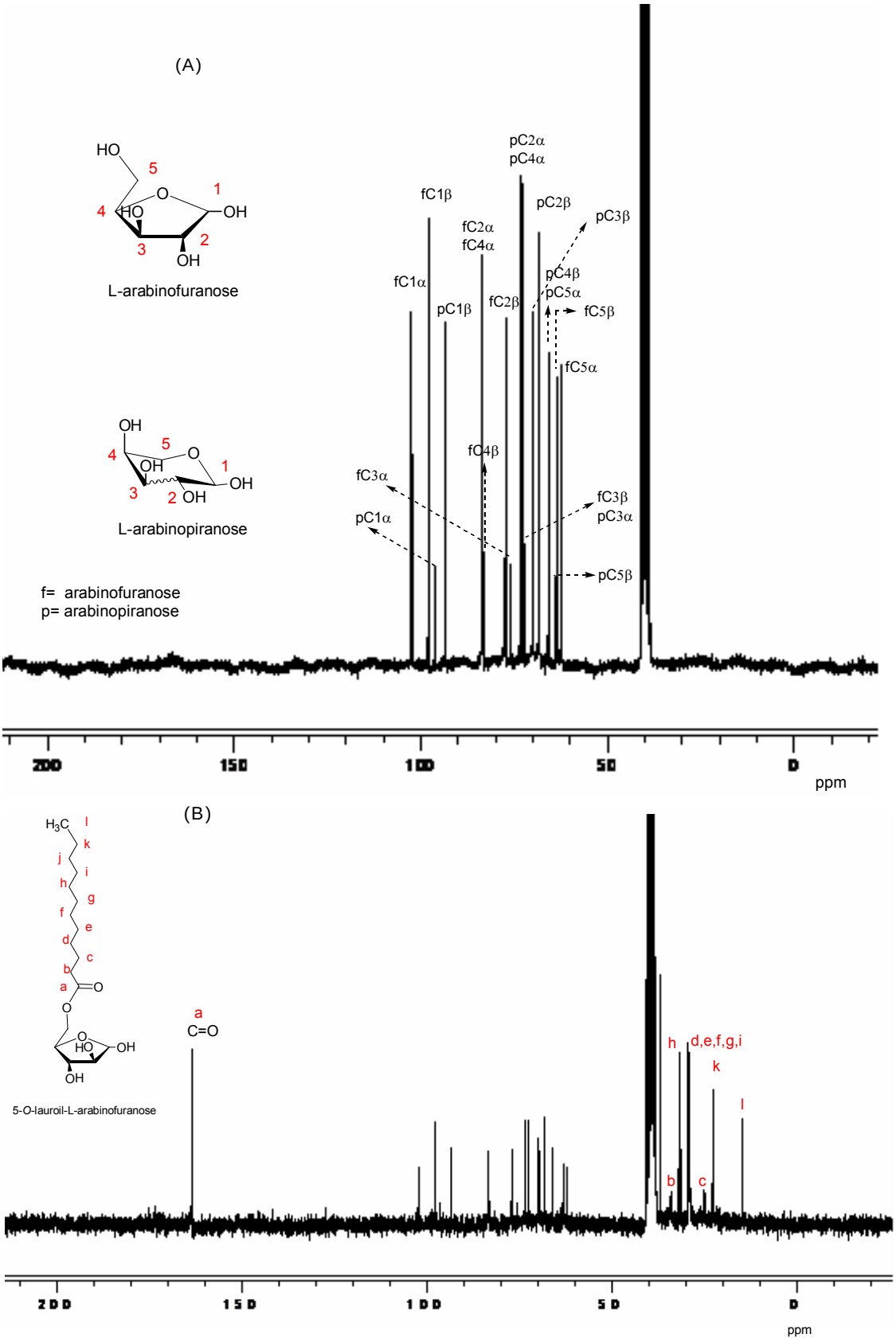


Figura 67: (A) Espectros de ^{13}C-RMN da L-arabinose e (B) do laurato de L-arabinose.

Os deslocamentos químicos da arabinofuranose e da arabinopiranose foram descritas por Bock e Pedersen (1983). A estratégia geral foi a mesma descrita, previamente, por Yoshimoto (1980). A arabinose possui duas estruturas cíclicas distintas: arabinopiranose e arabinofuranose, as quais coexistem em condições de equilíbrio na razão piranose/ furanose: 97/3.

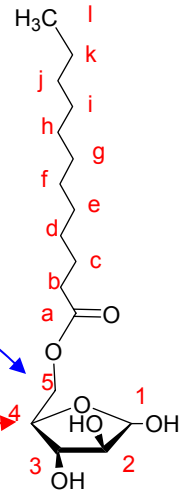
Tokiwa et al.(1999) investigaram a transesterificação de adipato de vinila/ arabinose (4/1), catalisada por protease alcalina de *Streptomyces* sp., a 30°C, por 7 dias e concluíram que, embora a piranose fosse a forma mais abundante que a furanose na conformação da arabinose, somente ocorreu transesterificação do grupo hidroxila primário na arabinofuranose. O produto obtido foi o éster 5-*O*-viniladipoil arabinofuranose, sendo que o éster relativo à arabinopiranose não ocorreu. No entanto, em seu artigo, o autor não apresentou os espectros da L-arabinose e do éster obtido. Observando o espectro da L-arabinose (Figura 67-A), pode-se notar os sinais relativos à arabinopiranose e à arabinofuranose. No espectro da Figura 67-B, pode-se observar sinais relativos ao éster de L-arabinose. Apesar de somente a conformação furanose possuir hidroxila ligada a carbono primário, não fica claro se o éster formado foi, somente, relativo à arabinofuranose. Assim, estes resultados não são conclusivos de que a protease de *Bacillus subtilis* tenha catalisado a reação somente para a forma furanose da conformação da L-arabinose. Neste caso, o texto fará referência ao éster formado como sendo 5-*O*-lauroil L-arabinose

Os resultados mostram deslocamentos químicos de campo alto nos sinais relativos aos carbonos C4α e C4β e deslocamentos químicos de campo baixo nos sinais relativos aos carbonos C5α e C5β. Estas mudanças sugerem a síntese do éster de L-arabinose substituído em C5, 5-*O*-lauroil L-arabinose. ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*): δ(ppm), 22,77; 25,13; 29,10; 29,19; 29,39; 29,57; 29,67; 31,43; 31,96; 33,66 (-CH2-);102,47(C1α); 97,99 (C1β); 83,58(C2α); 77,67 (C2 β); 77,63(C3α); 72,48 (C3β); 80,04(C4α); 79,90 (C4β); 63,26(C5α); 64,79(C5β); 163,08(C=O); 14,60(CH_3).

A Tabela 13 apresenta os deslocamentos químicos dos sinais relativos à L-arabinose e ao laurato de L-arabinose, assim como as evidências para a acilação no C5.

Tabela 13: Deslocamentos químicos entre a L-arabinose e o laurato de L-arabinose e a posição de acilação (C5).

L-ISÔMERO	*Posição*	*L-ARABINOSE (ppm)*	*LLA (ppm)*	*δ (ppm)*
FURANOSE	C1 α	102,03	102,47	-0,44
	C1 β	97,57	97,99	-0,42
	C2 α	83,12	83,58	-0,46
	C2 β	77,38	77,67	-0,29
	C3 α	76,88	77,63	-0,75
	C3 β	72,97	72,48	+0,49
	C4 α	83,05	80,04	+3,01
	C4 β	82,90	79,90	+3,00
	C5 α	61,83	63,26	-1,43
	C5 β	62,84	64,79	-1,95
PIRANOSE	C1 α	95,90		
	C1 β	92,97		
	C2 α	75,37		
	C2 β	69,47		
	C3 α	72,05		
	C3 β	69,64		
	C4 α	75,37		
	C4 β	68,00		
	C5 α	67,84		
	C5 β	65,38		
-CH2-(k)			22,77	
-CH2-(c)			25,13	
-CH2-(d)			29,10	
-CH2-(e)			29,19	
-CH2-(f)			29,39	
-CH2-(g)			29,57	
-CH2-(i)			29,67	
-CH2-(h)			31,43	
-CH2-(j)			31,96	
-CH2-(b)			33,66	
-CH3(l)			14,60	
-C=O(a)			163,08	



6.2.4.2 Laurato de D-glicose

A Figura 68 apresenta os espectros de ^{13}C-RMN da D-glicose e do laurato de D-glicose.

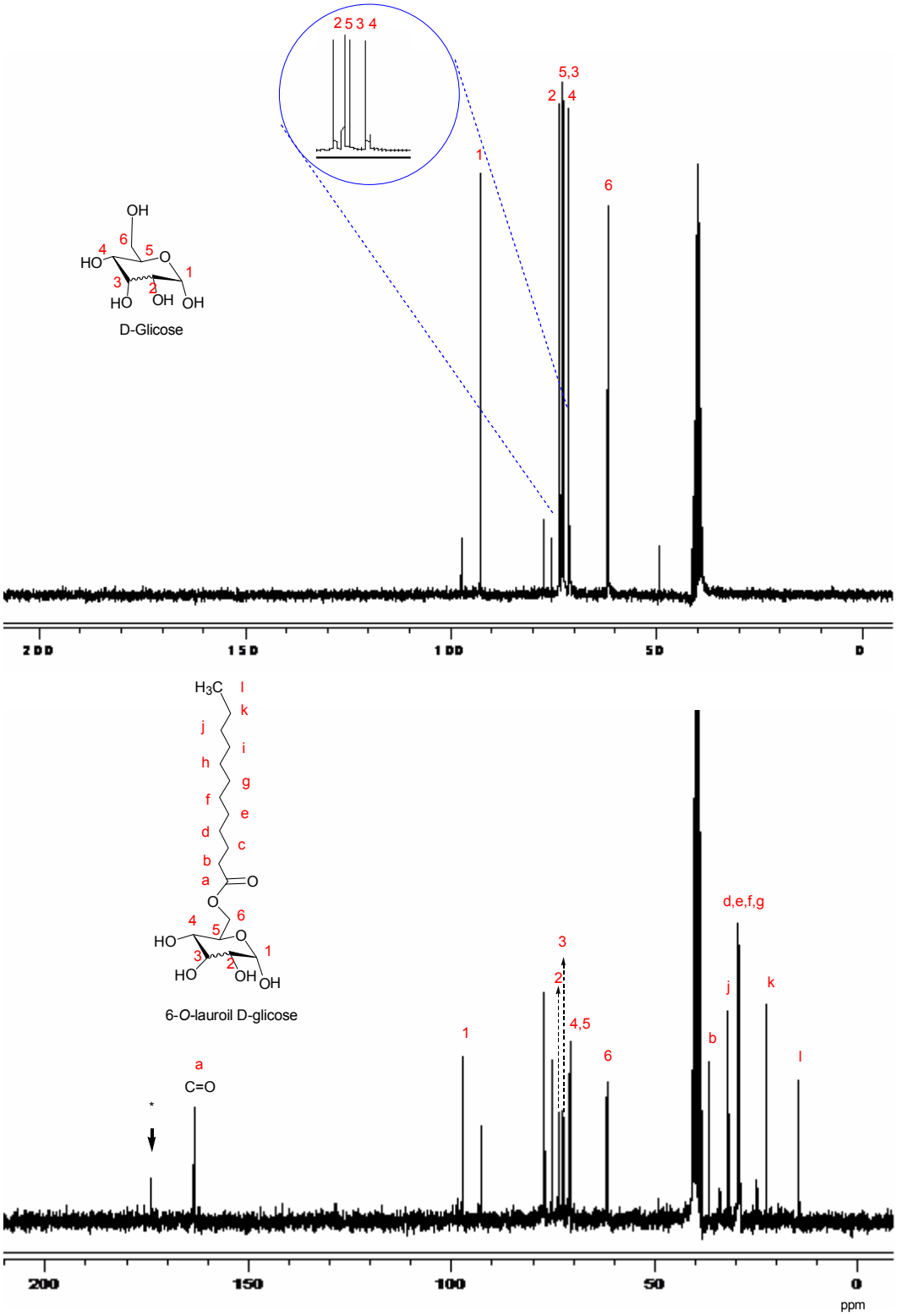


Figura 68: (A) Espectros de ^{13}C-RMN da D-glicose e (B) do laurato de D-glicose.

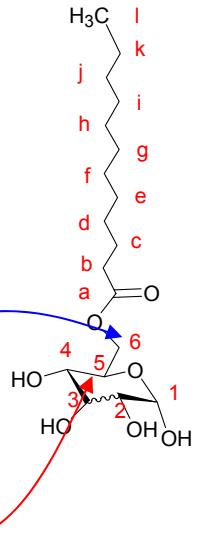
Os resultados mostram um deslocamento químico de campo alto no sinal relativo ao carbono C5 e um deslocamento químico de campo baixo no sinal relativo ao carbono C6. Este último deslocamento não foi significativo e não se pode afirmar, com certeza, que a acilação tenha ocorrido na posição relativa ao C6. No entanto, observando-se os resultados de TLC (Figuras 64 e 66), pode-se notar manchas relativas à formação de produto (laurato de D-glicose). Desta forma, sugere-se a obtenção do mono éster de D-glicose substituído em C6 (YOSHIMOTO, 1980), 6-*O*-lauroil D-glicose, viscoso e de coloração castanho-escuro:^{13}C-NMR (DMSO-*d6*): δ(ppm), 22,58; 24,89; 28,88; 28,89; 29,18; 29,35; 29,46; 31,39; 31,77; 36,48(-CH2-), 92,63(C1), 72,70(C2); 72,27(C3); 70,88(C4); 70,669(C5); 61,61(C6); 163,28(C=O), 14,38(CH_3).

A Tabela 14 apresenta os deslocamentos químicos entre a D-glicose e o laurato deD-glicose e a posição de acilação (C6).

Tabela 14: Deslocamentos químicos entre a D-glicose e o laurato de D-glicose e a posição de acilação (C6).

Posição	***D-GLICOSE (ppm)***	***VLG (ppm)*****	*δ (ppm)*
C1	92,83	92,63	+0,21
C2	73,72	72,70	+1,02
C3	72,55	72,27	+0,28
C4	71,18	70,878	+0,30
C5	72,96	70,67	+2,230 (alto)
C6	61,34	61,61	-0,27 (baixo)
-CH_2-(k)		22,58	
-CH_2-(c)		24,89	
-CH_2-(i)		28,88	
-CH_2-(g)		28,89	
-CH_2-(f)		29,18	
-CH_2-(e)		29,35	
-CH_2-(d)		29,46	
-CH_2-(h)		31,39	
-CH_2-(j)		31,77	
-CH_2-(b)		36,48	
-CH_3(l)		14,38	
-C=O(a)		163,28	
-C=O		173,71*	

* possível resíduo relativo ao laurato de vinila



6.2.4.3 Laurato de sacarose

A Figura 69 apresenta os espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e do laurato de sacarose.

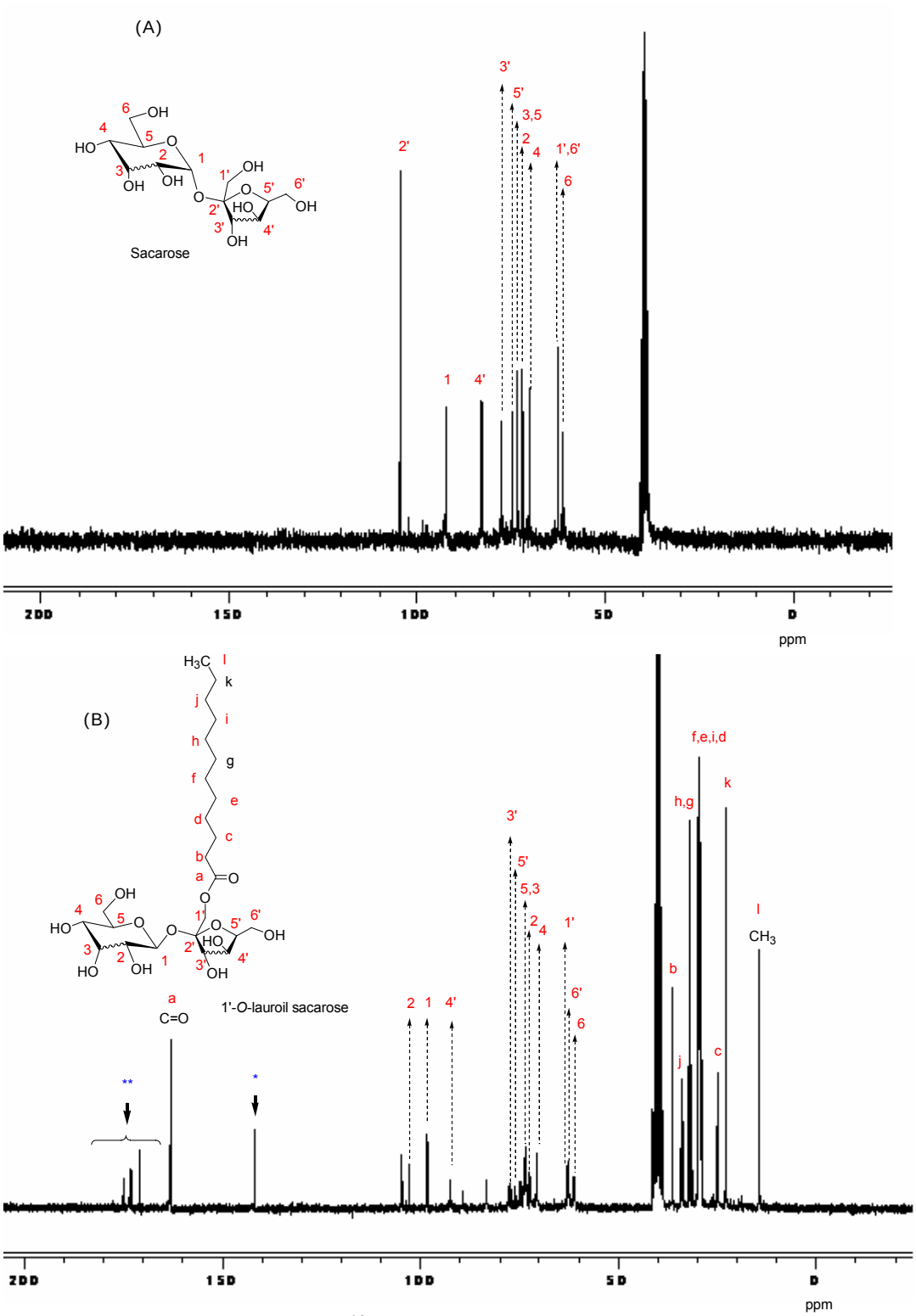


Figura 69: (A) Espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e (B) do laurato de sacarose (B), obtido na 2ª etapa

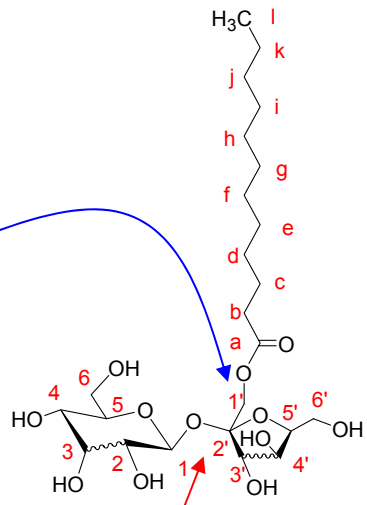
Os resultados mostram um deslocamento químico de sinal relativo ao carbono C2' para campo alto e uma mudança menos significativa no deslocamento químico do sinal relativo ao carbono C1' para campo baixo. Estes resultados sugerem a síntese do mono éster de sacarose substituído em C1' (YOSHIMOTO, 1980), 1'-*O*-lauroil sacarose, viscoso e de coloração castanho-escuro: ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*): δ(ppm): 22,76; 24,68; 29,32; 29,40; 29,52; 29,691; 31,39; 31,97; 33,66; 36,45(-CH2-); 92,39(C1); 72,22(C2); 73,46(C3); 70,43(C4); 73,80(C5); 61,07(C6); 62,71(C1'); 102,79(C2'); 77,69(C3'); 75,86(C4'); 83,21(C5'); 61,70(C6'); 163,08(C=O); 14,49(CH_3).

A Tabela 15 apresenta os deslocamentos químicos entre a sacarose e o laurato de sacarose e a posição de acilação (C1').

Marcado na cor verde estão as carbonilas e uma ligação dupla C=C que podem estar relacionadas com o laurato de vinila residual e/ou formação e di-éster de sacarose.

Tabela 15: Deslocamentos químicos para a sacarose e o laurato de sacarose e a posição de acilação (C1'), obtidos na 2ª etapa.

Posição	*Sacarose (ppm)*	*LS(ppm)*	*δ(ppm)*
C1	92,34	92,38	-0,05
C2	72,14	72,22	-0,08
C3	73,32	73,46	-0,14
C4	70,35	70,43	-0,07
C5	73,45	73,80	-0,35
C6	61,06	61,07	-0,01
C1'	61,75	62,71	-0,96 (baixo)
C2'	104,50	102,79	+1,71 (alto)
C3'	77,59	77,69	-0,10
C4'	74,82	75,86	-1,04
C5'	82,93	83,21	-0,28
C6'	62,67	61,70	+0,97
-CH_3 (l)		14,49	
-CH_2-(k)		22,76	
-CH_2-(c)		24,68	
-CH_2-(d)		29,32	
-CH_2-(e)		29,40	
-CH_2-(i)		29,52	
-CH_2-(f)		29,69	
-CH_2-(g)		31,39	
-CH_2-(h)		31,97	
-CH_2-(j)		33,66	
-CH_2-(b)		36,45	
-C=C-		141,74*	
-C=O (a)		163,08	
-C=O		170,93**	
-C=O		173, 04**	
-C=O		173,54**	
-C=O		175,192**	



* possível resíduo relativo ao laurato de vinila
** possível resíduo relativo ao laurato de vinila e/ou formação de di-éster de sacarose

6.2.5 Síntese dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipolil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose

Com base nos resultados apresentados na Tabela 11, adotaram-se as mesmas condições reacionais para a síntese destes ésteres de açúcar, descritas no item 6.2.2.

A Figura 70 apresenta as análises em TLC das amostras de viniladipoil L-arabinose, de viniladipoil D-glicose e de viniladipoil sacarose, para as condições reacionais citadas anteriormente. As manchas acima das indicações AB, GB e SB representam os açúcares L-arabinose, D-glicose e sacarose, respectivamente, e as manchas acima das indicações A, G e S indicam a formação dos ésteres adipato de L-arabinose, adipato de D-glicose e adipato de sacarose. O procedimento de análise foi descrito no item 5.1.3.

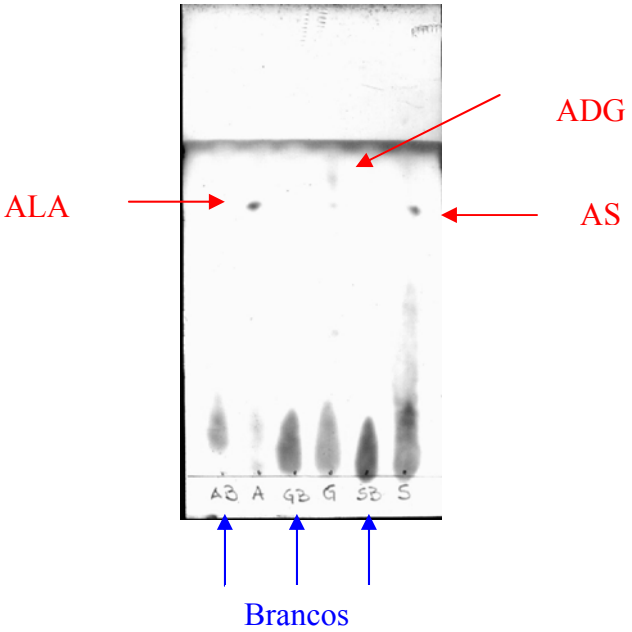


Figura 70: Análises em TLC das amostras brutas dos ésteres adipato de L-arabinose, adipato de D-glicose e adipato de sacarose.

A Figura 70 comprova que a protease de *Bacillus subtilis* foi efetiva na formação dos ésteres de açúcar. Apesar da diferença de polaridade das partes hidrofílicas (cabeças), os produtos apresentaram quase o mesmo deslocamento na placa de sílica gel. A partir destes resultados, passou-se para a fase seguinte da investigação (purificação).

6.2.6 Purificação dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipolil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose

6.2.6.1 Por coluna cromatográfica

Este método foi empregado nas amostras de adipato de L-arabinose e adipato de sacarose. A Figura 70 apresenta a análise por TLC das fases separadas, através da coluna cromatográfica para o adipato de L-arabinose.

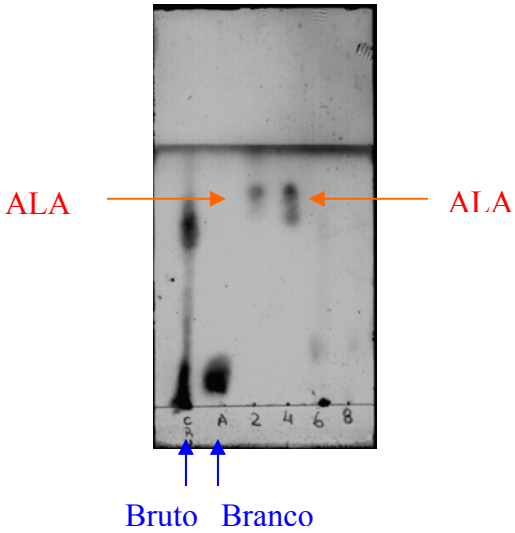


Figura 71: Análise por TLC para o adipato de L-arabinose evidenciando as fases separadas pela coluna cromatográfica.

As duas primeiras manchas, da esquerda para a direita, referem-se ao produto bruto e ao branco (L-arabinose). As duas manchas seguintes referem-se, provavelmente, ao adipato de L-arabinose. As demais manchas foram desprezadas. A massa do produto bruto, introduzido na coluna, foi de 4,7360g e a massa das fases obtidas, após concentração, foi de 0,7274g, representando 15,36% de massa de produto purificado.

A Figura 72 apresenta a análise por TLC das fases separadas na coluna cromatográfica para o adipato de sacarose.

A mancha mais à esquerda é relativa à sacarose (Branco). As duas manchas seguintes e de maior intensidade referem-se ao mesmo produto e, provavelmente, representa o adipato de sacarose. A massa do produto bruto,

introduzido na coluna, foi de 4,9682g e a massa total das duas fases, foi de 1,1881g, representando 23,91% de produto purificado.

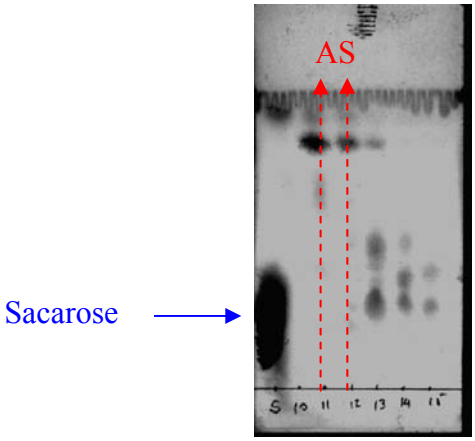


Figura 72: Análise por TLC para o adipato de sacarose evidenciando as fases separadas pela coluna cromatográfica.

6.2.6.2 Por extração em acetona a quente (50°C)

A Figura 73 apresenta a análise por TLC para o adipato de D-glicose, após purificação por extração em acetona a quente (50°C).

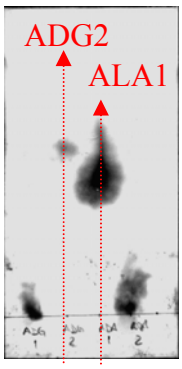


Figura 73: Análise por TLC para o adipato de D-glicose, após purificação por extração em acetona a quente (50°C).

A segunda mancha, da esquerda para a direita, indicada como ADG2, representa, provavelmente, o adipato de D-glicose. A massa do produto bruto, lavado em acetona, foi de 6,1290g e a massa do produto, purificado de acordo com o fluxograma da Figura 30, foi de 3,5759g, representando 58,34% de produto purificado. A terceira mancha é relativa ao adipato de L-arabinose, que

apesar de não ter sido seu rendimento quantificado, mostra que não houve a formação de manchas relativas a substratos residuais ou subprodutos.

A Tabela 16 apresenta as massas do adipato de L-arabinose (ALA), adipato de D-glicose (ADG) e adipato de sacarose (AS) purificados, bem como as massas dos respectivos produtos brutos e os rendimentos na purificação.

Tabela 16: Resumo dos resultados obtidos na purificação do adipato de L-arabinose (ALA), adipato de D-glicose (ADG) e adipato de sacarose (AS)

PRODUTOS	Massa (bruto) g	Massa (puro) g	η %*
ALA [1]	4,7360	0,7274	15,36
ADG [2]	6,1290	3,5759	58,34
AS [1]	4,9682	1,1881	23,91

* Percentual em relação ao produto bruto
1- purificado em coluna cromatográfica
2- purificado com lavagem em acetona

6.2.7 Identificação da estrutura química e da posição de acilação por ^{13}C-RMN

6.2.7.1 Adipato de L-arabinose

A Figura 74 apresenta os espectros de ^{13}C-RMN da L-arabinose e do adipato de L-arabinose. De modo análogo ao laurato de L-arabinose, não fica claro se a esterificação ocorreu somente na conformação furanose, que possui hidroxila ligada a carbono primário. Mesmo assim, foram observadas, para esta conformação, mudanças significativas nos deslocamentos químicos dos sinais relativos aos carbonos C4α e C4β para campo alto e mudanças nos sinais relativos aos carbonos C5α e C5β para campo baixo. Outras evidências para a síntese do éster de açúcar vinílico são: a presença de sinais relativos a C=C, C=O e CH_2, como indicado na Tabela 17 que, também, apresenta os deslocamentos químicos para a L-arabinose e o adipato de L-arabinose, assim como as evidências da provável acilação na posição C5.

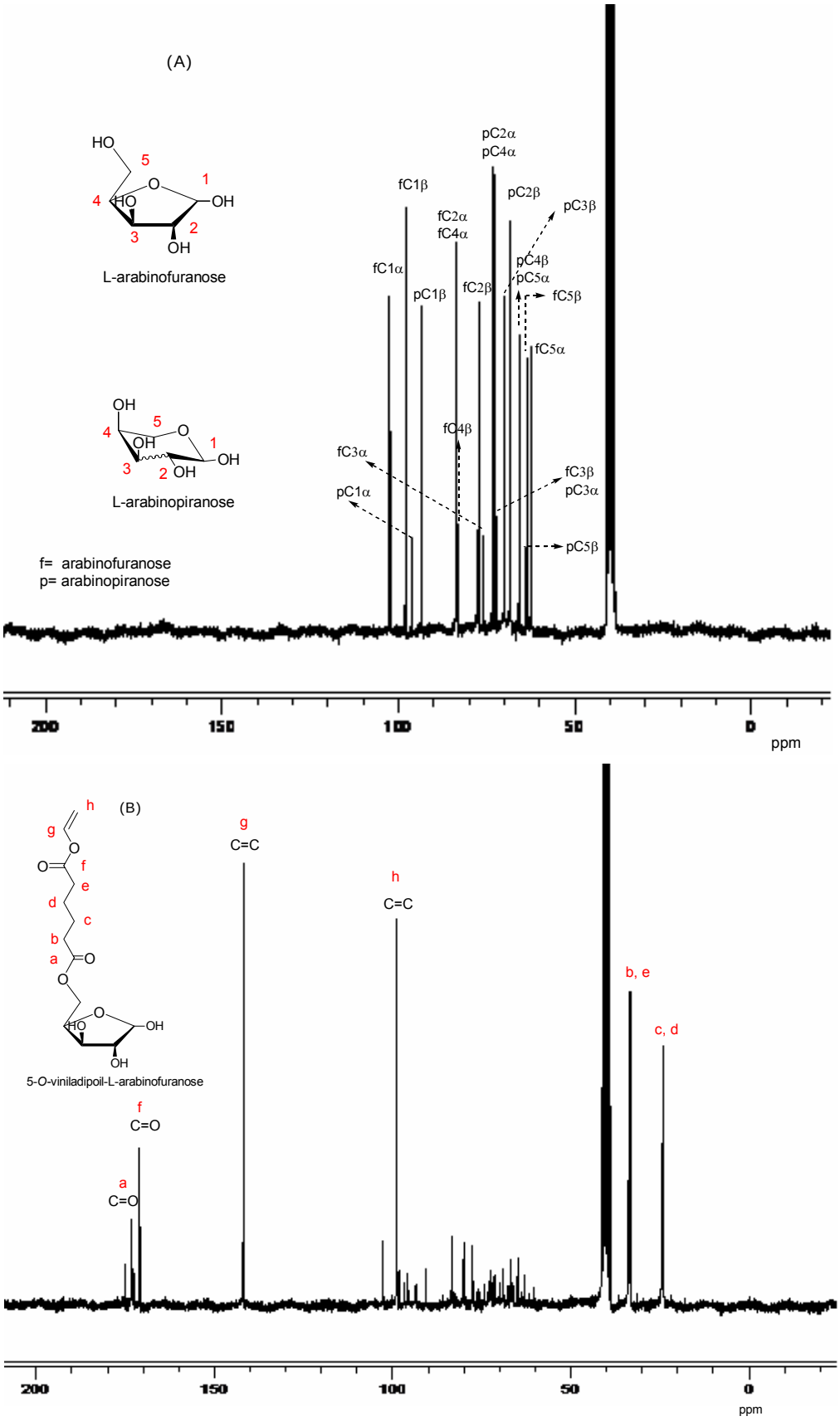
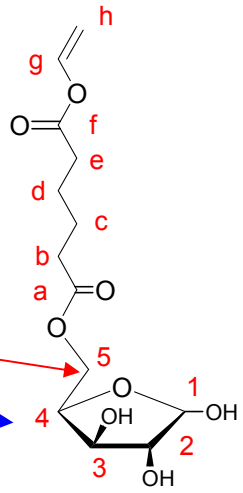


Figura 74: (A) Espectros de ^{13}C-RMN da L-arabinose e (B) do adipato de L-arabinose.

Tabela 17: Deslocamentos químicos para a L-arabinose e o adipato de L-arabinose e a posição de acilação (C5).

L-ISÔMERO	*Posição*	*L-ARABINOSE (ppm)*	*ALA (ppm)*	*δ (ppm)*
FURANOSE	C1 α	102,03	102,13	-0,10
	C1 β	97,57	97,65	-0,08
	C2 α	83,12	82,69	+0,43
	C2 β	77,38	77,21	+0,17
	C3 α	76,88	76,84	+0,04
	C3 β	72,97	72,42	+0,55
	C4 α	83,05	79,50	+3,55
	C4 β	82,90	79,15	+3,75
	C5 α	61,83	64,37	-2,54
	C5 β	62,84	65,68	-2,84
PIRANOSE	C1 α	95,90		
	C1 β	92,97		
	C2 α	75,37		
	C2 β	69,47		
	C3 α	72,05		
	C3 β	69,64		
	C4 α	75,37		
	C4 β	68,00		
	C5 α	67,84		
	C5 β	65,38		
-CH_2-(d)			23,85	
-CH_2-(c)			23,54	
-CH_2-(e)			33,38	
-CH_2-(b)			32,80	
=CH_2 (h)			98,25	
-CH= (g)			141,34	
-C=O (f)			170,48	
-C=O (a)			172,81	



Estas mudanças de deslocamentos químicos sugerem a síntese do éster vinílico de L-arabinose substituído em C5 (YOSHIMOTO, 1980), viscoso e de coloração amarelo-claro: 5-*O*-viniladipoil L-arabinose: ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*): δ(ppm), 23,54; 23,85; 32,80; 33,38 (-CH2-); 102,13 (C1α), 97,65 (C1β); 82,69(C2α), 77,21 (C2β); 76,84 (C3α); 72,42(C3β); 79,50 (C4α), 79,15 (C4β); 64,37 (C5α); 65,68 (C5β); 98,25 (=CH_2); 141,34 (-CH=); 170,48; 172,81 (-C=O).

Seguindo o mesmo raciocínio de análise feita para o éster 5-*O*-lauroil L-arabinose (item 6.2.4.1), também não fica claro se houve acilação somente da conformação arabinofuranose.

6.2.7.2 Adipato de D-glicose

A Figura 75 apresenta os espectros de ^{13}C-RMN da D-glicose e do adipato de D-glicose, com a atribuição dos sinais aos respectivos átomos de carbono presentes na estrutura química dos compostos.

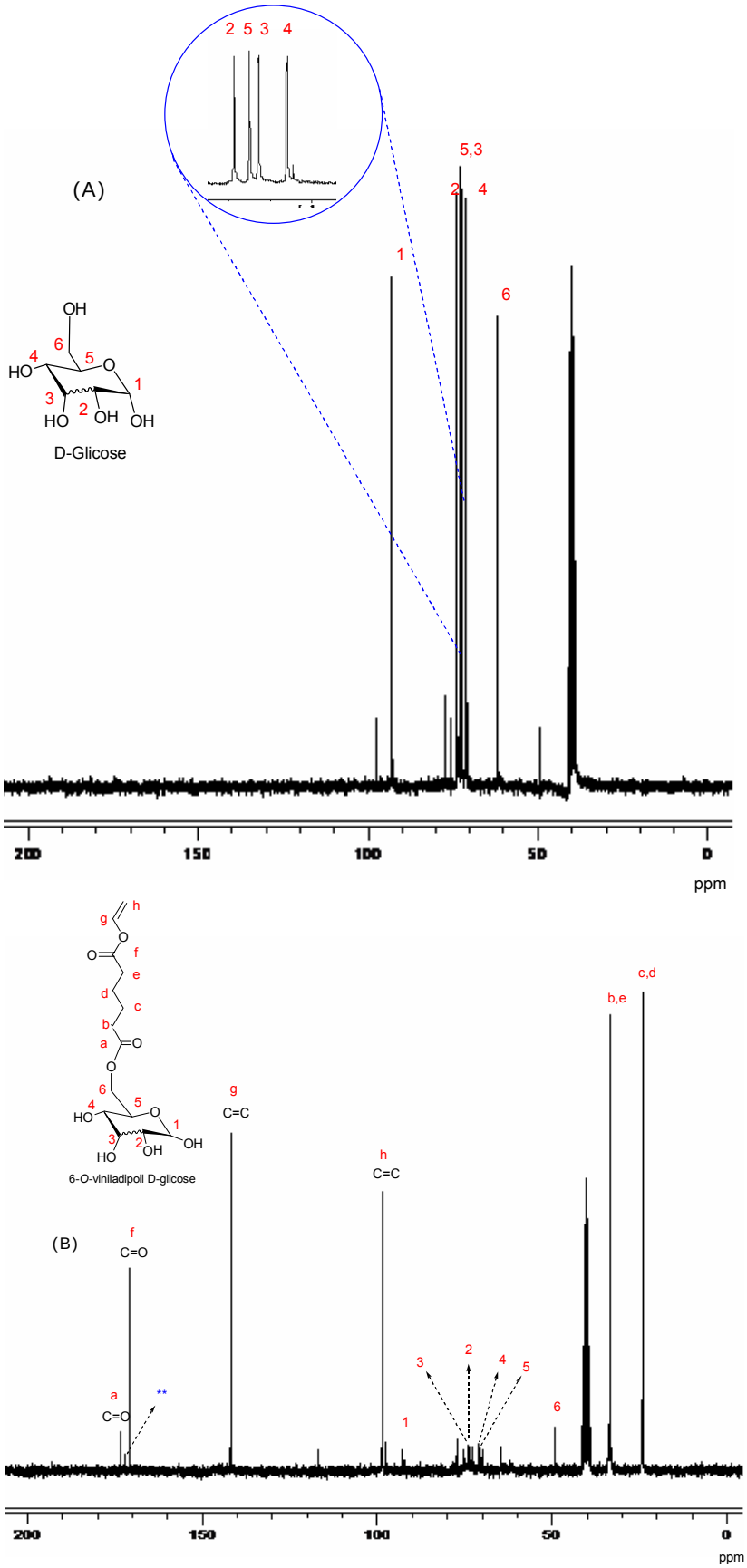
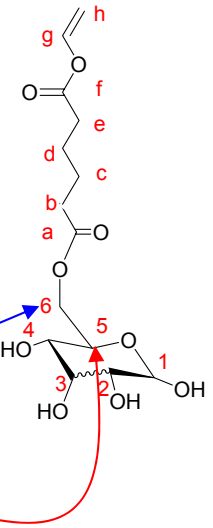


Figura 75: (A) Espectros de ^{13}C-RMN da D-glicose e (B) do adipato de D-glicose.

A Tabela 18 apresenta os deslocamentos químicos entre a D-glicose e o adipato de D-glicose e a posição de acilação (C6).

Tabela 18: Deslocamentos químicos entre a D-glicose e o adipato de D-glicose e a posição de acilação (C6).



Posição	*D-GLICOSE (ppm)*	*ADG (ppm)*	*δ (ppm)*
C1	92,83	92,34	+0,50
C2	73,72	72,94	+0,78
C3	72,55	73,54	+0,99
C4	71,18	70,61	+0,57
C5	72,96	70,21	+2,76
C6	61,34	64,00	-2,16
-CH_2-(c)		23,38	
-CH_2-(d)		23,79	
-CH_2-(b)		32,66	
-CH_2-(e)		33,04	
=CH_2(h)		98,02	
-CH=(g)		141,24	
-C=O(f)		170,25	
-C=O(a)		172,75	
		171,70**	

** Possível resíduo relativo ao adipato de vinila

Os resultados mostram uma mudança no deslocamento químico do sinal relativo ao carbono C5 para campo alto e ao carbono C6 para campo baixo. Estas mudanças sugerem a síntese do éster de D-glicose substituído em C6, 6-*O*-viniladipoil D-glicose (YOSHIMOTO, 1980), viscoso e de coloração castanho-escuro: ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*): δ(ppm), 23,38; 23,79; 32,66; 33,04; (-CH_2-), 92,34 (C1), 72,94 (C2); 73,54 (C3); 70,61 (C4); 70,21 (C5); 64,00 (C6); 98,02; 98,02(=CH_2); 141,24 (-CH=);170,25; 172,75 (C=O).

Sinais referentes a C=C, C=O e CH_2 confirmam a formação do éster de açúcar vinílico.

6.2.7.3 Adipato de sacarose

A Figura 76 apresenta os espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e do adipato de sacarose. Foram observadas mudanças significativas no deslocamento químico do carbono C2' para campo alto e do carbono C1' para campo baixo. Sinais referentes a C=C, C=O e CH_2 também foram observados no espectro do éster de açúcar vinílico formado. Estas características dos espectros sugerem a síntese do éster de sacarose substituído em C1', 1'-*O*-viniladipoil sacarose, viscoso e de coloração castanho-escuro: ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*): δ(ppm): 23,85; 24,13; 33,14; 33,55; (-CH2-); 92,58(C1); 71,74(C2); 73,28 (C3); 70,14 (C4); 73,28 (C5); 60,85 (C6); 64,08 (C1'); 102,58 (C2'); 77,00 (C3'); 82,98 (C4'); 73,75 (C5'); 62,34 (C6'); 98,74(=CH_2); 141,60 (-CH=); 170,93; 172,84(C=O).

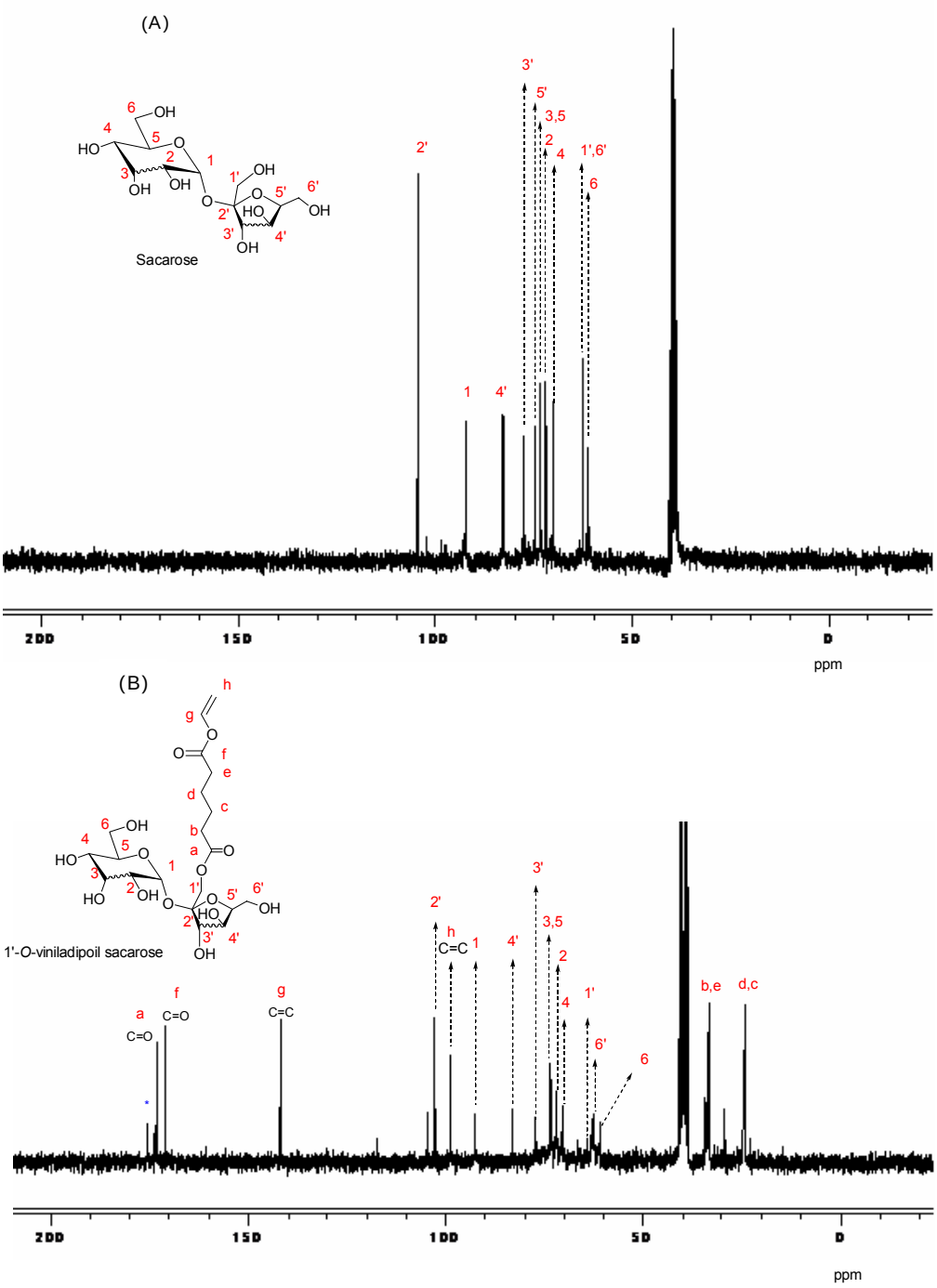
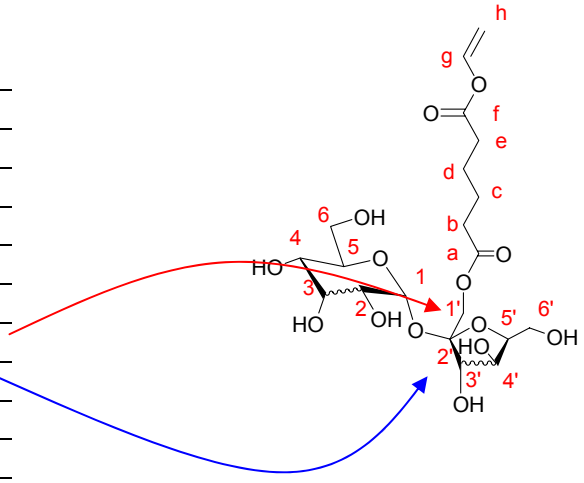


Figura 76: (A) Espectros de ^{13}C-RMN da sacarose e (B) do adipato de sacarose.

A Tabela 19 apresenta os deslocamentos químicos da sacarose e do adipato de sacarose, assim como as evidências de acilação na posição C1'.

Tabela 19: Deslocamentos químicos da sacarose e do adipato de sacarose e evidências da posição de acilação (C1').

Posição	*Sacarose (ppm)*	*AS (ppm)***	*δ (ppm)*
C1	92,34	92,58	-0,24
C2	72,14	71,74	+0,40
C3	73,32	73,28	+0,04
C4	70,35	70,14	+0,22
C5	73,45	73,28	+0,17
C6	61,06	60,85	+0,21
C1'	62,67	64,08	-1,41
C2'	104,50	102,58	+1,92
C3'	77,59	77,00	+0,58
C4'	82,93	82,98	-0,05
C5'	74,82	73,75	+1,07
C6'	61,75	62,34	-0,59
-CH_2-(c)		23,85	
-CH_2-(d)		24,13	
-CH_2-(b)		33,14	
-CH_2-(e)		33,55	
=CH_2(h)		98,74	
-CH=(g)		141,60	
-C=O(f)		170,93	
-C=O(a)		172,84	
		173,39*	
		175,43*	



* possível resíduo relativo ao adipato de vinila e/ou formação de di-éster de sacarose

6.2.8 Determinação dos valores de HLB dos ésteres de L-arabinose, D-glicose e sacarose

A Figura 77 apresenta a estrutura química e os valores de HLB para o laurato de L-arabinose, laurato de D-glicose, laurato de sacarose, adipato de L-arabinose, adipato de D-glicose e adipato de sacarose, determinados de acordo com a Equação de Griffin (Equação 2). A Tabela 20 resume os resultados obtidos.

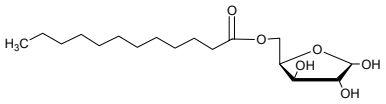
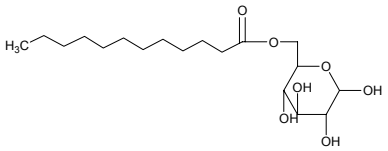
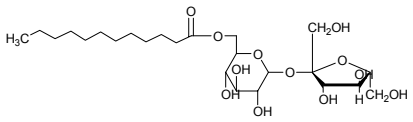
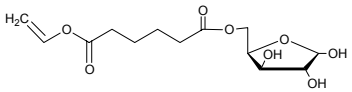
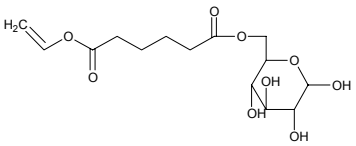
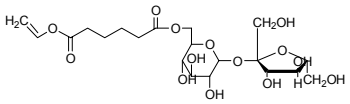
	Parte hidrofílica	Massa molar total	Valor de HLB
5-*O*-lauroil L-arabinose 	$C_5H_9O_5^{\bullet}$ Massa Mol.: 149,12 C. 40,27; H. 6,08; O. 53,65	$C_{17}H_{32}O_6$ massa Mol.: 332,43 C. 61,42; H. 9,70; O. 28,88	HLB = 20*(149,12/332,43) HLB = 8,97
6-*O*-lauroil D-glicose 	$C_6H_{11}O_6^{\bullet}$ Massa Mol. Wt.: 179,15 C. 40,23; H. 6,19; O. 53,58	$C_{18}H_{34}O_7$ Massa Mol.: 362,46 C. 59,65; H. 9,45; O. 30,90	HLB = 20*(179,15/362,46) HLB = 9,88
1'-*O*-lauroil sacarose 	$C_{12}H_{21}O_{11}^{\bullet}$ Massa Mol. Wt.: 341,29 C. 42,23; H. 6,20; O. 51,57	$C_{24}H_{44}O_{12}$ Massa Mol.: 524,60 C. 54,95; H. 8,45; O. 36,60	HLB = 20*(341,29/524,28) HLB = 13,02
5-*O*-viniladipoil L-arabinose 	$C_5H_9O_5^{\bullet}$ Massa Mol.: 149,12 C. 40,27; H. 6,08; O. 53,65	$C_{13}H_{20}O_8$ Massa mol.: 304,29 C. 51,31; H. 6,62; O. 42,06	HLB = 20*(149,12/304,29) HLB = 9,80
6-*O*-viniladipoil D-glicose 	$C_6H_{11}O_6^{\bullet}$ Massa Mol.: 179,15 C. 40,23; H. 6,19; O. 53,58	$C_{14}H_{22}O_9$ Massa Mol.: 334,32 C. 50,30; H. 6,63; O. 43,07	HLB = 20*(179,15/334,32) HLB = 10,72
1'-*O*-viniladipoil sacarose 	$C_{12}H_{21}O_{11}^{\bullet}$ Massa Mol.: 341,29 C. 42,23; H. 6,20; O. 51,57	$C_{20}H_{32}O_{14}$ Massa Mol. Wt.: 496,46 C. 48,39; H. 6,50; O. 45,12	HLB = 20*(341,29/496,46) HLB = 13,75

Figura 77: Fórmula estrutural e valores de HLB dos derivados dos ácidos láurico e adípico.

Tabela 20: Valores de HLB dos ésteres laurato de L-arabinose, laurato de D-glicose, laurato de sacarose, adipato de L-arabinose, adipato de D-glicose e adipato de sacarose.

SURFACTANTE	MM HIDROFÍLICA	MM TOTAL	HLB
Laurato de L-arabinose	149,12	332,43	8,97
Laurato de D-glicose	179,15	362,46	9,88
Laurato de sacarose	341,29	524,60	13,02
Adipato de L-arabinose	149,12	304,29	9,80
Adipato de D-glicose	179,15	334,32	10,71
Adipato de sacarose	341,29	496,46	13,75

MM = Massa Molar

Em função dos valores de HLB obtidos, os ésteres sintetizados podem apresentar propriedades diferenciadas. A Tabela 1 (item 2.3) apresenta as faixas típicas de valores de HLB e suas aplicações mais indicadas. De acordo com a literatura (ROSS, 1988), moléculas anfifílicas com valores de HLB no intervalo 7-9, apresentam boas chances de emprego como agentes de molhabilidade e no intervalo 8-18, atuam bem como agentes emulsificantes óleo/água (O/A). Examinando a Tabela 20 e enquadrando os ésteres de açúcar obtidos nestas duas faixas de referência, percebemos que todos estes ésteres apresentam valores de HLB, que se encaixam na faixa relativa aos emulsificantes O/A. Uma aplicação potencial destes produtos seria na substituição de solventes para a remoção de resíduos de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem, reservatórios de óleo e navios petroleiros (BANAT, 1991), como descrito no item 2.1.1.15. Lauroil glicose foi usada com sucesso para emulsificar diferentes hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, como diclorometano, 1,2-diclobenzeno, 1-bromohexadecano, 1,2-dicloroetano, benzeno, tolueno, xileno e outros. Seu emprego, também, aumentou em 50% a degradação de óleo pesado, quando foi usado como emulsificante em combinação com uma espécie tropical marinha *Rhodococcus* sp. (KELKAR, 2006).

6.2.9 Polimerização dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose

Os polímeros obtidos por catálise química dos ésteres de açúcar vinílicos sintetizados nesta tese apresentaram-se semi-sólidos e com coloração amarelada, como ilustra a Figura 78. Essas características foram gerais e independentes do monômero utilizado.

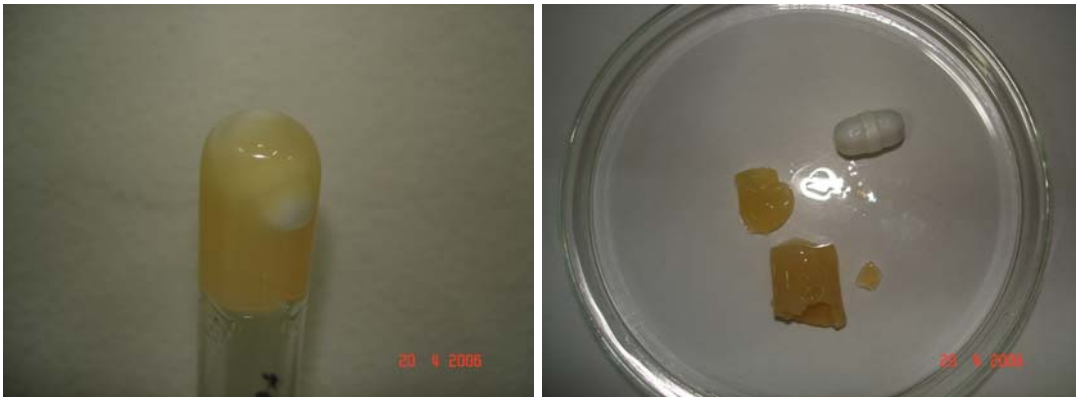


Figura 78: Características visuais do poli (5-*O*-viniladipoil L-arabinose) ao final da reação de polimerização.

A Tabela 21 apresenta parte das condições reacionais de polimerização descritas no item 5.2.9 e a massa percentual de polímero formado em relação ao monômero de partida.

Tabela 21: Condições reacionais e valores da conversão em % dos monômeros 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose nos respectivos polímeros.

MONÔMERO (g)		POLÍMERO (g)		$K_2S_2O_8$ (mg)	H_2O_2 (µL)	H_2O (mL)	η (%)
ALA[a]	0,4995	PoliALA[d]	0,3405	5,0	5,0	2,5	68,17
ADG[b]	0,5022	PoliADG[e]	0,3975	5,3	5,0	2,5	79,52
AS[c]	0,4009	PoliAS[f]	0,0668	4,0	4,0	2,0	16,70

η: conversão
a: 5-*O*-viniladipoil L-arabinose
b: 6-*O*-viniladipoil D-glicose
c: 1'-*O*-viniladipoil sacarose
d: Poli (5-*O*-viniladipoil L-arabinose)
e: Poli (6-*O*-viniladipoil D-glicose)
f: Poli (1'-*O*-viniladipoil sacarose)

6.2.9.1 Caracterização dos polímeros por FTIR

As Figuras 79, 80 e 81 apresentam os espectros de absorção na região do infravermelho do monômero 5-*O*-viniladipoil L-arabinose e do polímero poli(5-*O*-viniladipoil L-arabinose), do monômero 6-*O*-viniladipoil D-glicose e do polímero poli(6-*O*-viniladipoil D-glicose) e do monômero 1'-*O*-viniladipoil sacarose e do polímero poli(1'-*O*-viniladipoil sacarose), respectivamente. A região de interesse para acompanhamento da polimerização encontra-se na faixa de freqüência de 1640-1680 cm^{-1} ($B\upsilon_{C=C}$).

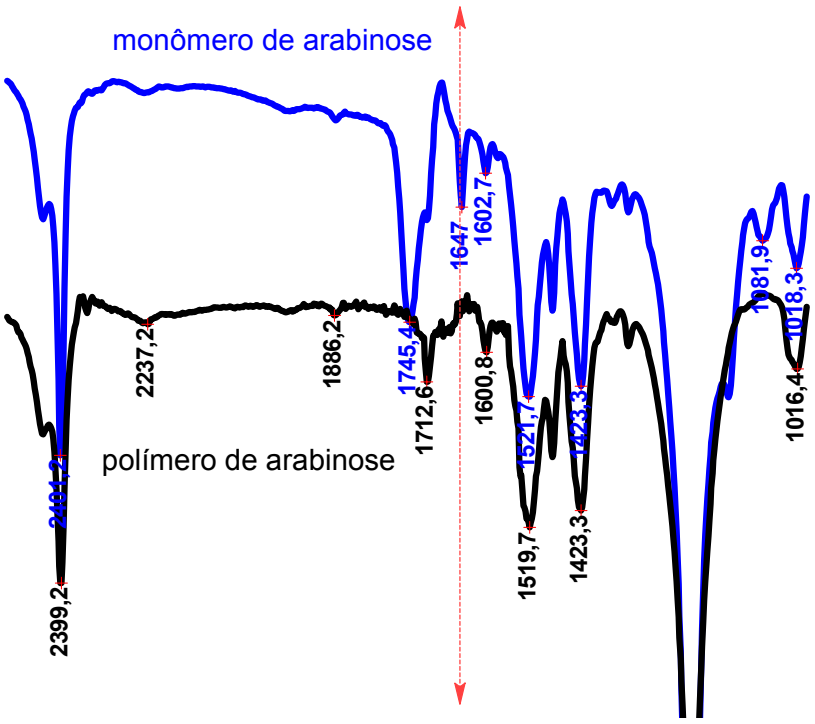


Figura 79: Espectros, na região do infravermelho, do monômero 5-*O*-viniladipoil L-arabinose e do polímero poli(5-*O*-viniladipoil L-arabinose).

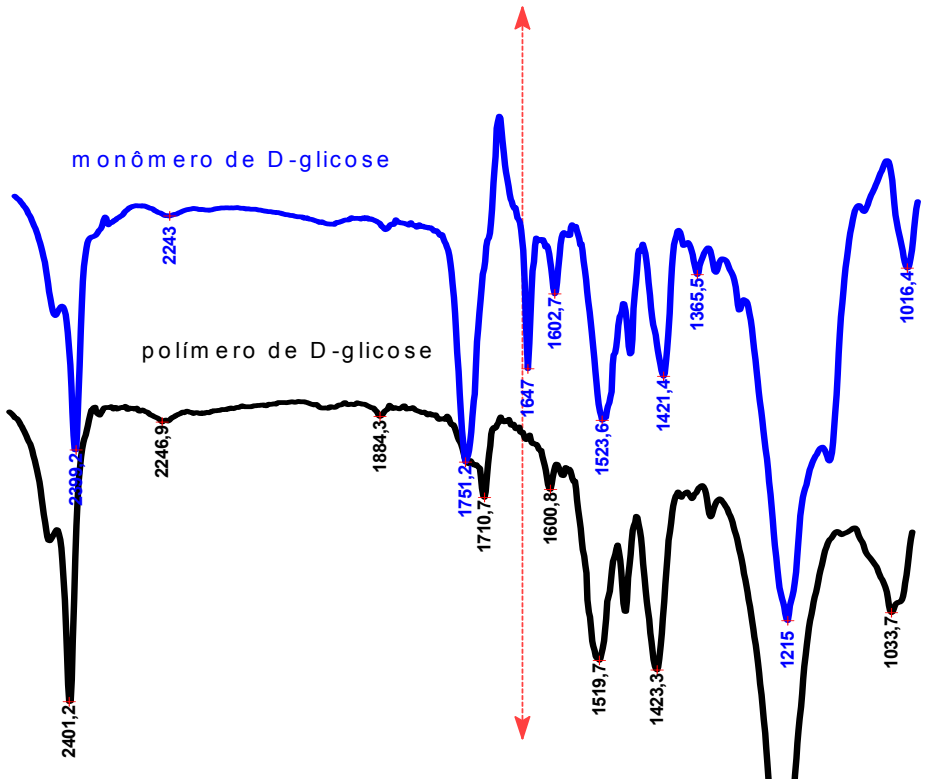


Figura 80: Espectros, na região do infravermelho, do monômero 6-*O*-viniladipoil D-glicose e do polímero poli(6-*O*-viniladipoil D-glicose).

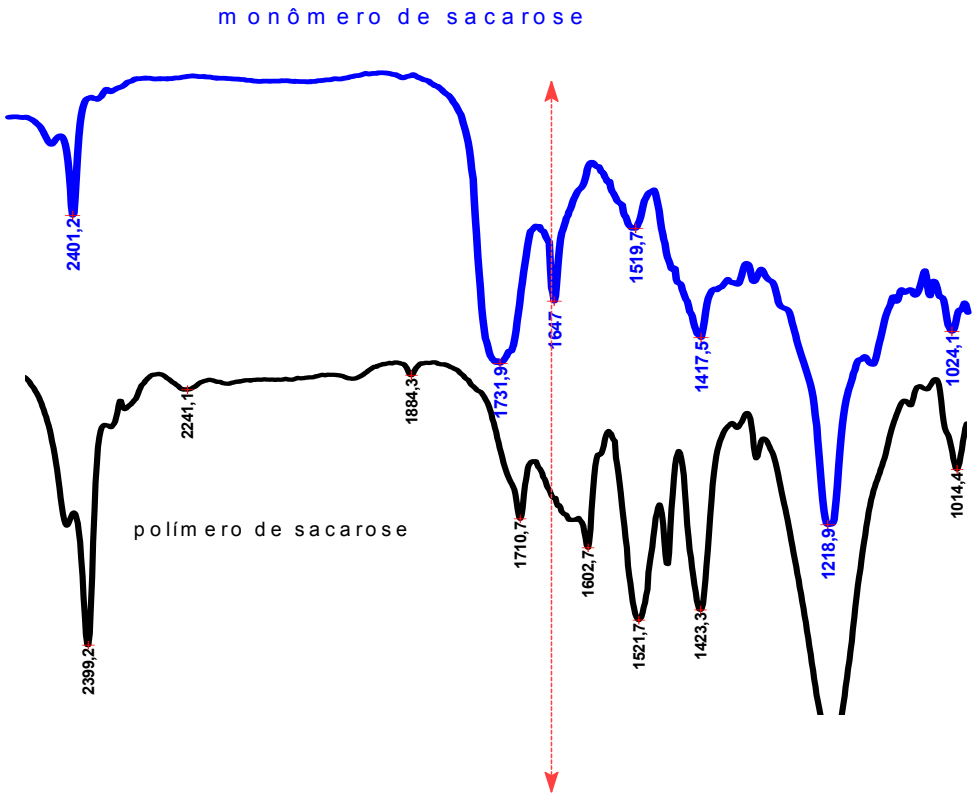


Figura 81: Espectros, na região do infravermelho, do monômero 1'-*O*-viniladipoil sacarose e do polímero poli(1'-*O*-viniladipoil sacarose).

Observando os espectros dos monômeros, essas bandas ocorreram em 1647cm^{-1} (Bυ$_{C=C}$), na Figura 79; 1647cm^{-1} (Bυ$_{C=C}$), na Figura 80; 1647cm^{-1} (Bυ$_{C=C}$), na Figura 81. Para que haja polimerização efetiva, a banda relativa à ligação dupla (C=C), necessariamente, presente no espectro de cada monômero, deve desaparecer no espectro do respectivo polímero. Nas Figuras 79, 80 e 81, pode-se notar, no local indicado pela seta, que não existe a banda de freqüência relativa à ligação C=C no espectro do polímero. Este resultado espectrométrico confirma que houve polimerização radicalar nos três monômeros. Também foi observado que a banda de absorção característica do grupo éster nos espectros de todos os polímeros, apresentou-se sob a forma de um "ombro". Além disso, foi detectada uma absorção, ligada a este ombro, em torno de 1711 cm^{-1}, provavelmente devido a acetona residual utilizada na lavagem de todos os polímeros.

6.2.9.2 Determinação das massas molares dos polímeros por GPC

A Figura 82 apresenta a curva de calibração dos padrões de dextrana, processada pelo sistema GALAXIE GPC (Varian Inc, USA).

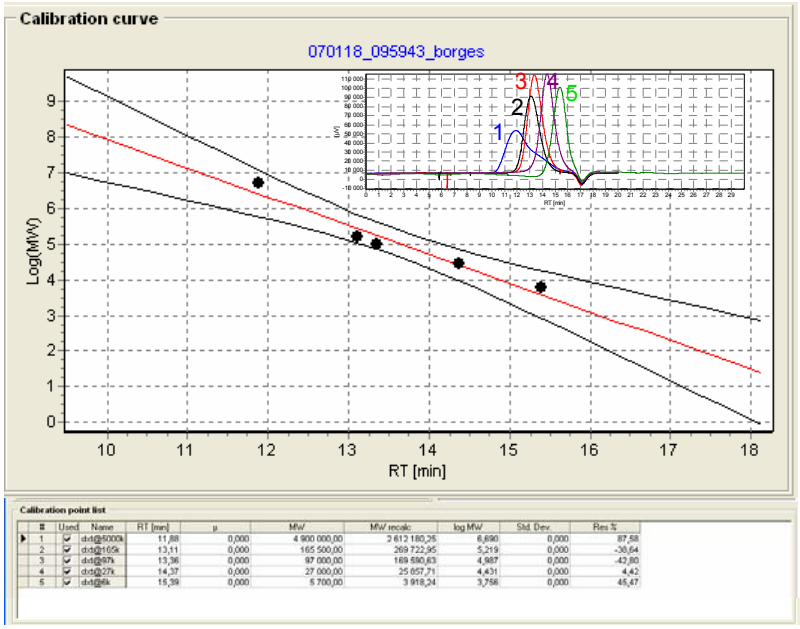


Figura 82: Curva de calibração dos padrões de dextrana, processada pelo sistema GALAXIE GPC (Varian Inc, USA).

As Figuras 83, 84 e 85 apresentam os cromatogramas relativos aos polímeros poli(5-*O*-viniladipoil L-arabinose), poli(6-*O*-viniladipoil D-glicose) e poli(1'-*O*-viniladipoil sacarose). As massas molares foram geradas automaticamente pelo sistema.

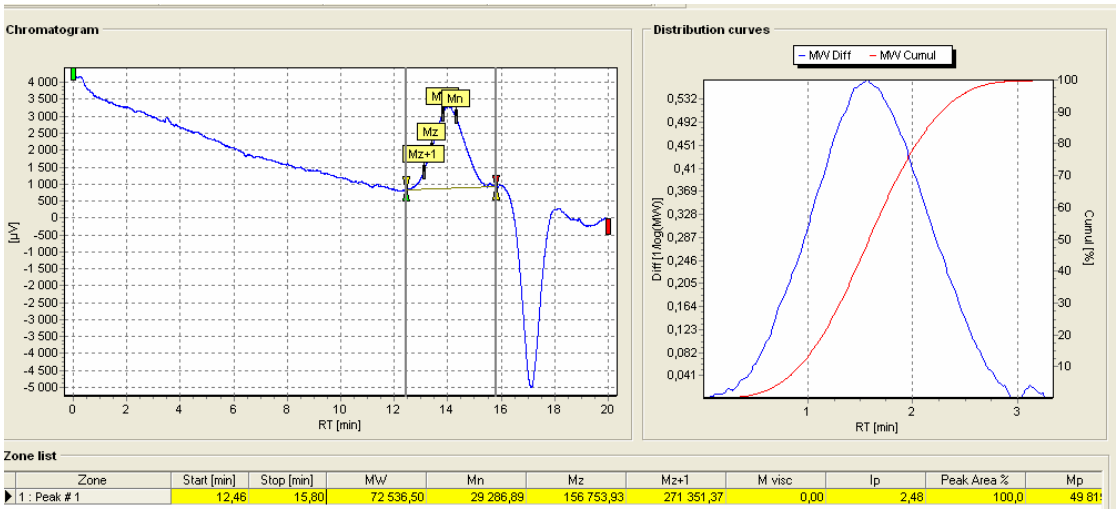


Figura 83: Cromatograma relativo ao poli (5-*O*-viniladipoil L-arabinose) e os valores das massas molares e polidispersão (IP).

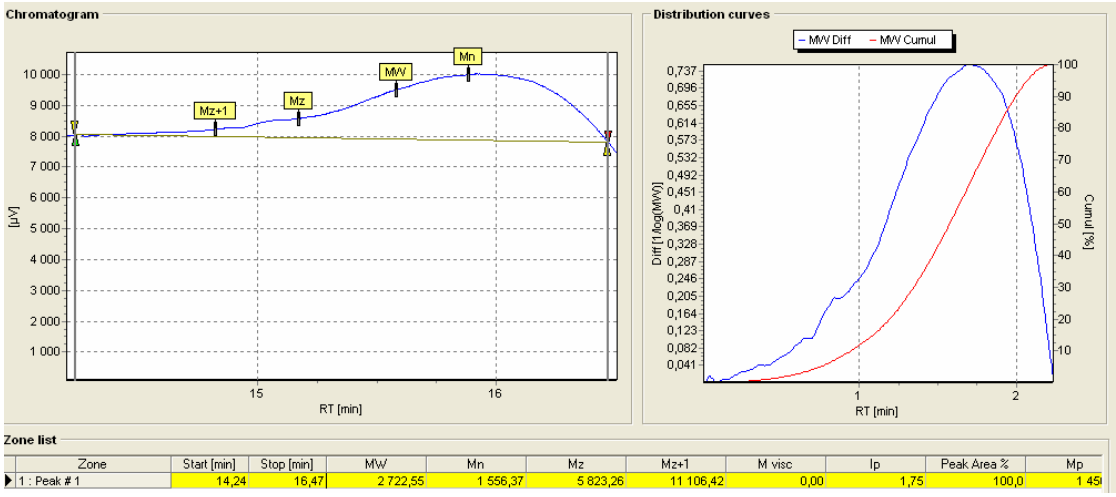


Figura 84: Cromatograma relativo ao poli (6-*O*-viniladipoil D-glicose) e os valores das massas molares e polidispersão (IP).

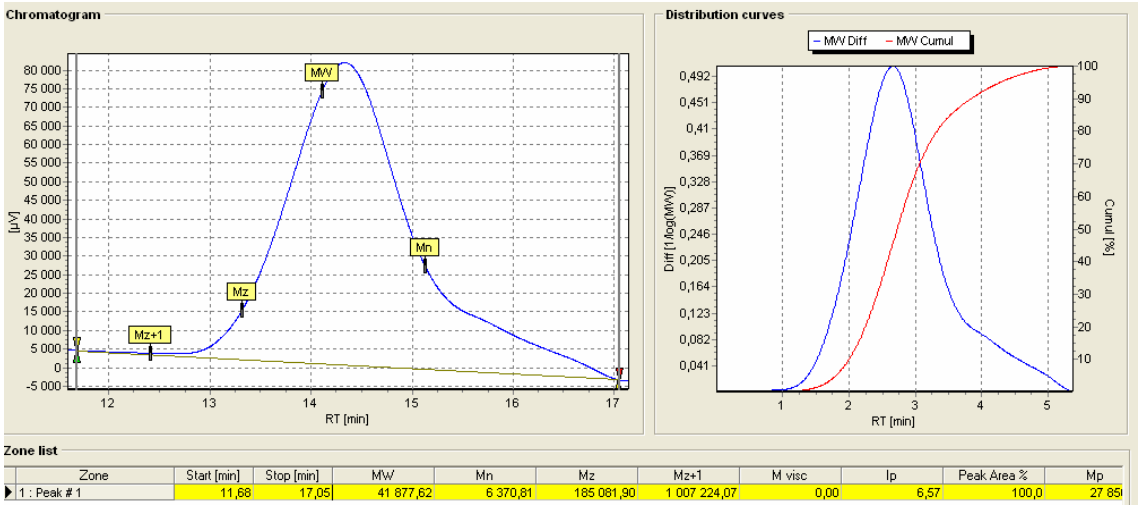


Figura 85: Cromatograma relativo ao poli (1'-*O*-viniladipoil sacarose) e os valores das massas molares e polidispersão (IP).

A Tabela 22 resume os resultados de M_n, M_w e PD apresentados nas Figuras 83, 84 e 85.

Tabela 22: M_n, M_w e PD dos polímeros poli (5-*O*-viniladipoil L-arabinose), poli (6-*O*-viniladipoil D-glicose) e poli (1'-*O*-viniladipoil sacarose).

POLÍMERO	M_w	M_n	PD = M_w/M_n
PoliALA	$7,2 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$	2,48
PoliADG	$2,7 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	1,75
PoliAS	$4,2 \times 10^4$	$6,4 \times 10^3$	6,57

A polimerização de compostos vinílicos pode ser feita via radicais livres por iniciadores do tipo azo em solvente orgânico, ou por iniciadores do tipo redox em água (TOKIWA, 1998; LU, 2002). Chen et al.(1995) obtiveram polímeros de massa molar numérica média da ordem de 10^6, utilizando iniciadores redox na polimerização de acrilato de sacarose em soluções aquosas, onde foram empregados Fe^{+2}, sulfato de amônio e peróxido de hidrogênio como sistema iniciador.

Tokiwa et al. (1997) investigaram o efeito de sete compostos azo como iniciadores na polimerização de 6-*O*-viniladipoil D-glicose. Somente o ADPCL –

azobis (ácido butírico) dimetil éster era solúvel em água, sendo os demais solúveis em DMF. Os resultados mostraram que a polimerização com ADPCL em água foi muito mais eficiente que as demais. A conversão de monômeros em polímeros foi de 94,5% e o valor de M_w foi de 302.700. Nos demais casos, a conversão variou de zero a 89,6% e a os valores de M_w variaram de 8.800 a 11.200.

Lu et al. (2002) polimerizaram o éster 1'-*O*-viniladipoil sacarose, por radicais livres, empregando persulfato de potássio e peróxido de hidrogênio, em água. O polímero obtido apresentou valores de M_n= 33.000, M_w= 53.200 e M_w/M_n= 1,61. A conversão da polimerização, em relação à massa de monômero, foi de 62% (Figura 20).

Tokiwa et al. (2006) polimerizaram o éster 6-*O*-viniladipoil D-glicose, usando sulfato ferroso e peróxido de hidrogênio como iniciadores, em água, sob duas condições distintas: (1) em vácuo; (2) em ar atmosférico. No primeiro caso, obtiveram M_n igual a 31.300 e M_w igual 66.400 e no segundo caso, M_n igual a 21.900 e M_w igual a 38.500.

No presente estudo, a polimerização, empregando persulfato de potássio e peróxido de hidrogênio como iniciadores, em água, apresentou bons resultados de uma maneira geral, como se pode notar na Tabela 22. O maior valor da massa do polímero poli (5-*O*-viniladipoil L-arabinose), pode estar relacionado ao fato do seu açúcar pendente apresentar menor tamanho molecular em relação à D-glicose e à sacarose, permitindo um melhor empacotamento das cadeias carbônicas, devido ao menor impedimento estérico.

O emprego de água como solvente, no processo de polimerização, tem se mostrado mais eficaz do que com solventes orgânicos. Além do mais, esta condição catalítica tem despertado grande interesse, por se constituir em procedimento menos agressivo ao meio ambiente.

6.2.10 Determinação da CMC dos ésteres surfactantes

No estudo das propriedades tensoativas dos ésteres anfifílicos não-iônicos sintetizados neste trabalho, o sistema selecionado foi a interface ar/água. Todos os compostos analisados apresentaram solubilidade em água. Para o presente estudo, os seis produtos avaliados foram divididos em duas categorias: (a) compostos com cadeia saturada; (b) compostos com cadeia insaturada. Dentro de cada categoria, eles diferiram entre si pela composição de suas "cabeças", enquanto que suas estruturas alquílicas ("caudas") foram idênticas.

6.2.10.1 Ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose

A Figura 86 apresenta as curvas de tensão superficial *versus* concentração, em escala logarítmica para a concentração, dos ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose.

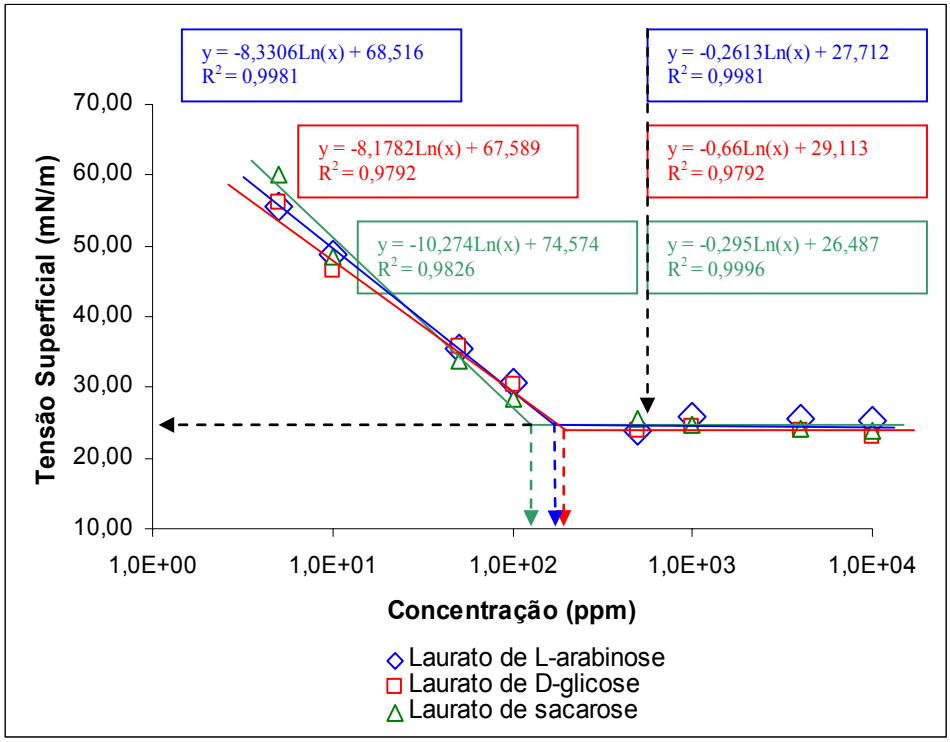


Figura 86: Curvas de tensão superficial *versus* concentração para os ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose.

Para os três tensoativos considerados, baixas concentrações de ésteres de açúcar implicaram em altos valores de tensão superficial. Foi observado que os pontos de inflexão das curvas foram bem próximos. Assim, para se obter o valor da CMC e da respectiva tensão superficial (γ_{CMC}), com maior precisão, foram feitas seis regressões lineares apresentadas na Figura 86. O valor da CMC de cada tensoativo foi calculado a partir da solução dos sistemas lineares das equações das retas relativas a cada tensoativo. As coordenadas cartesianas (Concentração; Tensão superficial) foram as seguintes: LLA (156,07 ppm; 27,712mN/m); LDG (166,95 ppm; 29,113mN/m) e LS (122,30 ppm; 26,487mN/m). Para os três tensoativos, os valores das tensões superficiais foram muito próximos, bem como os valores das CMC, considerando-se uma escala com limite máximo de 10.000 ppm. Para fins de comparação, foram medidas as tensões superficiais na água pura empregada nas misturas, bem como das soluções de 10^4 ppm da L-arabinose, da D-glicose e da sacarose. Os valores foram: 73,63 mN/m; 73,58 mN/m; 73,54 mN/m e 72,95 mN/m, respectivamente.

Os valores de HLB diferiram razoavelmente: LLA (HLB = 8,97); LDG (HLB = 9,88) e LS (HLB = 13,02). Como o tamanho das cadeias alquílicas é o mesmo para os três tensoativos, modificações nas “cabeças”, certamente, implicam em valores de HLB distintos. Como a massa molar da cabeça do LLA é menor do que a do LLG, que é menor do que a do LS, então a hidrofilicidade do LLA é menor do que a do LDG, que é menor do que a do LS. Estas pequenas diferenças estruturais implicam em mudanças com relação à polaridade das partes hidrofílicas e, consequentemente, em relação aos valores de HLB. Por sua vez, mudanças no HLB implicam diferentes propriedades interfaciais e superficiais, para uma mesma concentração de surfactante.

De uma maneira geral, um tensoativo que possua uma cabeça menos polar (menor HLB) consegue um maior grau de redução da tensão superficial e um menor valor de CMC (TOKIWA, 2000; WATANABE, 2001; RAKU, 2003; NIRAULA, 2004). No entanto, poucos trabalhos têm sido apresentados com o

objetivo de explicar as propriedades da dinâmica interfacial e atividades de superfície de ésteres de açúcar.

As moléculas de um líquido localizadas na interface líquido/ar interagem com um menor número de moléculas, comparadas àquelas localizadas no interior do líquido (água, no caso), as quais são atraídas em todas as direções. As moléculas na superfície do líquido sofrem, apenas, atração lateral e inferior. Assim, quanto menor for a polaridade da cabeça do tensoativo, maior será a difusão deste tensoativo para a interface (no caso o ar), que é menos polar (apresenta maior caráter hidrofóbico). Este aumento de concentração na superfície resulta num maior grau de redução da tensão superficial (KANICKE, 2002).

No entanto, o éster laurato de sacarose, que possui a "cabeça mais hidrofílica" (maior HLB), apresentou os menores valores para a CMC e tensão superficial relativa.

Raku et al. (2003) investigaram a variação da tensão superficial, em água, de três ésteres de açúcar: 6-*O*-(10 undecilenoil) D-glicose, 6-*O*-(10 undecilenoil) trehalose e 1'-*O*-(10 undecilenoil) sacarose. Os três ésteres possuem a mesma "cauda" e "cabeças" distintas. Para os dois últimos, as curvas foram muito semelhantes e os valores de CMC foram estimados em, aproximadamente, 200 ppm. Como a solubilidade, em água, do 6-*O*-(10 undecilenoil) D-glicose foi baixa, o valor da CMC não foi determinada. Tokiwa et al. (2000) compararam as variações de tensão superficial de um homopolímero, poli (6-O-viniladipoil D-glicose), com um copolímero, poli (6-O-viniladipoil D-glicose), possuindo vários ésteres vinílicos ligados à cadeia principal: propionato de vinila, butanoato de vinila, hexanoato de vinila e octanoato de vinila. Observaram que, para os ésteres com menores tamanhos de cadeia alquílica nos copolímeros, maiores eram os valores da redução da tensão superficial. No entanto, os autores consideraram os valores das CMC iguais a 100 ppm para todos os copolímeros e concluíram que os valores das CMC foram independentes do tamanho das cadeias alquílicas (parte lipofílica).

Observando a Figura 86, o mesmo problema de proximidade das curvas ocorreu, e o menor valor de CMC e da γ_{CMC} do éster 1'-*O*-lauroil sacarose pode ser justificado pelo fato das diferenças entre os valores se encontrarem em uma escala de erros toleráveis. De fato, as γ_{CMC} variaram de 26 a 29 mN/m, em uma escala de 10 a 70, e as CMC variaram de 112 a 167, em uma escala de 1 a 10^4 ppm.

6.2.10.2 Ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose

A Figura 87 apresenta as curvas de tensão superficial *versus* concentração dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose, para o estudo da hidrofilicidade e determinação das CMC. Como os pontos de inflexão não estavam bem definidos para estas curvas, não se adotou escala logarítmica para o eixo relativo às concentrações e, para cada tensoativo, foram traçadas tangentes, a cada curva, tomando-se por base os cinco primeiros pontos, representativos das menores concentrações, e dos dois últimos, representativos das maiores concentrações (KLOET, 2002). A interseção destas retas forneceu o par de coordenadas (Concentração; Tensão superficial), como se segue: ALA (143,72 ppm; 33,81 mN/m); ADG (136,64 ppm; 34,17 mN/m); AS (111,92 ppm; 33,47 mN/m). As tensões superficiais na água pura, empregada nas misturas, bem como das soluções de 10^4 ppm da L-arabinose, da D-glicose e da sacarose, apresentaram os seguintes resultados: 73,63 mN/m; 73,58 mN/m; 73,54 mN/m e 72,95 mN/m, respectivamente.

Estes tensoativos apresentaram comportamento semelhante aos ésteres de açúcar com cadeia saturada, discutidos anteriormente, ou seja, baixas concentrações de ésteres de açúcar implicaram em altos valores de tensão superficial. Também foi observado que os pontos de inflexão das curvas foram bem próximos.

Comparando-se as partes lipofílicas dos dois grupos de surfactantes, notam-se três diferenças básicas: os adipatos apresentam cadeias menores e

possuem, na extremidade, uma insaturação e uma carboxila. Considerando-se, somente, o tamanho da cadeia, teoricamente, os adipatos são mais hidrofílicos (mais polares e com maiores valores de HLB- Tabela 23) em relação aos lauratos. Este fato pode justificar as menores reduções de γ_{CMC} em comparação com os lauratos. Neste caso, há uma convergência com as observações apresentadas na literatura (WATANABE, 2001; NIRAULA, 2004).

Quanto à correlação entre os valores de CMC e os valores de HLB, todos os ésteres apresentaram menores valores de CMC para maiores valores de HLB. Observando-se as curvas da Figura 87, percebe-se que ocorreu o mesmo problema de proximidade das curvas, não sendo possível um estudo mais aprofundado em relação a estes parâmetros.

Mesmo assim, para fins de comparação com trabalhos de outros autores, os valores de CMC e γ_{CMC} foram considerados.

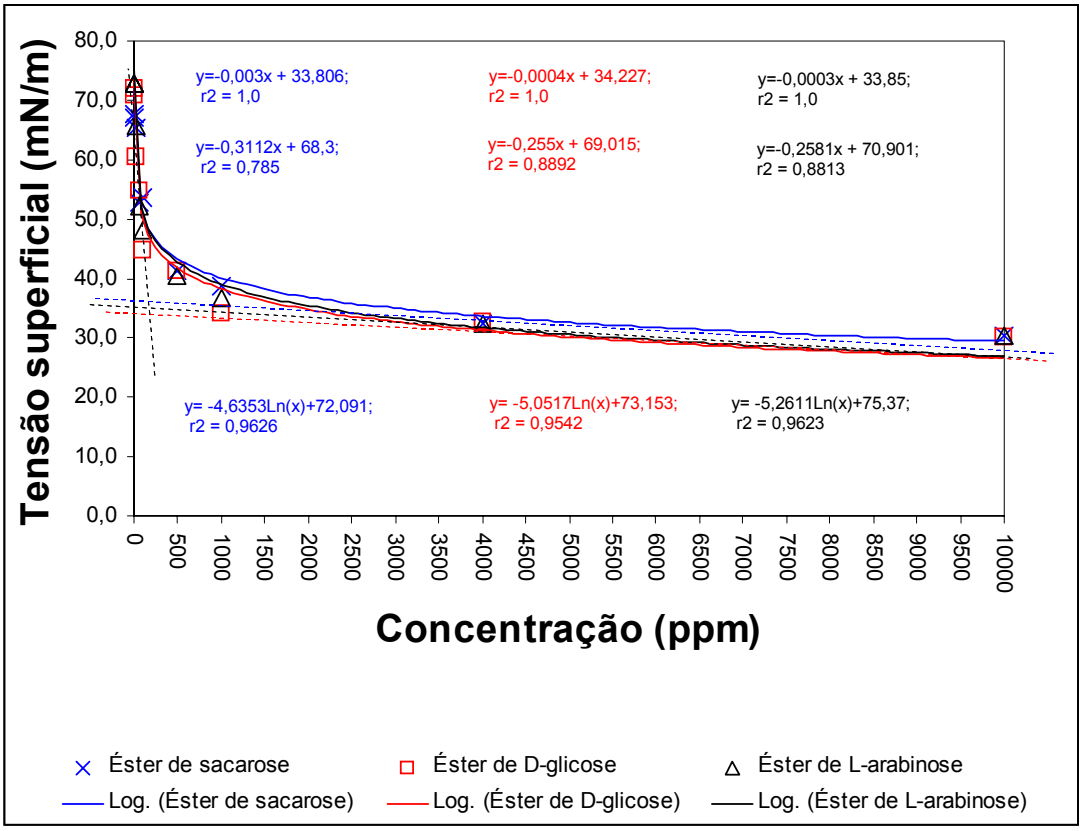


Figura 87: Curvas de tensão superficial *versus* concentração dos ésteres 5-*O*-viniladipoil L-arabinose, 6-*O*-viniladipoil D-glicose e 1'-*O*-viniladipoil sacarose, sem escala logarítmica

6.2.11 Determinação da área ocupada por cada molécula na superfície

Para uma dada interface, a adsorção, também chamada de "excesso de superfície" (IUPAC, 1997) de um dado componente (Γ), foi obtida pela inclinação de cada curva, de acordo com a Equação 5.

$$\frac{d\gamma}{d\log C} = \frac{RT}{2{,}30}\Gamma \qquad (5)$$

Na equação acima, γ é a tensão superficial (mN/m), C é a concentração (ppm), R é a constante dos gases (J/mol.K) e T é a temperatura absoluta (K). Assumindo-se que as moléculas do surfactante foram adsorvidas como uma monocamada na superfície (PIAO, 2006), a área ocupada por molécula foi estimada a partir do valor de Γ , de acordo com a Equação 6, onde N_A é o número de Avogadro.

$$a = \frac{1}{\Gamma . N_A} \qquad (6)$$

A Tabela 23 apresenta os resultados dos valores de "$\boldsymbol{a}$", obtidos por intermédio das Equações 5 e 6.

Tabela 23: Propriedades dos surfactantes: laurato de L-arabinise, laurato de D-glicose, laurato de sacarose, adipato de L-arabinose, adipato de D-glicose e adipato de sacarose, a 20°C.

Parte Hidrofílica	Parte Lipofílica	CMC[a] (ppm)	γ_{CMC}[b] (mN/m)	α[c] (nm^2)	HLB[d]	CPP[e]	ΔG_m[f] (kJ/mol)	ΔS_m[g] (kJ/mol.K)
Lauratos de açúcares								
Arabinose		156,07	27,71	0,48	8,97	0,44	-18,66	0,064
D-glicose	10 CH_2	166,95	29,11	0,48	9,88	0,44	-18,71	0,064
Sacarose		122,30	26,49	0,39	13,02	0,52	-20,37	0,070
Adipatos de açúcares								
Parte Hidrofílica	Parte Lipofílica	CMC[a] (ppm)	γ_{CMC}[b] (mN/m)	α[c] (nm^2)	HLB[d]	CPP[e]	ΔG_m[f] (kJ/mol)	ΔS_m[g] (kJ/mol.K)
Arabinose		143,72	33,81	0,77	9,80	0,27	-18,65	0,064
D-glicose	4 CH_2	136,64	34,17	0,80	10,72	0,26	-19,00	0,065
Sacarose		111,92	33,47	0,87	13,75	0,24	-20,45	0,070

[a] Concentração micelar crítica
[b] Tensão superficial relativa à CMC
[c] Área residual por molécula
[d] Balanço hidrofílico-lipofílico
[e] Parâmetro de empacotamento crítico
[f] Energia livre de micelização
[g] Entropia de micelização

Os valores de α, para os ésteres saturados, variaram numa faixa de 0,39 a 0,48 nm^2, enquanto que para os ésteres insaturados estes valores variaram de 0,77 a 0,87 nm^2. Piao et al (2006) obtiveram valores de α para vários 1-*O*-monoacil açúcares (monodecanoil, monooctanoil e monolauroil de glicerol, de eretritol e de xilitol). Os valores variaram numa faixa de 0,3 a 0,4 nm^2. Söderberg et al (1995), obtiveram os seguintes valores para a área residual: lauroil glicose (0,37 nm^2); lauroil sacarose (0,56 nm^2); lauroil rafinose (0,67nm^2) e lauroil estachiose (0,72 nm^2). Os valores de α foram menores para os ésteres menos hidrofílicos. De fato, menores tamanhos moleculares implicam em menores áreas ocupadas, comparando-se os ésteres com a mesma cadeia

carbônica. Estes resultados indicam que o tamanho das moléculas foi, exclusivamente, determinado pelo tamanho da parte hidrofílica (PIAO, 2006). No entanto, o valor de α é maior para tamanhos moleculares menores, quando se compara os ésteres com cadeias carbônicas distintas. Por exemplo, neste trabalho, o laurato de arabinose (α = 0,48 nm^2) possui maior cadeia carbônica que o adipato de arabinose (α = 0,77nm^2). No entanto, o último ocupa maior área na superfície da água que o primeiro, provavelmente, pelo fato do volume ocupado pela cabeça polar do adipato de arabinose estar mais próxima da superfície do líquido, se comparado ao laurato de arabinose, promovendo afastamento entre as moléculas dos tensoativos por efeitos de repulsão de natureza eletrostática e estérica. Na Tabela 23, pode-se notar que todos os ésteres seguiram esta tendência.

6.2.12 Determinação do parâmetro de empacotamento crítico (CPP)

O CPP é um parâmetro que expressa a auto-organização estrutural e é definido pela Equação 7 (ISRAELACHVILI, 1977).

$$CPP = \frac{v}{a_0 . l_c} \tag{7}$$

Na equação acima, "v" (nm^3) é o volume ocupado pela cadeia alquílica, α_0 (nm^2) é a área ótima ocupada pela "cabeça" e l_c (nm) é o comprimento médio da cadeia alquílica. Os valores de "v" e de l_c foram obtidos pelas Equações 8 e 9 propostas por Tanford (1980), onde ***n*** é o número de carbonos na cadeia carbônica.

$$v = 0{,}0274 + 0{,}0269 . n \tag{8}$$

$$l_c = 0{,}15 + 0{,}1265 . n \tag{9}$$

O valor de α pode ser usado, em vez de α_0 (SÖRDERBERG, 1995).

Os valores de CPP foram calculados para todos os ésteres e apresentados na Tabela 23. Para os ésteres com cadeias saturadas, os valores

de CPP variaram de 0,44 a 0,52, e para os ésteres com cadeia insaturada estes valores ficaram entre 0,24 e 0,27. Piao et al. (2006) obtiveram valores de CPP entre 0,5 e 1,0 para 1-*O*-monoacil açúcares, citados anteriormente, com exceção do monooctanoil xilitol. Segundo os autores, valores de CPP entre 0,5 e 1,0 indicam que os tensoativos ficaram agregados em camadas superpostas (bicamadas), enquanto que o monooctanoil xilitol, que apresentou valor de CPP igual a 0,43, pode ter formado agregados em forma de bastão. Pelo mesmo raciocínio e observando os valores de CPP da Tabela 23, somente o éster 1'-*O*-viniladipoil sacarose deve ter se agregado na forma de bicamadas (CPP = 0,52), enquanto que os demais podem ter se agregado em forma de bastão, especialmente os tensoativos que apresentam cadeia insaturada, devido a sua maior rigidez.

6.2.13 Determinação da energia livre de micelização

A energia livre de micelização, ΔG_m, é dada pela Equação 10 (PIAO, 2006).

$$\Delta G_m = RT \ln(CMC) \tag{10}$$

Na equação acima, R é a constante dos gases perfeitos (8,31 J/mol.k), T é a temperatura (293K) e CMC é a concentração micelar crítica (mol/L). A Tabela 23 apresenta os resultados obtidos para a ΔG_m. Os valores negativos indicam que, em todos os casos, a formação das micelas foi, termodinamicamente, favorecida e ocorreu espontaneamente. Também se pode observar que, dentro das mesmas categorias, o aumento do tamanho da "cabeça" do tensoativo, acarretou valores mais negativos de ΔG_m. Este fato sugere que a hidrofilicidade favoreceu o processo termodinâmico de micelização do sistema.

6.2.14 Determinação da entropia de micelização

Piao et al. (2006) determinaram os valores de CMC a 25, 32 e 39°C para ésteres de xilitol com diferentes tamanhos de cadeia alquílica e, também, para

o monolauroil arabitol, ribitol e sorbitol. Para todos estes ésteres, não houve dependência significante dos valores de CMC com a temperatura, indicando que as entalpias de micelização (ΔH_m) foram, praticamente, iguais a zero.

No presente trabalho, o processo foi isotérmico e, neste caso, o valor da entalpia de micelização (ΔH_m) foi considerada zero. Assim, a entropia de micelização pode ser obtida pela Equação 11.

$$\Delta S_m = \frac{\Delta H_m - \Delta G_m}{T} \tag{11}$$

Os valores de ΔS_m, calculados a 20°C, e listados na Tabela 23 foram todos positivos e aumentaram com o aumento da hidrofilicidade, dentro da mesma categoria. Esses valores positivos parecem indicar um ganho de desordem ou ruptura na estrutura "iceberg" da água, devido à incorporação da cadeia alquílica (hidrofóbica), dentro do sistema (FRANK, 1945).

6.2.15 Emprego dos ésteres 5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose como lubrificantes em fluidos de completação

O balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) é um parâmetro empírico, mas de grande utilidade prática na escolha de um surfactante para um determinado emprego (YAN, 2001). Por outro lado, substâncias que apresentem baixos valores de CMC são de grande importância na indústria, por implicarem em baixo consumo de materiais e menor impacto ambiental (Santa Anna, 2002). Surfactantes com valores de HLB na faixa de 7 a 9, em geral, são bons agentes de molhabilidade, e na faixa de 8 a 18 são, freqüentemente, bons emulsificantes de óleo em água.

No presente trabalho, os ésteres de açúcares apresentaram baixos valores de CMC e γ_{CMC}, sendo que os valores de HLB se situaram na faixa entre 8,97 e 13,75. Assim sendo, imaginou-se ensaiar alguns destes ésteres como lubrificantes em fluido de completação. Os ésteres selecionados foram os

de cadeia saturada (5-*O*-lauroil L-arabinose, 6-*O*-lauroil D-glicose e 1'-*O*-lauroil sacarose), já que os demais foram destinados aos ensaios de polimerização.

Para a avaliação destes ésteres como aditivos em fluido de completação, foi feita uma análise comparativa da eficiência destes aditivos naturais com três lubrificantes comerciais, isoladamente e combinados com outras bases oleofílicas. Foram empregados como aditivos, além dos ésteres de açúcar, um éster comercial, um óleo vegetal e glicerina P.A. A Tabela 24 apresenta a formulação dos 16 lubrificantes analisados, os coeficientes de lubricidade medidos e as concentrações dos lubrificantes.

O fluido base empregado foi constituído por KCl (4lb/bbl), NaCl (9lb/bbl), UltraWet™ (0,1% v/v) e água (QSP). A densidade da mistura foi de 8,5 lb/gal (1020 Kg/m^3) à temperatura ambiente (28°C).

Tabela 24: Formulação dos 16 lubrificantes analisados, os coeficientes de lubricidade medidos e as concentrações dos lubrificantes.

Lubrificante	C.L.	Concentração lubrificante (g/mL)	Formulação
Branco	0,33	0,00000	Fluido base
L1	0,03	0,01500	P1
L2	0,05	0,01500	P2
L3	0,12	0,01500	P3
L4	0,08	0,01564	LDG
L5	0,05	0,00704	L4+3% vol éster
L6	0,04	0,00704	L4+3% vol óleo soja
L7	0,127	0,01564	LS
L8	0,096	0,00704	L7 + 3% vol éster
L9	0,033	0,00704	L7 + 3% éster + 2% glicerina (vol)
L10	0,096	0,00704	L7 + 3% vol óleo
L11	0,022	0,00704	L7 + 3% óleo + 2% glicerina (vol)
L12	0,085	0,0156	LLA
L13	0,111	0,00704	L12 + 3% vol éster
L14	0,082	0,00704	L12 + 3% éster + 2% glicerina (vol)
L15	0,112	0,00704	L12 + 3% vol óleo
L16	0,093	0,00704	L12 + 3% óleo + 2% glicerina (vol)

A Figura 88 apresenta os resultados e as comparações dos coeficientes de lubricidade (C.L.) entre as diversas formulações de lubrificantes. Pode-se notar que, das treze formulações ensaiadas (ésteres de açúcar e ésteres misturados a bases oleofílicas), somente uma (L-7) apresentou lubricidade

inferior ao produto comercial de menor eficiência (L-3), sendo que, em somente três, houve separação de fases (L5, L14 e L15), durante dez dias em repouso, à temperatura ambiente.

A formulação 7 é composta somente de laurato de sacarose, com HLB igual a 11,87 e CMC igual a 122 ppm. Tanto a adição de 3% (v/v) do éster comercial (L8), como a adição de 3% do óleo vegetal (L10), representaram uma pequena melhora no desempenho do sistema lubrificante. No entanto, com a adição de 3% de óleo e 2% de glicerina (L11), obteve-se a formulação com o melhor desempenho.

As formulações L5, L14 e L15 apresentaram separação de fases, sendo a primeira constituída de laurato de D-glicose e as outras duas de laurato de L-arabinose. Acredita-se que, pelo fato do fluido de completação ensaiado ser à base de água, os tensoativos com baixos valores de HLB não seriam os mais indicados, apesar de que, nos ensaios isolados, nenhum destes dois ésteres apresentou este problema. No caso, os valores de HLB dos ésteres LLA e LDG foram de 8,97 e 9,88, respectivamente e o do LS foi de 13,02.

Comparando-se os resultados da adição dos ésteres, isoladamente, os valores dos C.L. relativos aos ésteres LLA e LDG foram muito próximos, enquanto que para o éster LS foi bem maior, significando um menor desempenho. Este comportamento pode ser justificado pelo fato do LS possuir uma hidrofilicidade maior do que a dos outros dois ésteres, e o fluido de completação ser à base de água. Neste caso, diminuindo-se o caráter hidrofílico, diminuem-se os valores das tensões superficiais e, consequentemente, melhora-se o poder lubrificante do fluido.

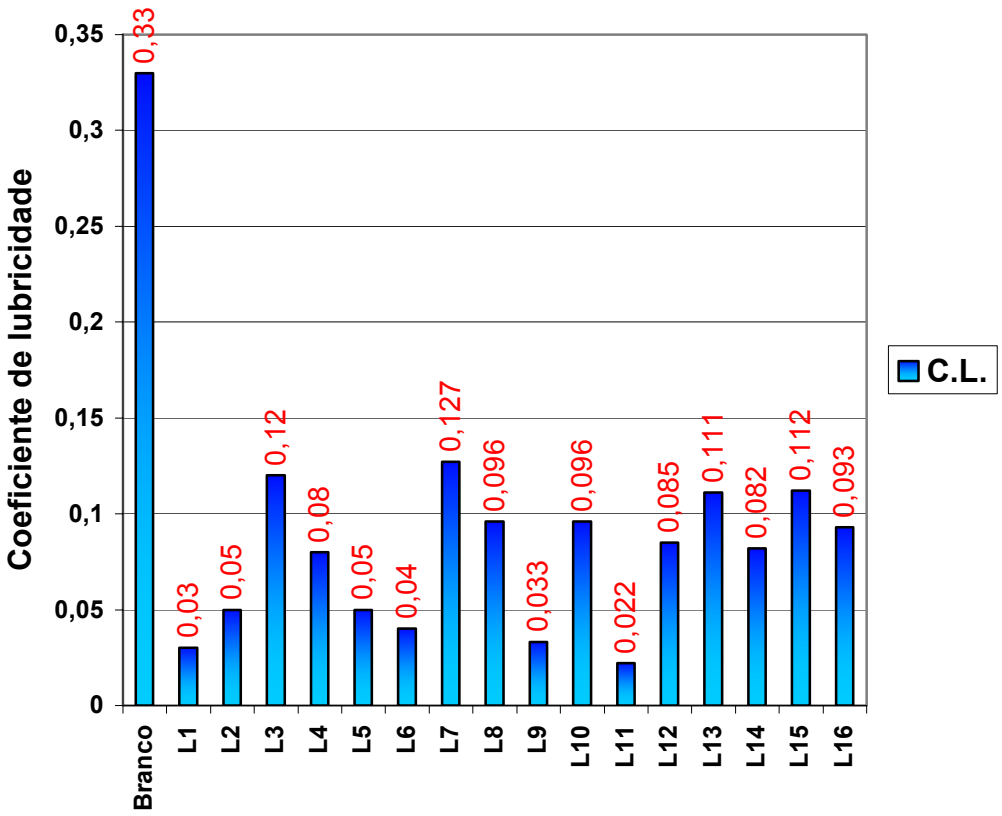


Figura 88: Coeficientes de lubricidade (C.L.) das diversas formulações de lubrificantes testadas.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

7- CONCLUSÕES

A produção de ésteres de açúcar por catálise enzimática foi tema de pesquisa neste trabalho, devido à ampla possibilidade de aplicações destes produtos em diversos setores da indústria. Foram empregadas condições brandas de temperatura e pressão, além do uso de biocatalisadores, permitindo a obtenção de biossurfactantes e biopolímeros com bons rendimentos, minimizando os custos relativos a processos de purificação. Além do mais, do ponto de vista da preservação ambiental, estas condições reacionais se tornaram um importante fator para o desenvolvimento de novos materiais nos últimos anos. Dessa forma, as principais conclusões deste trabalho foram:

- ✓ Os biossurfactantes foram obtidos em uma única etapa, com altos rendimentos (acima de 98%) nas seguintes condições reacionais: temperatura: 50°C, pressão: 1 atmosfera, concentração de enzima: 40 mg/mL, razão molar éster vinílico/ açúcar: 4/1, tempo: 7dias, agitação: 160 rpm, sem adição de água.

- ✓ Para todos os casos, a acilação foi altamente seletiva e ocorreu na hidroxila do carbono primário

- ✓ Dentro das faixas estudadas, os fatores que influenciaram, favoravelmente, na conversão do laurato de sacarose (usado como modelo) foram em ordem de importância: o tempo, a concentração de enzima, as razões molares entre os substratos e a temperatura. O fator que influenciou desfavoravelmente foi a adição de água.

- ✓ A metodologia, por extração com acetona a quente, empregada na purificação, pareceu ser mais eficiente, menos tediosa e mais econômica do que por coluna cromatográfica, além de poder ser facilmente adaptada em processos industriais, onde altos níveis de pureza sejam requeridos. Em relação aos produtos brutos, bons

rendimentos (entre 50 e 90%) foram alcançados, quando purificados por extração em acetona a quente (50°C)

- ✓ Os valores dos balanços hidrofílicos-lipofílicos (HLB) dos ésteres de açúcar obtidos na segunda etapa variaram de 8,97 a 13,75. Já os valores das concentrações micelares críticas (CMC) e das γ_{CMC} variaram de 130 ppm a 150 ppm e 28 mN/m a 34mN/m, respectivamente. Apesar das diferenças entre os valores de HLB, as diferentes "cabeças" hidrofílicas destes surfactantes, com distintas orientações dos grupos hidroxila, apenas afetou, ligeiramente, as suas atividades de superfície. Estes valores de HLB, CMC e γ_{CMC} sugerem potenciais aplicações como agentes emulsificantes do tipo O/A em aplicações industriais e ambientais, como limpeza de reservatórios de óleo, redutores de viscosidade no transporte de óleos pesados, biorremediação de fase líquida não aquosa em solos e ambientes marinhos e estabilizante de emulsões com hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e halogenados com cadeia longa.

- ✓ Valores de ΔG_m negativos indicaram que a formação de micelas foi, termodinamicamente, favorecida e foram menores (mais negativos) para maiores tamanhos de "cabeça", ou seja, o caráter hidrofílico favoreceu o processo termodinâmico de micelização. Os valores de ΔS_m aumentaram, com o aumento da hidrofilicidade, indicando um ganho de desordem na estrutura "iceberg" da água, devido à introdução da cadeia alquílica no sistema.

- ✓ Foi desenvolvido um processo inédito para a polimerização dos ésteres vinílicos de açúcar descrito no item 5.2.9. Tentativas anteriores, por métodos convencionais de polimerização em solução, empregando balão de três bocas, em atmosfera inerte, fracassaram (dados não apresentados). O solvente empregado foi a água que, além de não agredir o meio ambiente, vem mostrando maior eficácia, em vários processos de polimerização, do que os solventes orgânicos.

- ✓ Espectros na região do infravermelho dos monômeros e dos polímeros confirmaram o desaparecimento da banda relativa à ligação dupla (C=C).

- ✓ As massas molares obtidas para os polímeros de açúcares ramificados apresentaram valores de M_n entre $1,6x10^3$ e $7,2x10^4$ e valores de polidispersão entre 1,75 e 6,57.

- ✓ Particularmente, em relação aos polímeros poli (6-*O*-viniladipoil ácido ascórbico) e poli (5-*O*-viniladipoil L-arabinose), até o presente momento, não é de nosso conhecimento a publicação de qualquer trabalho descrevendo a síntese destes produtos.

- ✓ Por fim, os ésteres de açúcar com cadeias carbônicas saturadas foram submetidos a ensaios para avaliação de desempenho como aditivos lubrificantes em fluidos de completação de poços de petróleo e apresentaram resultados equivalentes ou superiores a três produtos comerciais testados. Assim, as formulações que apresentaram os melhores resultados possuem boas chances de serem bem sucedidas em testes de campo.

CAPÍTULO 8

SUGESTÕES

8- SUGESTÕES

Na continuação da pesquisa da síntese de ésteres de polióis por catálise enzimática e estudo de viabilidade de aplicação, são apresentadas as seguintes sugestões:

- ✓ Investigar a síntese em sistemas micro aquosos, através de metodologia de resposta de superfície, adicionando menores razões de água/solvente. Sugere-se: 0,5/9,5; 0,3/9,7; 0,2/9,8 e 0,1/9,9. Acredita-se que altas conversões podem ser alcançadas em um tempo bem menor do que 7 dias, implicando significativa economia no processo.

- ✓ Produzir maiores quantidades dos produtos, obtidos com sucesso, para ensaios de aplicabilidade na indústria do petróleo, como agentes de limpeza de reservatórios de óleo, redutores de viscosidade de óleos pesados, emulsificantes para emprego na biorremediação de derramamento de óleo em solos e ambientes marinhos, estabilizante de emulsões com hidrocarbonetos em geral, aditivos lubrificantes em fluidos de completação e perfuração, agentes inibidores de incrustação em rocha, etc.

- ✓ Investigar a síntese de ésteres de açúcar, empregando triglicerídeos como doadores de grupo acila. A vantagem seria o uso de óleo vegetal diretamente no processo, sem qualquer modificação preliminar. A desvantagem seria a formação de glicerol, acarretando maiores custos na purificação. Deve ser feito um estudo de viabilidade econômica em relação ao processo que emprega derivados de óleo vegetal.

- ✓ Obter maiores quantidades de polímeros para ensaios de caracterização, química, físico-química, térmica, mecânica, microestrutural, visando o emprego como biomateriais, fármacos, produtos de higiene, polímeros de engenharia e outros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C.D.; SPITZR, S.; COWAN, R.M., Biodegradation of Nonionic Surfactants and Effects of Oxidative Pretreatment, **Journal of Environmental Engineering**, 122, 6, 477-483, 1996.

ADELHORST, K.F.; BJÖRKLING, S.E.; GODTFREDSEN; KIRK, O., Enzyme catalyzed preparation of 6-O-acylglucopyranosides, **Synthesis 2**: 112-115, 1990.

AFFLECK, R.; HAYNES, C.A.; CLARCK, D.S., Enzymatic catalysis and dynamics in low water environments, **Proceeding of the National Academy o Sciences**, USA, 89, 1100 – 1104, 1992.

AKOH, C.C.; NWOSU C. V.**,** Emulsification properties of polyesters and sucrose ester blends. I: Carbohydrate fatty acid polyesters**, Journal of the American Oil Chemists' Society**, 69, 1,14-19, 1992.

ALBERTIN, L.; KOHLERT, C.; STENZEL, M.; FOSTER, L.J.R; DAVIS, P.D., Chemoenzymatic synthesis os narrow-polydispersity glycopolymers: poly(6-*O*-vilyladipoil-D-glucopyranose, **Biomacromolecules**, 5, 2, 2004.

AMERI, M.; ATTWOOD,D.; COLLETT, J.H.; BOOTH,C., Self-assembly of alcohol ethoxylate non-ionic surfactants in aqueous solution, **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, 93(15), 2545-2551, 1997.

ANASTAS, P.T.; BICKART, P.H.; KIRCHHOFF, M.M., **Designer Safer Polymer**, ed. Willey Interscience, ISBN 0-471-39733-4, 4, 2001.

ANASTAS, P.T.; WARNER, J.C. **Green Chemistry: Theory and Practice**; N.Y. Oxford University,14, 1998.

ANEEL. Disponível em <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/05-Biomassa(2).pdf>. Acessado em 20 fev. 2007.

ARAMAKI, K.; KUMIEDA, H.; ISHITOBI, M.; TAGAWA, T.; **Langmuir**, 13, 2266, 1997.

ARCOS, J.A.; BERNABÉ, M.; OTERO, C., Quantitative enzymatic production of 6-*O*-acylglucose esters, **Biotechnoly and Bioengineering**, 52: 539-548, 1998.

ATLAS, R.M., Microbial hydrocarbon degradation-biodegradation of oil spills, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 52, 149, 1991.

BALLARD, J.M.; HOUG,L.; PHADNIS, S. P.; RICHARDSON, A. C., Selective Tetratosylation of Sucrose: isolation of the 2,6,1',6'-tetrasulphonate, **Carbohidrates Research**, 83: 138-141, 1980.

BANAT, I.M.; Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review, **Biosource Technology**, 51, 1-12, 1995.

BANAT, I.M.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BANERJEE, S.; Biosurfactant production and use in oil tank clean-up, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 7, 80, 1991.

BAUCHOT, A.D.; JOHN, P.; SORIA, Y.; RACASENS, I., Sucrose ester-based coating formulated with food-compatible antioxidants in the prevention of superficial scald in stored apple, **Journal American Society Horticultutal Science**, 120, 491, 1995

BAZIAN, H.G.; POLAT, T.; LINHARDT, R,J.; Synthesis of sucrose-based surfactants through regioselectivie sulfonation of acyl sucrose and the nucleophilic opening of sucrose cyclic sulfate, **Carbohydrate Research**, 309, 189, 1998.

BELL, G.; HALLING, P.J.; MOORE, B.D.; PARTRIDGE, J.; REES, D.G., Biocatalyst behaviour in low-water systems, **Trends Biotechnology**, 13, 468-473; 1995.

BIOPOLYMERS: MAKING MATERIALS NATURE´S, U.S. Congress, Office of Technology Assesment, **BACKGROUND PAPER**, OTA-BP-E-102, Washington, DC: U.S. Government Printing Office, September,12, 1993.

BIRDI, K.S., **Handbook of Surface and Colloid Chemistry**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997.

BLINKOVSKY, A.M.; KHMELNITSKY, Y.L.; DORDICK, J.S. Organosoluble Enzyme-Polymer Complexes: a Novel Type of Byocatalyst for Nonaqueous Medium, **Biotechnology Techniques**, 8-33, 1994.

BOCK, K.; PEDERSEN, C., **Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharide**. In: Tipson RS, Horton D. eds. Advances in Carbohydarte Chemistry and Biochemistry. New York: Academic Press, 27-66, 1983.

BÖGE, K.; TIETZE, L.F., Synthesis of Polyglycosides, **Henkel-Referate**, 53: 15-20, 1999.

BOGNOLO, G.; Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 152, 41, 1999.

BOSCOLO, M., Sucroquímica: Síntese e Potencialidades de Aplicações de Alguns Derivados Químicos da Sacarose**, Química Nova**, 26, 6,906-912, 2003.

BOUSQUET, M.P.; WILLEMOT, R.M.; MONSAN, P.; BOURES, E., Enzymatic synthesis of unsaturated fatty acid glucoside esters for dermo-cosmetic applications, **Biotechnology and Bioengineering**, 63: 730-736, 1999.

BRINK, L.E.S.; TRAMPER, J.; Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis, **Biotechnoly and Bioengineering**, 27, 1258-1269, 1985.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R. S., Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, **Applied Microbiology Biotechnology**, 50(5): 520-9, 1998.

CAMPBELL, C.J.; LAHERRÈRE, J.H., The end of cheap oil, **Science American**, 60-65, March, 1998.

CANTAROW, A.; SCHEPARTZ, B.; **Bioquímica**, 4ª edição, Livraria Atheneu S.A., 230, 1968.

CHAIKOF, E.L.; GRANDE, D.; BASKARAN, S. free radical polymerization method for manufacture of glucopolymers useful for binding bioactive molecules, **PCT International Patent Application:** 0255021; Emomory University: Atlanta G.A., 2002.

CHAILAN, F.; LE FLECHE,A.; BURY, E.; PHANTAVONG,Y.H.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J.; Identification and biodegradation potencial of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms, **Research Microbiology**, 155, 587-595, 2004.

CHAUVIN, C.; BACZKO, K.; PLUSQUELLEC, D. New Higly regioselective Reactions of unprotected Sucrose. Synthesis of 2-O-(N-alkylcarbamoyl) sucrose, **Journal of Organic Chemistry**, 58,2291-2295, 1993.

CHAUVIN, C.; PLUSQUELLEC, D. A New Chemoenzimatic Synthesis of 6'-O-acylsucroses, **Tetrahedron Letters**, 32, 3495-3498, 1991.

CHEN, X.; DORDICK, J.S.; RETHWIISCH, D.G.; Chemoenzymatic synthesis of linear poly-(sucrose acrylate): optimization of enzyme activity and polymerization conditions, **Macromolecules**, 28: 60,14, 1995.

CHIELINI, E.; CORTI, A.; D'ÁNTONE, S.; SOLARO, R.; Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials, **Progress in Polymer Science**, 28, 963-1014, 2003.

CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J.S.; DELORME, P.; WILLEMONT, R.M., Kinetic study of esterification by immobilized lipases in *n*-hexane, **FEBS Letters**, 276, 181-184, 1996.

CLARCK, L.C.; GOLLAN,F., Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure, **Science,** 152, 1755, 1966.

CRUCES, M. A.; PLOU, F.J.; FERRER, M.; BERNABÉ, M.; BALLESTEROS, A., Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 78, 5, 541-546, 2001.

CRUCES, M.A.; OTERO,C.; BERNABE,M.; MARTIN,M.; BALLESTEROS, A.; Enzymatic preparation of acylated sucroses, **Annals of the New York Academy of Sciences**, 672, 436, 443, 1992.

DAVIS, S.S.; HADGRAFT, J.; PALIN, K.J., **Encyclopedia of Emulsion Technology**, New York: Marcel Dekker,159,1985.

DESAI, J.D.; BANAT, I. M., Microbial production of surfactants and their commercial applications, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61: 47-64; 1997.

DEVULAPALLE, K.S.; SEGURA, A.G.; FERRER ,M.; ALCADE,M.; MOOSER,G.; PLOU,F.J., Effect of carbohydrate on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase activity, **Carbohydrate Research**, 339, 1029-1034, 2004.

DORDICK S.J.; RICH J.O.; BEDELL, B. A., Controlling Enzyme-Catalyzed Regioselectivity in Sugar Ester Synthesis, **Biotechnology and Bioengineering**, 426, 1994.

DUCRET, A.H; GIROUX, A; TRANI, M; LORTIE, R. Lipase-catalysed selective esterification of ibuprofen, **Journal of the American Oil Chemists' Society,** 3, 109, 1996.

FERRER, M.; CRUCES, M.A.; PLOU, F.J.; BERNABÉ, M.; BALLESTEROS, A., A simple procedure for the regioselective synthesis of fatty acid esters of maltose, leucrose, maltotriose and n-dodecyl maltosides, **Tetrahedron**, 56, 4053-4061, 2000a.

FERREIRA, L.; CARVALHO, R.; GIL, M.H.; DORDICK, J.S.; Enzymatic Synthesis of Inulin-Containing Hydrogels, **Biomacromolecules**, 3, 333-341, 2002.

FRANK, C., Polymer Materials Science: Novel Synthesis and Characterization of Supermolecular Structures, **Materials Research Society Bulletin**, 6, 7, 1991.

FRANK, H.S.; EVANS, M.W.; Free Volume and Entropy in Condensed Systems, **The Journal of Chemical Physics** , 13, 507, 1945.

GARCIA, J.E.L., A completação de poços no mar, **Petrobrás/Senec/Cen-Nor**, Salvador, 1997.

GARCIA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D.; RUOPPOLO, V.; REYES, L.; REBSTOCK, G.A.; GRIOT, K.; RODRIGUES, S. H.; HEREDIA, A.; ADORNES, C.; SILVA, R.P., Cronic oil pollution harms Magellanic penguins in the **Southwest Atlantic Marine Pollution Bulletin**, 52, 193-198, 2006.

GARTI, N.; ASERIN, A.; FANUN, M., Non- ionic sucrose esters microemulsions for food applications.Part I: Water Solubilization, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 164, 1, 27-38 (12), 2000.

GEYER, R.P., Extending blood levels with blood substitutes, **Bulletin of the Parenteral Drug Association**, 28, 88, 1974.

GLATTER, O.; ORTHABER, D.; STRANDNER, A.; SHERF, G.; FANUN, M.; GARTI, N.; CLÉMENT, V.; LESER, M. E., Sugar-ester Nonionic Microemulsion: Structural Characterization, **Journal of Colloid Interface Science**, 241, 215, 2001.

GORMAN, L.A.S.; DORDICK, J.S., Organic solvents strip water off enzymes, **Biotechnology and Bioengineering,** 39, 392, 1992.

GRIFFIN, W.C., Classification of surface-active agents by “HBL”, **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, 1, 311-326, 1949.

GRUBER, H.; KNAUS, S., Synthetic polymers based on carbohydrates: preparation, properties and applications, **Macromelecular Symposium**, 152, 95-105, 2000.

GUIDE TO CLEANER TECHNOLOGIES, Alternatives to Chlorinated Solvents for Cleaning and Degreasing, **EPA/625/R-93/016**, 11, 12, 1994.

GÜBITZ, G.M.; PAULO, A.C., New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers, **Current Opinion in Biotechnology**, 14: 577-582, 2003.

HARDIE, J. M. Oral *streptococci*. *In:* BERGEY, D. H., **Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore : Williams & Wilkins, 2, 12, 1054-1063, 1986.

HEIKILLA, H.; SARKKI, M.; LINDROOS, M.; OJALA, P.; RAVANKO, P.; TYLLI, M., Process of the production of isomaltulose and other products, **US Patent**; 6,146,854; 2000.

HIANAGIDA, H.; Intelligent Materials Minimizing Environmental Load, **Advanced Materials**, v.18A, p.17, 1994.

HIEMENZ, P.C., **Principles of Colloid and Surface Chemistry**, Marcel Dekker, N.Y. 1997.

HÖFLING, J. F.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; PEREIRA, C. V.; ROSA, E. A. R.; MOREIRA, D. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mutans* associado a *Streptococcus sobrinus* em escolares de diferentes classes sócio-econômicas e sua relação com a atividade cariogênica dessas populações, **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, 13, 2, 173-180, 1999.

HUSBAND, F.A.; SARNEY, D.B.; BERNARD, M.I.; WILD, P.I.; Comparison of foaming and interfacial properties of pure sucrose monolaurates, dilaurate and commercial preparations**,** **Food Hydrocolloid**, 12, 237-244, 1998.

IKEDA, I.; KLIBANOV, A.M.; Lipase Catalysed Acylation of Sugars Solubilized in Hydrophobic Solvents by Compexation, **Biotechnology and Bioengeering**, 42, 788-791, 1993.

ISRAELACHVILI, J.N.; MITCHELL, D.J.; NINHAM, B.W.; Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles, **Biochimistry and Biophysics Acta**, 470, 185, 1977.

IUB. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/ >. Acessado em: 06 dez.2006.

IUPAC, **Compendium of Chemical terminology**, 2nd Edition, 1997.

JACK, T. R., Microbially Enhanced Oil Recovery, **Biorecovery**, 1, 59, 1998.

JAN, S.; RADKA C.; VLADIMIR F., Two-stage synthesis of sorbitan esters, and physical properties of the products, **European Journal of Lipid Science and Technology**, 106, 12, 851-855, 2004.

JENNEMAN, G.E.; MCNERNEY, M.J; KNAPP, R.M.; CLARK, J.B.; FEERO, J.M.; REVUS, D.E.; MENZIE, D.E. A halotolerant biosurfactant producting *Bacillus* species potencially usefull for enhanced oil recovery, **Development in Industrial Microbiology**, 24, 485, 1983.

JOHNSTONE, B., A Throw away answer, **Far Eastern Economic Review**, 147(6), 62-63, 1990.

JONES, H.F., **US Patent, 4.306.062**, 1981.

KAHN, V.; LIDNER, P.; ZAKIN, V., Effect of kojic acid on the oxidation of o-dihydroxyphenols by mushroom tyrosinase, **Journal of Food Biochemistry**, 18; 253-271, 1995.

KANICKE, J.R., HOLMBERG, K., Surface chemistry in the petroleum Industry, **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**, New York: John Wiley & Sons, 1, 251-267, 2002.

KANO, J. SUZUKI, T., INQUE, S., HAYASHI, S, **Japanese Patent 8043042**, to Kao Soap Co., 1980.

KARAMUK, E.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; AKAIKE, T., Partially Degradable Film/Fabric Composites: Textile Scaffolds for Liver Cell Culture, **Artificial Organs**, 23, 881-884, 1999.

KARANTH, N.G.K.; DEO, P.G.;VEENANADIG, N.K**.,** Microbial production of biosurfactants and their importance, **Current Science**, 77, 116, 1999.

KASTLE, J.H.; LOEVENHART, A.S.; Concerning lipase, the fat-splitting enzyme and the reversibility of its action, **American Chemical Journal**, 24, 491-525, 1990.

KAWAGUTI, H.Y.; MANRICH, E.; SATO, H.H., Production of isomaltulose using *Erwinia sp*. D12 cells: Culture medium optimization and cells immobilization in alginate, **Biochemical Engineering Journal**, 29; 270-277, 2006.

KAWAI, A., KAYANO, M., FUNADA, T., HIRANO, J., **Japanese Patent Kokai** 63-126, 493, 1988.

KAWAI, K.; YOSHIKAWA, H.; MURAYAMA, Y.; OKUDA, Y.; YAMASHITA, K., Usefulness of palatinose as a caloric sweetener for diabetics patients, **Hormone and Metabolic Research**, 21, 338-340, 1989.

KAWASE, J.E.; SONOMOTO, K.; TANAKA, A., Inspection of an acyl-enzyme intermediate in a lipase reaction by gas chromatography-mass spectrometry and modeling of the reaction mechanism, **Biocatalysis**, 6: 43-50, 1992.

KAYAHARA, H.; SHIBATA, N.; TADASA, K.; MAEDA, H.; KOTANI, T.; ICHIMOTO, I., Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungical properties, **Agricultural and Biological Chemistry**, 54: 2441-2442, 1990.

KELKAR, D.S.; KUMAR, A.R.; ZINJARDE, S.S., Hydrocarbon emulsification and enhanced crude oil degradation by lauroyl glucose ester, Article in Press, **Bioresource Technology**, xx-xxx, 2006.

KHIRE, J.M.; KHAN, M.I.; Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 1. Importance and mechanisms of microbial enhanced oil recovery, **Enzyme Microbiology and Technology**, 16, 170, 1994.

KIM, H-S.; JEON, J-W; KIM, S-B.; OH, H-M.; KUON, T-J.; YOON, B-D., Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosyllerythritol lipid, from *Candida Antarctica*, **Biotechnology Letters**, 24, 1637-1641, 2002.

KITAGAWA, M.; CHALERMISRACHAI P.; FAN, H.; TOKIWA, Y**.**, Chemo enzymatic synthesis of biodegradable polymers containing glucobiose branch, **Macromolecular Symposium**, 144, 247, 1999.

KITAGAWA, M.; FAN,H.; KURANE, R.; TOKIWA, Y.; RAKU,T.; Preparation of vinyl thymidine ester catalyzed by protease and its chemical polymerization, **Biotechnology Letters**, 22, 883, 2000.

KITAGAWA, M.; FAN,H.;RAKU,T.; SHIBATANI, S.; MAEKAWA, Y.; KURANE, R.; TOKIWA, Y. Selective enzymatic preparation of vinyl sugar esters using DMSO as a denaturing co-solvent, **Biotechnology Letters**, 21, 355, 1999.

KITAGAWA, M.; FAN,H.; RAKU, T.; TOKIWA, Y., Chemoenzymatic syntheses of nucleoside-branched poly(vinyl alcohol), **Polymers Preprints**, 41, 1818, 2000.

KITAGAWA, M.; TOKIWA, Y., Enzymatic synthesis of polymerizable sugar ester and its chemical polymerization, **Carbohydrate Letters**, 2, 343, 1997.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T., Functions and Potencial Applications of Glycolipid Biosurfactants – from Energy-Saving Materials to Gene Delivery Carriers, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 94, 3, 187-201, 2002.

KLEMM, D.; EINFELDT, L. Structure Design of Polysacchaides: Novel Concepts, Selective Synthesis, High Value Applications, **Macromolecular Symposia**, 163, 1, 35-48, 2001.

KLOET, J.V.; SCHRAMM, L.L.; SHELFANTOOK, B., Application of the hydrophile-lipophyle balance concept to the classification of demulsifiers and bituminous froth and its components, **Fuel Processing Technology**, 75, 9-26, 2002.

KOBAYASHI, K.; KAKISHITA, N.; OKADA, M., AKAIKE, T. and USUI, T. Chemoenzymatic Synthesis of a glycopolimer carring clustered-N-acetil-β-lactosamine moieties, **Journal of Carbohydrate Chemistry**, 13, 753, 1994.

KONISHI, N.; TORII, Y.; YAMAMOTO, T.; MIYAGI, A.; OHATA, H.; FUKUI, K.; HANAMOTO, S.; KOMATSU, H.; KODAMA, T.; KATAYAMA, E., **Journal of Biochemistry**, 126, 287-295, 1999.

KOSARIC, N., Biosurfactants, **Biotechnology**, 2nd ed., 1996, p.670.

KOSARIC, N.; CAINRS, W.L.; GRAY, N.C.C.; STACHEY, D.; WOOD,J.; The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production, **Journal of the American Oil Chemist's Society,** 61(11), 1735, 1984.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C.; Biosurfactants and Biotechnology, **Surfactants Science Series**, ed. Marcel Decker, N.Y., 11, 1987.

KOHYA, H., ISHII, F, TAKANO, S., KATORI, T., EBINA, T., ISHIDA, N. Antitumor effect of a synthetic cord factor, 6,6'-di-O-decanoyl-alpha,alpha-trehalose (SS554), in mice, **Japanese Journal of Cancer Research**, 77(6), 602, 1986.

KUMIKO, U. ; MASANORI, F.; HIROMI, N.; YURIKO, K.; TOSHIYUKI, S.; SEIGO, I., Effect of oxyethylene moiety in polyoxyethylene sorbitan esters on the pharmacokinetics of menatetrenone incorporated in O/W lipid emulsions prepared with polyoxyethylene sorbitan esters and soybean oil in rats, **Journal of Pharmacy and Pharmacology,** 54, 10, 1357-1363, 2002.

LADHE, A.R.; RADOMYSELSKI, A.; BHATTACHAVYA D. Ethoxylated nonionic surfactants in hydrophobic solvent: interaction with aqueous and membrane-immobilized poly(acrylic acid), **Langmuir**, 22(2):615-21, 2006.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D., Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 45, 89-121, 2000.

LEE, M.; KIM, M.K.; SINGLETON, I.; GOODFELLOW, M.; LEE, S.T.; Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikomurensis* EN3 in the presence of the micolic acid, **Journal of Applied Microbiology**, 100, 325-333, 2006.

LICHTENTHALER, F. W.; PETERS, S., Carbohydrates as green raw materials for the chemical industry, **Comptes Rendus Chimie**, 7, 65-90, 2004.

LIMA, H.R.P. Fundamentos da perfuração, **Petrobrás/Senec/Cen-Nor**, Salvador, 1992.

LIN, S.C.; Biosurfactants: recent advances, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 66, 109, 1996.

LINA, B.A.R., SMITS, D.H.; BERENDSEN, W., Embriotoxicology/teratogeniticy study with isomaltulose (palatinose) in rats, **Food and Chemical Toxicology**, 35, 309-314, 1997.

LINA, B.A.R.; JONKER, D.; KOZIANOWSKI, G.; Isomaltulose (Palatinose®): a review of biological and toxicological studies, **Food and Chemical Toxicology**, 40, 1375-1381, 2002.

LIU, X.; DORDICK, J.S., Sugar Acrylate-Based Polymers as Chiral Molecularly Impritable Hydrogels, **Journal of Polymers Science: Part A: Polymer Chemistry**, 37, 1665-1671, 1999.

LORTIE, R., Enzyme Catalyzed Esterification, **Biotechnology Advances**, 15, 1, 1997.

LU, D-s.; WU, Q.; LIN, X-f.; Chemoenzymatic synthesis of biodegradable poly (1'-*O*-vinyladipoil-sucrose), **Chinese Journal of Polymer Science**, 20, 6, 579-585, 2002.

LUCAS, Z.; MACGREGOR, C. in press. Characterization and source of oil contamination on the Beaches and scabird corpses, Sable Island, Nova Scotia, **Marine Pollution Bulletin**, 2006.

MACINDOE, W.M.; WILLIAMS, A.; KHAN, R., Structure of the O-deacetylated glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* Cap70 as determined by 2D NMR spectroscopy, **Carbohydrate Research**, 283, 17, 1996.

MALLON, E.; POWELL, S.M., Sorbitan sesquioleate - a potential allergen in leg ulcer patients, **Contact Dermatitis**, 30, 3, 180, 1994.

MARTINELLE, M.; HULK, K.; Kinetic of acyl transfer reactions in organic media catalyzed by Candida Antarctica lipase B, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1251, 191-197, 1995.

Material Safety Data Sheet. Disponível em: http://www.msdssearch.com/DBLinksN.htm. Acessado em 18, dez., 2006.

MEDINA , A.; CERDAN, E.; GIMENEZ, G.; PAEZ, C.; GONZALEZ, I.; GRIMA, M., Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils, **Journal of Biotechnology**, 70, 1, 379-391, 1999.

MILLER, R.M., Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils, **Environmental Health Perspective**, 103, 59, 1995.

MORRISON, R.; BOYD, R., **QUÍMICA ORGÂNICA**, Fundação Calouste Gulbenkian, 7ª Edição, 1322, 1973.

NAGAI, Y.; SUGITANI, T.; TSUYUKI, K., Characterization of α-glucosyltransferase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45, **Bioscience, Bioetechnology and Biochemistry**, 58; 1789-1793, 1994.

NARAYAN, V.S.; KLIBANOV, A.M., Are water immiscibility and apolarity of the solvente relevant to enzyme efficiency?, **Biotechnology and Bioengineering**, 41, 390-393, 1993.

NINESS, K.R.; Inulin and oligofructose what are they?, **The Journal of Nutrition**, 129S (7S), 1402S-1406S, 1999.

NIRAULA, B.B.; CHUM,T.K.; OTHMAN, H.; MISRAN, M., Dinamic-interfacial properties of dodecyl-β-D-maltoside and dodecyl-β-D-fructofuranosyl-α-D-glucopyranoside at dodecane/ water interface, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 248, 157-166, 2004.

NITSCHKE, M; PASTORE, G. M., Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações, **Química Nova**, 25, 5**,** 772-776, 2002.

OGINO, K., Research and development of novel surfactants, **Journal Japanese of Oil Chemists' Society**, 45: 921-932, 1996.

OHATA, K.; KAMATA, K., **Japanese Patent Kokai***,* 61-205449, 1986.

OKADA, M.; Molecular design and syntheses of glycopolymers, **Progress in Polymer Science**, 26, 67-104, 2001.

PARK, H.G.; CHANG, H.N.; DORDICK, J.S. Chemo enzymatic Synthesis of Sucrose-Containing Aromatic Polymers, **Biotechnology and Bioengineering**, 72, 5, 541-547, 2001.

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

PARK, O.J.; KIM D. Y.; DORDICK, J. S., Enzyme-Catalyzed Synthesis of Sugar-Containing Monomers and Linear Polymers, **Biotechnology and Bioengineering**, 70, 2, 209-216, 2000.

PARKER, K.J., **Encyclopedia of Chemical Technology**, 3rd ed, Grayson, M., ed; John Wiley & Sons: New York, 21; 1981.

PATEL, M.N.; GOPINATHAN, K.P.; Lysozyme-Sensitive Bioemulsifier for Immiscible Organophosphorus Pesticides, **Applied and Environmental Microbioly**, 52, 1224, 1986.

PES, M.A.; ARAMAKI, K.; NAKAMURA, N.; KUNIEDA, H., Temperature-Insensitive Microemulsions in a Sucrose Monoalkanoate System, **Journal of Colloid Interface Science**, 178, 666, 1996.

PETROVIC, M; BARCELÓ, D., Analysis of ethoxylated nonionic surfactants and their metabolites by liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry, **Journal of Mass Spectrometry**, 36, 11, 1173 – 1185, 2001.

PIAO, J.; KISHI, S.; ADACHI, S.; Surface tension of aqueous solution of 1-*O*-moacyl sugar alcohols, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 277, 15-19, 2006.

PLOU, J. F.; CRUCES, M., A.; E.; BERNABÉ, M.; BALLESTEROS, A., Enzymatic synyhesis of partially acylated sucroses, **Annlas of the New York Academy of Sciences**, 750, 332-337, 1995.

PLOU, J. F.; CRUCES, M., A.; FERRER, M.; FUENTES, G.; PASTOR, E.; BERNABÉ, M.; CHRISTENSEN, M.; COMELLES, F.; PARRA, J., L.; BALLESTEROS, A., Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent, **Journal of Biotechnology**, 96, 55-66, 2002

POLMAN, J.K.; MILLER, K.S.; STONER, D.I.; BRACKENRIDG, C.R., **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 61,11, 1994.

RAKU, T.; KITAGAWA, M.; SHIMAKAWA, H.; TOKIWA, Y., Enzymatic synthesis of hydrophilic undecilenic acid sugar esters and their biodegradability, **Biotechnology Letters**, 161: 161-166, 2003.

RAKU, T.; TOKIWA, Y., Regioselective synthesis of kojic acid esters by *Bacillus subtilis* protease, **Biotechnology Letters**, 25(12), 969-974, 2003.

REDDY, C.S.K., GHAI, R., KALIA, V.C., Polyhydroxyalkanoates: an overview, **Bioresource Technology**, 87, 137-146, 2003.

REHM, H.J.; REED, G., Biosurfactants, **Biotecnology**, 2nd ed.v.6, p.660, 1996.

RICH, J.O.; BEDELL, B.A.; DORDICK, J.S.; Controlling enzyme-catalyzed regioselectivity in sugar ester synthesis, **Biotechnology and Bioengineering**, 45, 426-434, 1995.

RIVA, S.; CHOPINEAU,J.; KICOOM,A.P.G.; KLIBANOV, A.M., Protease-catalyzed regioselective esterification of sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamide, **Journal American Chemical Society**, 110, 584-588, 1988).

ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R., The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products, **The Journal of Nutrition**., 128, 11-19, 1998.

ROCHA, J.S.M., Boletim de Biotecnologia, **Sociedade Portuguesa de Biotecnologia**, Portugal, n.64, 62, 1999.

ROSS, S.; MORRISON, I.D., The HLB Scale, **Colloidal Systems and Interfaces**, Ed. John Wiley & Sons, N.Y., 274, 1988.

ROY, R.; BAEK, M.-G.; Glycodendrimers: novel glycotope isosteres unmasking sugar coding. Case study with T-antigen markers from breast cancer MUC1 glycoprotein, **Reviews in Molecular Biotechnology**, 90, 291-309, 2002.

RYU, K.; DORDICK, J.S.; Free energy relationship of substrate and solvent hydrophobycities with enzymatic catalysis in organic media, **Journal of the American Chemical Society**, 111, 8026-8027, 1989.

SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA JR,N.; FREIRE, D.M.G., Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 19, 02, 159-166, 2002.

SARNEY, D.B.; FREGAPANE, G.; VULFSON, E.N.; Lipase-catalysed synthesis of lysophospholipids in a continuous bioreactor, **Journal of the America Oil Chemists' Society,** 71(1), 93-96, 1994.

SCHURCH, S.; GEISER, M.; GEHR, P., **Biosurfactants Production, Properties, Aplications**, (Kosarich N. Ed.), 187, New York: Marcel Dekker, 1993.

SEVERO, F.R. Safra de cana 2006/2007 crescerá 10,3%, ultrapassando 475 milhões de toneladas. Disponível em: <http://www.alimentoseguro.com.br/noticias2884.asp?tipo_tabela=noticias&id=2884>Acesso em 05 jan.2007.

SHIBATANI, S.; KITAGAWA, M.; TOKIWA, Y., Enzymatic synthesis of vinyl sugar ester in dimethylformamide, **Biotechnology Letters**, 19, 511, 1997.

SHIKATA, A.; YAMASHITA, A., **Japanese Patent Kokai**, 61-205449, 1986.

SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, Y., Method of producing an immobilized alpha-glycosyltransferase useful in the production of palatinose from sucrose, **UK Patent**; 2,082,591; 1982.

SHKLAIR, I. L.; KEENE, H. J.; SIMONSON, L. G. Distribution and frequency of *S. mutans* in caries-active individuals, **Journal of Dental Research**, 51, 3, 882, May 1972.

SIHORKAR, V.; VYAS, S.P.; Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization, **Journal of Pharmaceutical Science**, 4, 138-158, 2001.

SCHMIDT, R.D.; VERGER, R., Lipases: interfacial enzymes with attractive applications, **Angewandte Chemie International Edition**, 37, 1602-1633, 1998.

SÖRDERBERG, I.; DRUMMOND, C.J.; FURLONG, D.N.; GODKIN, S.; MATTHEWS, B., **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 277, 15-19, 1995.

TANFORD, C. **The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes**, second edition, Wiley, New York, 1980.

THE POLLUTION PREVENTION ACT, 42, **U.S.C**., 1990, §§13101-13109.

THÉVENET, S.; WERNICKE, A.; DESCOTES, G.; BOUCHU, A.; QUENEAU, Y., Esterification of unprotected sucrose with acid chlorides in aqueous medium: kinetic reactivity versus acyl-or alkyloxycarbonyl-group migrations, **Carbohydrate Research**, 318, 52-66, 1999.

THERISOD, M.; KLIBANOV, A. M., Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine, **Journal of the American Chemical Society**, 108, 5638-5640, 1986.

THERISOD, M.; KLIBANOV, A. M., Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugars catalyzed by lipases in organic solvents, **Journal of the American Chemical Society**, 109, 3977-3981, 1987.

TIMASHEFF, S.N., The control of protein stability and associations by weak interactions with water: how do solvents affect these processes?, **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, 22, 67-97, 1993.

TOKIWA Y.; Kitagawa, M., Chemo-enzymatic synthesis of polymer containing sugar branches, **Biodegradable Plastics Using Tropical Farm Products**-AIST-Tsukuba-Japan, 61-74, 1997.

TOKIWA, Y ; KITAGAWA, M.; FAN,H.;RAKU,T.; HIRARI, Y.; SHIBATANI, S.; KURANE, R., Synthesis of vinyl arabinose ester catalyzed by protease from *Streptomyces sp*., **Biotechnology Techniques**, 13, 173, 1999.

TOKIWA, Y ; KITAGAWA, M.; KURANE, R., Preparation of polymeric biosurfactant containing sugar and fatty acid esters, **Clean Product and Processes**, 2, 108-111, 2000.

TOKIWA, Y. ; RAKU, T.; KITAGAWA, M.; SHIMAKAWA, H., Enzymatic Synthesis of Trehalose esters Having Lipophilicity, **Journal of Biotechnology**, 100, 203-208, 2003.

TOKIWA, Y.; KITAGAWA, M. Chemoenzimatic Synthesis of Water-Soluble Sugar-Branched poly (Vinyl Alcohol), **Science and Technology of Polymers and Advanced Materials**, P.N. Prasad Ed., Plenum Press, N.Y., 447-491, 1998.

TOKIWA, Y.; KITAGAWA, M., Polymerization of vinyl sugar ester using ascorbic acid and hydrogen peroxide as a redox reagent, **Carbohydrate Polymers**, 218-223, 2006.

UCHINO, K.; NAGAWA, M.; TONOSAKI, Y.; ODA, M.; FUKUCHI, A.; Kojic acid as an anti-speck agent, **Agricultutal Biological Chemistry**, 52: 2609-2610; 1988.

VALIVETY, R.H.; HALLING, P.J.; MACRAE, A.R., Water as a competitive inhibitor of lipase catalyzed esterification in organic media, **Biotechnology Letters**, 15, 1133-1138,1993.

VALIVETY, R.H.; JOHNSTON, G.A.; SUCKLING, C.J.; HALLING, P.J., Solvent effects on biocatalysis in organic systems: equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification, **Biotechnology and Bioengineering**, 38, 1137-1143, 1991.

VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T.; Applications of microbial surfactants, **Biotechnoly Advances**, 9, 241, 1991.

VOLKIN, D.B.; STAUBI, A.; LANGER, R.; KLIBANOV, A.M., Enzyme thermoinactivation in anhydrous organic solvent, **Biotechnology and Bioengineering**, 44, 549-556, 1991.

WANG, Y.F.; LALONDE, J.J.; MOMONGAN, M.; BERGBREITER, D.E.; WONG, C.H.; Lipase catalized irreversible transesterification using enol esters as acylation reagents: preparative enantio- and regioselective syntheses of alcohols, glycerol derivatives, sugars and organometallics, **Journal of the American Chemical Society**, 110, 7200-7205, 1988.

WASHBURN, E.W., The Dynamics of Capillary Flow, **Physics Review**, 17(3), 273-282, 1921.

WATANABE, Y.; ADACHI, S.; T. FUJII; MATSUNO, R., Surface activity of 6-*O*-hexanoyl, octanoyl, decanoyl and dodecanoyl ascorbates, **Japan Journal of Food Engineering**, 2, 73, 2001.

WATANABE, Y.; MIYAWAKI, Y.; ADACHI, S.; MATSUNO, R., Continuous Production of Acyl Mannoses by Immobilized Lipase Using a Packed-Bed Reactor and Their Surfactant Properties, **Biochemical Engineering Journal**, 8, 213, 2001.

WEBER, H.K.; STECHER, H.; FABER, K.; Sensitivity of microbial lipases to acethaldeyde formed by acyl-transfer reactions from vinyl esters, **Biotechnology Letters**, 17, 803-808, 1995.

WENGEL, J.; LAU,J.; PEDERSEN, E.B.; NIELSEN, C.M. Synthesis of 3'-azido-3'-deosythymidine and its stereoisomers, **Journal of Organic Chemistry**, 56, 3591-3594, 1988.

WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S.; STROUMTSOS, L.Y.; FERTIG, M.N.; Kojic acid, In: **The Merck Index 9th edn**. USA: Merck and Co. Inc., 697, 1976.

WONG & G.M. Enzymes in SyntheticOrganic Chemistry, C-H*.,* **Whitesides Elsevier Science LTDA**, Oxford, UK, 1994.

WU, Q.; FENG, J.Y.; FENG,C.G.; LU, D.S.; LIN,X.F.; Enzymatic regiolective synthesis of vinyl lactose ester and its chemical polymerization, **Chinese Chemical Letters**, 13, 5, 416-419, 2002.

WULFF, G.; SCHMIDT, H.; ZHU, L.M., Generating hydrophilic surfaces on standard polymers after copolymerization with low amounts of protected vinyl sugars, **Macromolecule Chemistry Physics**, 200, p. 774-782, 1999.

XU, Z.F.; AFFLECK, R.; WANGIKAR, P.; SUZAWA, V.; DORDICK, J.S.; CLARCK, D.S., Transition state stabilization of *subtilisis* in organic media, **Biotechnology and Bioengineering**, 43, 515-520, 1994.

YAMANE, T.; Enzyme technology for the lipids industry: an engineering point of view, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 64, 1657-1662, 1987.

YAMAOKA, T.; TABATA, Y.; IKADA, Y.; Comparison of body distribution of poly(vinyl alcohol) with other water-soluble polymers after intravenous administration, **Journal of pharmacy and pharmacology**, 47, p. 479-486, 1995.

YAN, Y, Enzymatic Production of Sugar Fatty Acid Esters, **PhD. Thesis**, Institut für Technische der Biochemie de Universität Stuttgart, 1-93, 2001.

YOSHIMOTO,K.;ITANI, Y.; TSUDA,Y. ^{13}C-Nucleous Magnaetic Resonance (NMR) spectra of O-acylglucoses. Aditivity of shift parameters and its application to structure elucidations, **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 28, 2065, 1980.

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

ZINJARDE, S.S.; SATIVEL, C.; LACHKE, A.H.; PANT, A., Isolation of na emulsifier from Yarrowia lipolytica NCIM 3589, using a modified mini isoeletric focusing unit., **Letters in Applied Microbiology**, 24, 117-121, 1997.

ZUNFT, H.J.; RAGOTZKY, K., Strategien zur fettsubstitution in lebensmitteln, **Fett/Lipid**, 99: 204-213, 1997.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo