

GABRIELA NAYANA PEREIRA

**SÍNTESE DE MONOESTEARATO DE  
ETILENOGLICOL POR ESTERIFICAÇÃO  
ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Coorientadora: Prof. Dr.<sup>a</sup> Mara Cristina Picoli Zenevitz

**FLORIANÓPOLIS, 2018.**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Gabriela Nayana  
SÍNTESE DE MONOESTEARATO DE ETILENOGLICOL POR  
ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE  
SOLVENTE / Gabriela Nayana Pereira ; orientador,  
JOSÉ VLADIMIR DE OLIVEIRA, coorientador, MARA  
CRISTINA PICOLI ZENEVICZ, 2018.  
60 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós  
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,  
2018.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. BIOTECNOLOGIA. 3.  
ESTERIFICAÇÃO. 4. ENZIMA. 5. ÉSTER. I. DE OLIVEIRA,  
JOSÉ VLADIMIR. II. ZENEVICZ, MARA CRISTINA PICOLI.  
III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.  
IV. Título.

**“SÍNTESE DE MONOESTEARATO DE  
ETILENOGLICOL POR ESTERIFICAÇÃO  
ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE”**

Por

**Gabriela Nayana Pereira**


Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

  
Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira  
**Orientador**

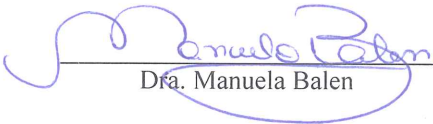
  
Profa. Dra. Mara Cristina Picoli Zenevitz  
**Coorientadora**

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi  
**Coordenador**

**Banca Examinadora:**

  
Prof. Dr. José Vladimir de  
Oliveira

  
Profa. Dra. Helen Treichel

  
Dra. Manuela Balen

**Florianópolis, 27 de fevereiro de 2018.**

“Dedico este trabalho a quem sempre me apoiou em todas as decisões da vida, meus pais José Roberto e Jussara”.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força e persistência nesta etapa da minha vida.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais José Roberto e Jussara, por sempre me apoiarem, sendo eles um exemplo e a base para cada conquista que tive. Também aos meus avôs Antônio e Dimas *in*

*memorian*.

Ao meu orientador José Vladimir de Oliveira, pelo apoio e orientação.

À minha coorientadora Mara Cristina Picoli Zenevitz, pela confiança e ajuda em todos os momentos.

Aos meus coorientadores do coração Lindomar Lerin e Professora Débora de Oliveira.

À banca e ao Programa Institucional de Bolsas - CAPES.

A todos os meus amigos, em especial Bianca D., Raquel, Monique, Bianca L., Felipe, Nathalia, Daniela, Jacqueline, Jefferson, Juliana, Gabriela, Maria Julia, os quais foram minha família durante o mestrado.

A Ana Valério, essa pessoa incrível que foi colocada em meu caminho logo no início do mestrado, me ajudando a perceber o potencial que tenho dentro de mim mesma.

A todo o grupo do ENGEPIO.

A todos que de alguma maneira estiveram presentes em minha vida neste momento.



## RESUMO

Neste trabalho, avaliou-se a produção de monoestearato de etilenoglicol, um éster emoliente, produzido a partir da reação de esterificação enzimática em sistema livre de solvente. O principal propósito da utilização de catalisadores enzimáticos é de substituir os métodos convencionais por técnicas com menor impacto ambiental. Foram realizados testes a fim de avaliar a melhor agitação para o meio reacional, além da utilização de diferentes lipases comerciais imobilizadas. Após, seguiu-se o estudo a fim de verificar temperatura ótima, concentração de enzima ideal para o sistema, reutilização do biocatalisador e um estudo prévio de ampliação de escala. Primeiramente, testaram-se diferentes agitações de 600 e 1000 rpm. Nesta etapa, utilizou-se uma concentração de 2% de duas diferentes lipases imobilizadas (Novozym 435<sup>®</sup> e NS 88011) obtendo como melhores resultados 600 rpm e a enzima Novozym 435<sup>®</sup>, seguiu-se o estudo fixando esta agitação e usando esta enzima. A etapa seguinte foi a avaliação de diferentes temperaturas, sendo testadas 65, 70, 75 e 80 °C, obtendo-se a máxima conversão de 99,01% em 75 °C. Após, fixada a temperatura, testaram-se diferentes concentrações da enzima Novozym 435. Com concentrações variando de 0,1 a 1%, as conversões variaram de 90,1% a 99,01%, respectivamente em 48 horas de reação, sendo resultados bastante promissores, pois com pequenas quantidades da enzima, as conversões foram significantes. A partir dos resultados, partiu-se para o reuso do biocatalisador, onde foram avaliados até 5 ciclos de reuso, obtendo-se conversões de 70% no quarto ciclo. Por fim, em uma avaliação prévia de ampliação de escala, equivalente a aproximadamente 9 vezes a quantidade inicial de reagentes, obteve-se conversão de 99%, comprovando a eficácia do processo testado para uma possível aplicação em nível industrial.

**Palavras-chave:** Monoestearato de etilenoglicol, Novozym 435<sup>®</sup>, Éster emoliente.





## ABSTRACT

In this work, we evaluated the production of ethylene glycol monostearate, an emollient ester, produced from the enzymatic esterification reaction in a solvent-free system. The main purpose of the use of enzymatic catalysts is to replace conventional methods with less environmental impact techniques. Tests were carried out to evaluate the best agitation for the reaction medium, besides the use of different immobilized commercial lipases. Afterwards, the study was followed in order to verify optimum temperature, ideal enzyme concentration for the system, reuse of the biocatalyst and a previous scale-up study. First, different shafts of 600 and 1000 rpm were tested. In this step, a concentration of 2% of two different immobilized lipases (Novozym 435® and NS 88011) was used obtaining the best results 600 rpm and Novozym 435® enzyme, the study was followed by fixing this agitation and using this enzyme. The next step was the evaluation of different temperatures, being tested 65, 70, 75 and 80 °C, obtaining the maximum conversion of 99.01% at 75 °C. After the temperature was set, different concentrations of Novozym 435 enzyme were tested. At concentrations ranging from 0.1 to 1%, the conversions ranged from 90.1% to 99.01%, respectively, in 48 hours of reaction, with results very promising, because with small amounts of the enzyme, the conversions were significant. From the results, the biocatalyst was reused, where up to 5 reuse cycles were evaluated, obtaining conversions of 70% in the fourth cycle. Finally, in a previous scale-up evaluation, equivalent to approximately 9 times the initial amount of reagents, a conversion of 99% was obtained, proving the efficacy of the process tested for a possible industrial application.

**Key words:** Ethylene glycol monostearate, Novozym 435®, Emollient ester.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação de esterificação do ácido carboxílico. ....	25
Figura 2 - Fluxograma geral do processo de síntese de monoestearato de etilenoglicol.....	31
Figura 3 - Aparato experimental utilizado para a síntese de monoestearato de etilenoglicol em sistema livre de solvente, onde (1) reatores encamisados, (2) agitadores mecânicos e (3) banho termostático.....	33
Figura 4 - Reator encamisado com agitação mecânica, acoplado ao banho termostático. ....	34
Figura 5: Reator de vidro encamisado com agitação mecânica e banho termostático.....	36
Figura 6 - Conversões em relação às lipases comerciais Novozym 435 e NS 88011 em duas diferentes agitações (600 e 1000 rpm), sendo fixados: Temperatura: 75 °C; Razão Molar entre os substratos: 1:1; Concentração de enzima: 2% (m/m); tempo: 6 horas. ....	41
Figura 7 - Conversão em monoestearato de etilenoglicol após 6 horas para diferentes enzimas e concentrações, nas condições: Temperatura: 75 °C; Agitação: 600 rpm; Razão Molar: 1:1; Tempo: 6 horas.....	42
Figura 8 - Conversão em monoestearato de etilenoglicol em função do tempo nas diferentes temperaturas (65, 70, 75 e 80 °C), com as condições: Agitação: 600 rpm; Razão Molar: 1:1; Concentração de Novozym 435: 1% (m/m).....	43
Figura 9 - Conversão em monoestearato de etilenoglicol em função do tempo com diferentes concentrações de enzima (0,1, 0,3, 0,5, 0,7 e 1% (m/m)) nas condições: Temperatura: 75 °C; Razão molar: 1:1; Agitação: .....	44
Figura 10 - Gráfico da conversão em monoestearato de etilenoglicol em função do tempo durante o reuso enzimático. Condições: Temperatura 75 °C; Razão Molar: 1:1; Concentração de enzima: 1% (m/m). ....	45
Figura 11 - Conversão em função do tempo em escala ampliada. Condições: Temperatura 75 °C; Razão Molar: 1:1; Concentração de enzima: 1% (m/m).....	46



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores obtidos para as análises de caracterização do produto monoestearato de etilenoglicol.....	47
Tabela 2 - Valores $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ e $\Delta E$ para amostra do produto monoestearato de etilenoglicol nas condições: Temperatura 75 °C; Razão Molar: 1:1; Agitação: 600 rpm; Concentração de Enzima: 1%..	48



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	OBJETIVOS.....	21
	2.1. OBJETIVO GERAL .....	21
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
	3.1. COSMÉTICOS VERDES.....	23
	3.2. ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.....	24
	3.3. ENZIMAS.....	25
	3.3.1. LIPASES.....	26
	3.4. ÁCIDOS GRAXOS .....	28
	3.5. ÁCIDO ESTEÁRICO .....	28
	3.6. DIESTEARATO DE ETILENOGLICOL .....	29
	3.7. MONOESTEARATO DE ETILENOGLICOL .....	29
	3.8. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE.....	29
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
	4.1. FLUXOGRAMA DO PROCESSO.....	31
	4.2. MATERIAIS.....	31
	4.2.1. Enzimas.....	31
	4.2.2. Reagentes .....	32
	4.3. APARATO EXPERIMENTAL .....	33
	4.3.1. Síntese enzimática de monoestearato de etilenoglicol em reator encamisado com agitação mecânica.....	33
	4.3.2. Testes iniciais.....	34
	4.3.3. Avaliação Cinética .....	34
	4.3.3.1 Efeito de Temperatura.....	34
	4.3.3.2. Efeito da Concentração de Enzima .....	35
	4.3.4. Estudo de sucessivos ciclos de uso da lipase para síntese de monoestearato de etilenoglicol.....	35

4.3.5. Ampliação de escala .....	35
4.3.6. Medida do índice de acidez .....	36
4.3.7. Determinação da conversão da reação.....	36
4.3.8. Caracterização do Monoestearato de Etilenoglicol obtido .....	37
4.3.8.1. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE IODO PELO MÉTODO DE WIJS .....	37
4.3.8.2. Determinação da Densidade 20 °C .....	37
4.3.8.3. Índice de Saponificação .....	38
4.3.8.4. Índice de Hidroxila .....	38
4.3.8.5. Análise de cor .....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1. TESTES PRELIMINARES .....	41
5.2. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA .....	43
5.3. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA.....	44
5.4. REUSO DO BIOCATALISADOR.....	45
5.5. AMPLIAÇÃO DE ESCALA.....	46
5.6. ANÁLISES PARA CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FINAL .....	47
5.6.1. Análise de cor .....	48
6. CONCLUSÕES.....	51
7. REFERENCIAS.....	53



## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

# PRODUÇÃO DE MONOESTEARATO DE ETILENOGLICOL ATRAVÉS DE ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Por quê?

- ✓ A síntese enzimática é uma alternativa à síntese química, além de que atualmente tem-se pensado em lançamentos de produtos verdes, que satisfaçam a necessidade humana sem agredir o meio ambiente;
- ✓ O uso de cosméticos no Brasil teve aumento de 10% nos últimos quinze anos;
- ✓ Ésteres emolientes provenientes de ácidos graxos possuem vantagens da não toxicidade, biodegradabilidade, boa solubilidade em gordura.

Quem já fez?

- ✓ Não foram encontrados trabalhos na literatura sobre o tema proposto.

Hipóteses ?

- ✓ A produção de Monoestearato de Etilenoglicol via esterificação enzimática será eficiente?
- ✓ Qual melhor biocatalisador a ser utilizado?
- ✓ É possível a via catalítica em nível industrial para o produto em questão?

Como fazer?

- ✓ Reação de Esterificação em processo batelada;
- ✓ Quantificação da conversão da reação através do índice de acidez;
- ✓ Reutilizar o catalisador enzimático.

Respostas ?

- ✓ Condições experimentais que conduzam ao menor índice de acidez;
- ✓ Como recuperar o catalisador utilizado na síntese enzimática;
- ✓ Obter maiores conversões;
- ✓ Ampliar a escala;
- ✓ Avaliar a qualidade do produto final.



## 1. INTRODUÇÃO

O uso de cosméticos tem crescido a cada ano no Brasil e no mundo, prova disso foi uma expansão de 10% nos últimos quinze anos no país, tornando-o terceiro lugar no *ranking* mundial, estimando, cerca de R\$ 60 milhões no consumo de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos em 2010 (EURIMONITOR, 2016). Simultâneo ao crescimento do consumo, de uma maneira geral, ocorre a geração de desequilíbrios de ordem tanto econômica como social e ambiental, sendo o impacto ambiental de extrema discussão na atualidade, fazendo surgir uma enorme necessidade de transição para um futuro ambientalmente amigável (RASMUSSEN, 2011).

Baseado nisso, ocorre a busca por novos estudos relacionados a produtos renováveis, que atendam à necessidade humana sem agredir o meio ambiente. Segundo Ottman (1994), um produto ecológico ou verde deve ser fabricado com a mínima quantidade de matérias-primas, sendo estas recicláveis ou renováveis, deve ser fabricado com a máxima eficiência energética e mínima utilização de água, além de ser biodegradável. Outras definições para o produto ser considerado "verde" é possuir maior desempenho ambiental quando comparado aos tradicionais na paridade de funções. Este desempenho não se limita à fase de produção, mas é ampliado ao ciclo de vida do produto como um todo (FRACCASCIA; GIANNOCCARO; ALBINO, 2018).

Tendo em vista esta transição, opta-se pelo uso da biotecnologia, a qual vem como um aperfeiçoamento de processos já existentes ou até mesmo para a criação de novos produtos como, por exemplo, a produção de fármacos, cosméticos, técnicas de fermentação industrial, controle de pragas e entre outros (FERREIRA; FALEIRO, 2008). Processos alternativos podem ser feitos através da utilização de enzimas nas mais diversas indústrias (química, farmacêutica, de bebidas e alimentos), que já está em crescimento constante (VILLENEUVE, 2007).

Uma possibilidade quando se trata de cosméticos com propriedades emolientes é sua obtenção através de ácidos graxos, os quais estão substituindo os emolientes à base de petróleo devido a preocupações ambientais e a atenção do consumidor frente à maneira através do qual é obtido este produto. A não toxicidade, biodegradabilidade, boa solubilidade em gordura e excelentes propriedades em relação à

interface são as propriedades mais importantes que os fazem serem utilizados em diversas formulações (KHAN; RATHOD, 2015).

Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido visando à obtenção de monoestearato de etilenoglicol, um éster com propriedades emolientes, através da reação de esterificação enzimática em sistema livre de solvente, operando em modo batelada, determinando as melhores condições do processo, bem como avaliando a qualidade do produto obtido, valendo destacar que não foram encontrados trabalhos a respeito do tema proposto na literatura aberta, como por exemplo, Science Direct e Scielo, constituindo, portanto, o primeiro estudo na obtenção deste éster com propriedades emolientes via rota enzimática.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo a produção de monoestearato de etilenoglicol através da reação de esterificação enzimática em sistema livre de solvente, operando em modo batelada.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação de diferentes lipases comerciais livres (CAL B) e imobilizadas (NOVOZYM 435<sup>®</sup> e NS 88011) para a produção de monoestearato de etilenoglicol;
- Avaliação preliminar de diferentes condições operacionais (agitação e concentrações de enzima) para a síntese enzimática de monoestearato de etilenoglicol;
- Análise da cinética baseada na condição avaliada;
- Avaliação do reuso do catalisador enzimático;
- Ampliação de escala para o éster monoestearato de etilenoglicol;
- Caracterização do produto obtido através das análises: índice de acidez, índice de saponificação, índice de iodo, índice de hidroxila, densidade e análise de cor.



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. COSMÉTICOS VERDES

A busca por cosméticos verdes tem sido uma opção por produtos obtidos através de processos mais eficientes e com o menor impacto ambiental possível. Uma das grandes questões, neste sentido, é o uso da biotecnologia, a qual tem surgido como uma excelente alternativa para obtenção de novos produtos.

Com base em pesquisa informal de fabricantes de cosméticos, sabe-se que para ser considerado verde, o processo de fabricação de um produto deve estar livre de solventes orgânicos baseados em petróleo, bem como utilizar matérias-primas renováveis a partir de plantas ou fermentação de micro-organismos e produzir quantidades mínimas de resíduos (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

Segundo a EUROMONITOR INTERNATIONAL, o Brasil é o terceiro maior mercado consumidor do setor cosmético, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China, com 16,5% e 10,3% do consumo mundial, respectivamente, o que leva a acreditar que o setor de higiene pessoal e cosmética cresce cada vez mais, sendo interessante investir em tecnologias para a competição deste setor. Os consumidores ditos “verdes” são um grupo de adeptos que priorizam o consumo de produtos naturais e orgânicos por serem mais seguros e sustentáveis ao meio ambiente (EURIMONITOR, 2016).

Diante disso, a utilização da biotecnologia vem para permitir a manipulação e o controle sobre os processos tradicionais de produção nas mais diversas áreas. O termo biotecnologia é relativamente recente, foi introduzido em 1919, pelo engenheiro húngaro Karl Ereky. Nos dias de hoje este termo envolve a aplicação tecnológica que faz uso de organismos vivos, sistemas ou processos biológicos na pesquisa e desenvolvimento de produtos (SOUZA G; MAGNANI R., 2010).

Um exemplo da utilização de biotecnologia envolve a utilização de enzimas (biocatalisadores) como alternativa para a síntese orgânica convencional. Estes processos permitem que o catalisador, seja recuperado e reutilizado, diminuindo o custo e tornando o processo economicamente viável. Existem algumas vantagens na substituição de métodos convencionais pelo uso de enzimas, como a maior solubilidade do substrato, a especificidade enzimática modificada e reversão das reações hidrolíticas (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

Estudos demonstraram que o uso de biocatalisadores nas indústrias pode permitir redução no consumo energético, obtendo maior

rendimento e obtenção de produtos biodegradáveis (CASTRO et al., 2004).

Para a competição no setor de cosméticos e desenvolvimento de produtos cada vez mais diferenciados, ocorre uma enorme necessidade de investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), capacidade de inovação tecnológica e incorporação de novos insumos e princípios ativos (MOURÃO MIGUEL, LAÍS, 2017).

### 3.2. ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Esterificação é uma reação que consiste na condensação do ácido carboxílico e o álcool, formando éster e água. Esta reação é lenta, quando não é utilizado catalisador, o qual pode ser químico ou biológico. Em caso de uso de biocatalisador, utilizam-se enzimas, para o aumento da velocidade da reação (RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009). Para deslocar a reação para formação do produto desejado e remover a água que é um subproduto da reação de esterificação, várias estratégias são usadas, sendo uma delas a redução de pressão (MILLER et al., 1988).

Os ésteres cosméticos podem ser sintetizados por esterificação ou transesterificação enzimática. Atualmente, a síntese industrial de cosméticos é feita em temperaturas elevadas entre 150-240 °C e utilizando catalisadores ácidos ou de base. Estas condições, além de gerar subprodutos indesejáveis, podem também apresentar dificuldades na separação dos produtos após a reação, necessitando de elevados valores de pressão e temperatura. Já a utilização de enzimas, vem como uma alternativa de tecnologia limpa, a qual é capaz de obter produtos de alta qualidade quando comparado aos catalisadores químicos, em função da alta especificidade das enzimas, formando uma menor quantidade de subprodutos indesejáveis e utilizando temperaturas e pressões mais baixas (BON et al., 1999). Portanto, a utilização de enzimas é uma das melhores alternativas pelo fato de operarem em baixas temperaturas (30-70 °C) e baixas pressões, então resultando em produtos puros, incolores e inodoros (KHAN; RATHOD, 2015), além de sua alta especificidade.

Reações enzimáticas tendem a ter menores custos de tratamento de resíduos, pois as enzimas são biodegradáveis e geralmente são dosados em uma concentração de 0,1 à 5,0% do substrato. A contribuição da enzima para a demanda biológica de oxigênio (DBO) nas águas residuais é também baixa.

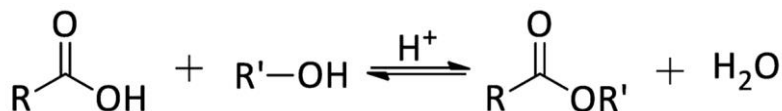
Enzimas tais como lipases, esterases, proteases e celulasas obtidas de animais, plantas e micro-organismos podem ser utilizados



como biocatalisadores. As lipases estão atraindo atualmente muita atenção, sendo uma classe muito importante de biocatalisadores para reações biotecnológicas.

A seguir apresenta-se a Figura 1, esquematizando o processo de esterificação.

Figura 1: Reação de esterificação do ácido carboxílico.



As lipases podem catalisar a síntese de vários ésteres, como os ésteres de ácidos graxos, que apresentam larga aplicação na indústria cosmética e de alimentos (LORTIE, 1993; CHAMOULEON et al., 2001; TSITSIMPIKOU et al., 1997).

### 3.3. ENZIMAS

Enzimas são macromoléculas ativas biologicamente, que atuam de forma a acelerar uma reação bioquímica, convertendo o substrato em produto através da redução da energia de ativação, sem que o equilíbrio da reação seja alterado. O mecanismo celular dos organismos vivos depende das enzimas provenientes de tecidos animais e vegetais, ou cultura de micro-organismos que constitui um dos grandes setores da indústria biotecnológica, utilizando o próprio micro-organismo ou fazendo a extração em meios de cultura de bactérias, fungos entre outros (NEIDLEMAN, 1991; LEHNINGER et al., 2000).

As enzimas são biocatalisadores efetivos devido à alta especificidade do substrato, especificidade do grupo funcional e também especificidade estéreo em meio aquoso. Assim sendo, vários estudos são feitos de maneira a comprovar a alternatividade do método em produzir ésteres usando lipases como catalisadores (ROTTAVA et al., 2010).

Frequentemente quando utilizadas como biocatalisadores, as enzimas livres são instáveis. Em contraste, as enzimas imobilizadas podem ser operacionalmente mais estáveis devido à rigidez da estrutura através da interação direta com veículos apropriados, além de serem facilmente separadas das soluções reacionais, podendo ser reutilizadas (BRADY; JORDAAN, 2009; HILTERHAUS et al., 2008; SHELDON E VAN PELT, 2013).

Enzimas apresentam um alto grau de especificidade que está relacionado ao seu sítio ativo, ou seja, uma cavidade constituída por grupos R de aminoácidos. A estrutura da enzima é afetada por pH e temperatura, ocasionando mudanças conformacionais na estrutura, e a desnaturação proteica (TORRES, 2001).

O mercado global de enzimas abrange os mais diversos setores, sendo estes, alimentícios, têxteis, vinícolas entre outros. No setor alimentício, destaca-se a utilização de enzimas na produção de alimentos fermentados, indústrias de panificação e cervejarias (CARREA; RIVA, 2000; FABER, 1997). São também utilizados nos setores da indústria química, farmacêutica e indústria de cosméticos.

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas aumenta gradativamente, nas áreas de proteínas (SVENDSEN, A et.al, 1997) e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. As razões do enorme potencial biotecnológico dessas enzimas incluem fatos relacionados com sua alta estabilidade em solventes orgânicos, pelo fato de não requerer a presença de cofatores, por possuírem larga especificidade pelo substrato e exibirem alta enantiosseletividade (JAEGER, TIBTECH, 1998).

De uma maneira geral, as enzimas utilizadas para aplicações biocatalíticas representam uma parcela limitada do mercado de enzimas globais, que em 2015 representava U\$ 8,1 bilhões e deverá atingir em torno de U\$ 17,5 bilhões até 2024. O termo enzimas industriais refere-se a ampla gama de aplicações às quais as enzimas podem ser submetidas, como já citado, indústrias de alimentos e bebidas, detergentes, têxteis, cuidados pessoais e cosméticos, entre outros (PELLIS et al., 2017).

### 3.3.1. LIPASES

Dentre os grupos de enzimas existem as lipases, as quais atuam particularmente na interface água-óleo ou vice-versa, fazendo com que ocorra uma ativação interfacial da enzima, hidrolisando triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia longa. São produzidas por diversos organismos vivos, entre eles animais, plantas, fungos e bactérias (OLIVEIRA, 2007).

Lipases são enzimas muito suscetíveis para síntese orgânica, pois aceitam uma ampla gama de substratos não naturais, são estáveis e ativas em solventes orgânicos e estão disponíveis através de diversos micro-organismos. Na produção de cosméticos, as lipases podem funcionar como ingredientes ativos na formulação cosmética e também

como biocatalisadores na síntese de produtos químicos específicos (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

As lipases podem atuar como catalisadores quebrando totalmente a molécula de triglicerídeos, estando sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos e biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Estas dificuldades podem ser superadas pelo uso de enzimas na forma imobilizada, desta maneira sua reutilização é possível e facilitada, reduzindo custos e melhorando a qualidade do produto (VILLENEUVE et al., 2000; DABDOUB et al., 2009; CIPOLATTI et al., 2014).

Entre as lipases mais estudadas estão as produzidas intra ou extracelularmente por micro-organismos, como *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., sendo importante enfatizar a catálise enzimática desenvolvida especialmente pelas lipases comerciais Novozym 435 (lipase B produzida por *Candida antarctica* (CAL B), imobilizada em resina acrílica macroporosa polar de carga positiva), Lipozyme RM IM (produzida por *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina de troca iônica) e Lipozyme TL IM (produzida por *Thermomyces lanuginosus*, imobilizada em resina fenólica granulada) (HERNÁNDEZ-MARTÍN; OTERO, 2008).

A massa molecular das lipases varia entre 20 e 75 kDa, dependendo de sua origem. A faixa ótima de atividade e estabilidade está no pH entre 4 a 9 e temperatura entre 25 a 70 °C, mas sua termoestabilidade varia em função da fonte, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (DE CASTRO et al., 2004; KAPOOR; GUPTA, 2012).

As lipases são utilizadas para diversas aplicações industriais. Na indústria de alimentos, por exemplo, participam como aditivos na síntese de aromas e edulcorantes, na área farmacêutica promove síntese de intermediários de fármacos, além de serem utilizadas para catalisar ampla variedade de reações como, esterificação, transesterificação, alcoólise entre outras (DALLA-VECCHIA, 2004).

A lipase comercial Novozym 435 de *C. antarctica* B, é produzida por fermentação submersa de um micro-organismo geneticamente modificado (*Aspergillus oryzae*) (Novozymes, 2010a). Em seguida, a enzima purificada é imobilizada em resina acrílica macroporosa Lewatit VP OC 1600 desenvolvida pela Bayer AG para a Novozymes (Novozymes, 2010b). Esta lipase é usada na indústria de óleos e gorduras em reações de esterificação e rearranjo de ácidos graxos nos triacilgliceróis e sua temperatura de reação típica é 70 °C (Novozymes 2010b).

### 3.4. ÁCIDOS GRAXOS

Quimicamente, um ácido graxo consiste em uma série de átomos de carbono unidos por ligações simples (saturado) ou duplas (insaturado), possuindo um grupo carboxil e grupo metil. Apresentam diferentes tamanhos de cadeia entre 3 e 24 átomos de carbono. Os ácidos graxos são substâncias livres ou esterificadas que ocorrem na natureza, sendo que a maior parte encontra-se esterificada como glicerol, formando triglicerídeos, os quais são componentes dos óleos e gorduras comestíveis (MANHEZI; BACHION; PEREIRA, 2008).

As propriedades físicas, químicas e nutricionais dos triglicerídeos dependem da natureza, do número de átomos de carbono e posição dos grupos acila em suas moléculas. Os ácidos graxos naturais formam bioésteres também com monoálcoois de alto peso molecular para formar ceras.

A maioria dos ácidos graxos da natureza são monocarboxílicos e possuem número par de carbonos em uma cadeia linear. Baseado no número de ligações duplas, os ácidos graxos são denominados mono, di, tri e poliinsaturados. Os ácidos graxos que ocorrem com frequência na natureza são conhecidos por nomes como: ácido butírico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behênico, no caso dos saturados e oléico, linoléico, linolênico, araquidônico e erúcido no caso dos ácidos graxos insaturados (VIANNI; BRAZ-FILHO, 1995).

### 3.5. ÁCIDO ESTEÁRICO

É um ácido graxo saturado amplamente distribuído na natureza. A maioria dos óleos vegetais oferece esse ácido em proporções variadas entre 1 e 5%. As fontes mais importantes são a banha (10%), gordura do leite (12%), sebo (20%) e manteiga de cacau (35%).

Os ácidos graxos saturados, devido à ausência de ligações duplas nos grupos acila são mais estáveis diante do processo degradativo da rancidez autoxidativa. Ácidos graxos com menos de 10 átomos de carbono são líquidos à temperatura ambiente, já os que possuem mais de 10 átomos são sólidos. Esta diferença entre óleos (líquido) e gorduras (sólido) dá-se através da proporção dos grupos acila saturados e insaturados presentes nos triglicerídeos (VIANNI; BRAZ-FILHO, 1995).

Este ácido tem como principais aplicações os cremes e loções cosméticas, devido sua utilização como agente de consistência e também como formador de emulsão quando neutralizado. Em cremes, o ácido

esteárico livre produz aparência perolesciente e torna a pele suave (PHARMA SPECIAL, 2017).

### 3.6. DIESTEARATO DE ETILENOGLICOL

Da família do monoestearato de etilenoglicol, é um agente perolizante e opacificante para xampus, banho de espuma, sabonetes líquidos, géis para banho e outras preparações espumantes. É compatível com as dietanolamidas e monoetanolamidas de ácido graxo de coco, e tensoativos aniônicos e anfóteros. Os efeitos de opacidade e brilho são muito dependentes das condições do processo e, portanto, o procedimento deve ser seguido rigorosamente. Possui baixo ponto de fusão o que facilita a incorporação nas formulações, além de representar economia de energia (EMFAL, 2015).

Dos ésteres obtidos da reação de ácidos graxos com glicóis, o mono e diestearato de etilenoglicol são responsáveis pela maior opacidade nas emulsões de cremes e loções e também responsáveis pela perolicidade em xampus (PEDRO, R. 2009).

### 3.7. MONOESTEARATO DE ETILENOGLICOL

Monoestearato de etilenoglicol é o éster de ácido esteárico e etilenoglicol, que possui boa compatibilidade com a pele humana. É utilizado como surfactante e para dar aspecto perolizante às substâncias. Também é usado para dar estabilidade em sistemas surfactantes, contribuindo no corpo e espessura das emulsões (MC KINLEY RESOURCES, 2017).

Suas principais propriedades são como perolizante e opacificante para xampus e também como co-emulsionante e estabilizantes de emulsões. As utilizações são em cremes, loções, sistemas detergentes, produtos solares e maquiagem (CRODA, 2017).

É importante destacar, que monoestearato de etilenoglicol tem efeito antiespumante, ou seja, os produtos que levam esta substância em sua composição devem acrescentar compostos que ajam como espumantes, para com isso obter o resultado esperado (CHEMAX, 2017).

### 3.8. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

A demanda atual por produtos naturais é cada vez maior, nos mais diversos setores. Com isso, as indústrias investem muito em pesquisa e desenvolvimento para a elaboração de novos produtos através de técnicas que possam substituir os métodos tradicionais por técnicas renováveis. Isso, devido ao consumidor ter se, tornado cada vez mais

consciente e exigente frente aos produtos que opta comprar. Em relação à indústria de cosméticos não é diferente. Muito têm-se pesquisado na busca pelos ditos “cosméticos verdes”. Pesquisas apontam um aumento de cerca de 10% no consumo de produtos cosméticos no Brasil nos últimos anos, portanto há necessidade de cada vez mais inovação no setor. Os ésteres emolientes utilizados em cosméticos, por exemplo, podem ser produzidos a partir de reações utilizando enzimas, sendo estes catalisadores biológicos, aos quais substituem a utilização de catalisadores de ácidos e base, formando produtos de alta qualidade devido à alta especificidade que as enzimas apresentam, além de produzir menos subprodutos indesejáveis e demandarem temperaturas e pressões de processo menores que os utilizados convencionalmente, atraindo a atenção do consumidor. Outra vantagem na utilização de biocatalisadores é a sua capacidade de reutilização quando se trata de enzimas imobilizadas, sendo aspecto de extrema importância em relação a economia para a indústria, já que o custo das enzimas é considerado alto.

Diante do exposto, na seção da revisão bibliográfica, no que concerne ao estado da arte, fica evidente a importância da realização deste trabalho, apresentando grande potencial para estudos detalhados na área, oportunizando, novas rotas biotecnológicas, sendo importante ressaltar, que até o momento não foram encontrados trabalhos disponíveis na literatura sobre produção do éster monoestearato de etilenoglicol produzido via esterificação enzimática.

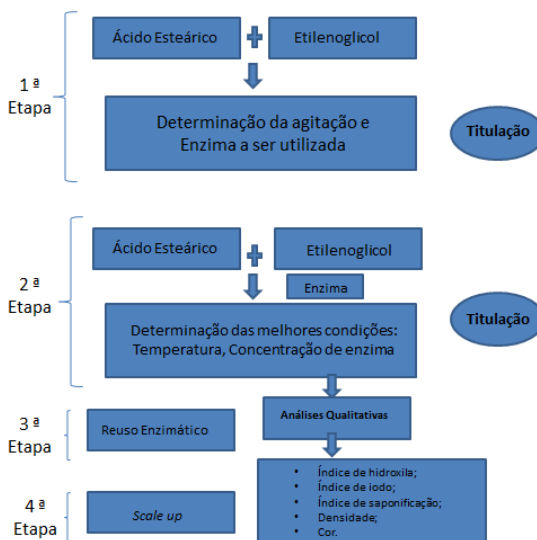
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e métodos empregados para a realização dos experimentos, assim como os procedimentos laboratoriais utilizados. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) pertencente ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### 4.1. FLUXOGRAMA DO PROCESSO

A Figura 2 apresenta um fluxograma geral do processo para a obtenção do éster emoliente monoestearato de etilenoglicol via síntese enzimática.

Figura 2 - Fluxograma geral do processo de síntese de monoestearato de etilenoglicol



## 4.2. MATERIAIS

### 4.2.1. ENZIMAS

*Novozym 435*<sup>®</sup> – lipase produzida a partir de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/Araucária – PR. A enzima atua randomicamente nas 3 posições do triacilglicerol. O produto é constituído por partículas de formato esferoidal, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, e densidade de aproximadamente 430 kg/m<sup>3</sup>. Segundo o fornecedor, a

enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40-70 °C (NOVO NORDISK,1992).

*NS 88011*- lipase de *Candida antarctica* imobilizada em uma resina polimérica hidrofóbica (NOVOZYMES);

*CAL B* – Lipase do tipo B de *Candida antarctica* (CALB) referenciada como Lipozyme CALB L, obtida pela Novozymes.

Todas as enzimas foram gentilmente cedidas pela empresa Novozymes (Brasil/Araucária – PR).

#### 4.2.2. REAGENTES

Para as reações de esterificação foram utilizados os seguintes reagentes:

- Ácido esteárico vegetal (ALMAD, óleos gorduras e derivados - Brasil);
- Etilenoglicol Mono (PA, Vetec).

Foram utilizados os seguintes reagentes para quantificação de índice de acidez:

- Álcool etílico (99,8% de pureza, Vetec);
- Hidróxido de sódio (P.A, Vetec);
- n-Hexano (95% de pureza, Vetec) (usado na lavagem do catalisador);
- Éter etílico (P.A, Vetec);
- Fenolftaleína.

Para a determinação do índice de saponificação:

- Ácido clorídrico (P.A, Vetec);
- Hidróxido de potássio (P.A, Vetec);
- Fenolftaleína;
- Álcool etílico (95% de pureza, Vetec).

Para a quantificação do índice de iodo:

- Ciclohexano (P.A, Synth);
- Solução de Wijs (Neon);
- Iodeto de Potássio (Neon);
- Tiosulfato de sódio (P.A, Alphatec);
- Amido Solúvel (P.A, Synth).

Para a determinação do índice de hidroxila:

- Piridina (P.A, Vetec);



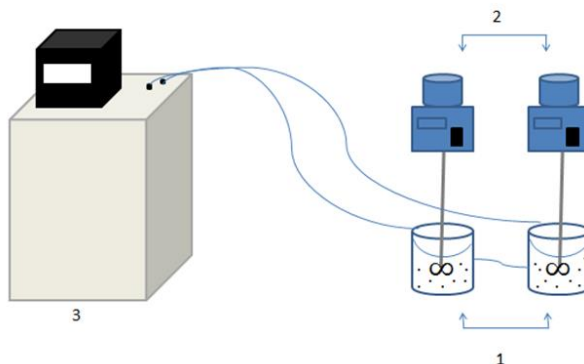
- Anidrido acético (P.A, Neon);
- Álcool n-butílico (P.A, Synth);
- Fenoltaleína.

#### 4.3. APARATO EXPERIMENTAL

##### 4.3.1. SÍNTESE ENZIMÁTICA DE MONOESTEARATO DE ETILENOGLICOL EM REATOR ENCAMISADO COM AGITAÇÃO MECÂNICA

Os ensaios para produção de monoestearato de etilenoglicol foram realizados em reator encamisado de 150 mL, com agitação mecânica (IKA RW 20) com haste agitadora de quatro pás em forma de hélice (R 1342) e a temperatura era controlada por um banho termostático (MQBMP – 01) como está ilustrado na Figura 3.

Figura 3 - Aparato experimental utilizado para a síntese de monoestearato de etilenoglicol em sistema livre de solvente, onde (1) reatores encamisados, (2) agitadores mecânicos e (3) banho termostático.



As reações de esterificação enzimática eram realizadas como apresentado na Figura 4. Os reagentes (ácido esteárico, etilenoglicol e o biocatalisador) eram colocados nos reatores de vidro encamisados, onde havia circulação de água advinda do banho termostático. Já a agitação era controlada através de agitadores mecânicos, os quais permitiam uma melhor homogeneização ao sistema.

Figura 4 - Reator encamisado com agitação mecânica, acoplado ao banho termostático.



#### 4.3.2. TESTES INICIAIS

Para produção de monoestearato de etilenoglicol através de esterificação enzimática a partir de informações anteriormente cedidas por empresas, primeiramente testaram-se diferentes agitações no sistema, a fim de verificar sua influência. Nesta etapa, utilizou-se uma concentração de 2% de duas diferentes lipases imobilizadas (Novozym 435 e NS 88011) para observar a influência direta da agitação, sendo estas 600 e 1000 rpm.

Primeiramente, adicionava-se o ácido esteárico e esperava-se a completa solubilização, para então adicionar o etilenoglicol. Após era retirada cerca de 1 g da amostra para a determinação do índice de acidez (tempo zero) e então era adicionado o biocatalisador. Após 6 horas de reação retirava-se outra alíquota para verificar a conversão e consequentemente a melhor agitação e enzima que melhor reagia ao sistema.

#### 4.3.3. AVALIAÇÃO CINÉTICA

##### 4.3.3.1 EFEITO DE TEMPERATURA

A partir dos testes preliminares e a escolha do melhor biocatalisador para o sistema, fixaram-se as condições: razão molar 1:1, agitação 600 rpm e tempo 48 horas à fim de verificar a influência de diferentes temperaturas (65, 70, 75 e 80 °C) sobre a síntese de monoestearato de etilenoglicol.

#### 4.3.3.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA

Tendo definido a temperatura em 75 °C, com agitação fixa em 600 rpm e razão molar de 1:1, foram realizados testes para verificar a influência da concentração de enzima sobre a síntese de monoestearato de etilenoglicol. As concentrações variaram em: 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 e 1% (m/m) de enzima em relação a massa do substrato.

#### 4.3.4. ESTUDO DE SUCESSIVOS CICLOS DE USO DA LIPASE PARA SÍNTESE DE MONOESTEARATO DE ETILENOGLICOL

Para recuperar a enzima ao final da reação, o biocatalisador era separado do meio reacional primeiramente por decantação, seguida de filtração. Após fazia-se uma lavagem com aproximadamente 40 mL de n-hexano em um béquer e este era levado para um banho em temperatura variando entre 50-60 °C, após três lavagens com n-hexano, retirava-se o excesso do mesmo e deixava-se o biocatalisador em estufa por aproximadamente 1 hora na temperatura de 40 °C (LERIN, L. et al., 2011), sendo este procedimento uma variação do método desenvolvido por Castro e Anderson (1995), que utilizaram heptano. Após este procedimento utilizava-se novamente o biocatalisador na síntese do éster e assim sucessivamente até que declínio na conversão fosse observado.

#### 4.3.5. AMPLIAÇÃO DE ESCALA

Nesta etapa do processo, utilizou-se o mesmo agitador mecânico (IKA RW 20) com haste agitadora de quatro pás em forma de hélice (R 1342) e a temperatura controlada por um banho termostático (MQBMP – 01), aumentando-se o reator de 150 mL para 500 mL. A massa dos reagentes que anteriormente ficava em torno de aproximadamente 35 gramas foi aumentada para cerca de 300 gramas, sendo esta a quantidade de ácido esteárico e etilenoglicol juntos. Este procedimento foi feito a fim de verificar a influência num aumento da escala, o que é de extrema importância à nível industrial. A Figura 5 mostra o sistema onde foram realizados os experimentos, sendo um dos reatores o de 500 mL e o outro de 150 mL.

Figura 5: Reator de vidro encamisado com agitação mecânica e banho termostático.



#### 4.3.6. MEDIDA DO ÍNDICE DE ACIDEZ

A determinação do índice de acidez fornece um dado importante na avaliação da quantidade de ácido consumido na reação de esterificação, ou seja, quanto maior a quantidade de ácido reagir com o álcool, menores serão os índices de acidez, sendo estes definidos como o número de miligramas de hidróxido de potássio necessárias para neutralizar um grama de amostra. Este índice foi realizado segundo metodologia AOCS Cd 3d-63. Primeiramente, diluía-se aproximadamente 1 g da amostra e adicionava-se de 3-4 gotas de fenolftaleína em aproximadamente 40 mL de uma solução 1:1 de éter/etanol. Então esta mistura era titulada com hidróxido de potássio (KOH) 0,1M, sob agitação vigorosa até alteração da cor para rósea. O índice de acidez foi determinado de acordo com a Equação 1:

$$IA = \frac{56,1 \times C_{KOH} \times V_{KOH}}{m} \quad (1)$$

Onde:

56,1: Massa Molar de KOH (g/mol);

$C_{KOH}$ : Concentração do KOH (mol/L);

$V_{KOH}$ : Volume de KOH gasto na titulação (mL);

M: massa da amostra (g).

#### 4.3.7. DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO DA REAÇÃO

Após realizados os cálculos do índice de acidez, através da relação entre os índices de acidez final e inicial, transformavam-se os valores em conversão pela Equação 2:

$$C(\%) = \frac{(IA_f - IA_i)}{IA_i} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

IA<sub>f</sub>: Índice de acidez final (mg KOH/g);

IA<sub>i</sub>: Índice de acidez inicial (mg KOH/g).

#### 4.3.8. CARACTERIZAÇÃO DO MONOESTEARATO DE ETILENOGLICOL OBTIDO

##### 4.3.8.1. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE IODO PELO MÉTODO DE WIJS

O índice de iodo de um óleo ou gordura é a medida do seu grau de insaturação e expresso em termos do número de centigramas de iodo absorvido por grama da amostra (% iodo absorvido).

A análise foi feita através da metodologia AOCS Cd 1c-85, onde primeiramente, a amostra foi fundida e filtrada para remover algumas impurezas sólidas e traços de umidade. Pesou-se aproximadamente 0,25 g em frasco Erlenmeyer de 250 mL com tampa e adicionou-se 10 mL de ciclo hexano. Transferiu-se com auxílio de bureta, 25 mL de solução de Wijs no frasco Erlenmeyer que continha a amostra. Depois de tampar o Erlenmeyer e agitar cuidadosamente com movimento de rotação, deixou-se em repouso ao abrigo da luz e a temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 10 mL da solução de iodeto de potássio a 15% e 100 mL de água recentemente fervida e fria. Então fez-se a titulação com solução tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 0,1 M até o aparecimento de uma fraca coloração amarela, adicionando-se 1 a 2 mL de solução indicadora de amido 1% e continuando a titulação até o completo desaparecimento da cor azul. Em paralelo com a amostra, fez-se também o mesmo procedimento com o branco. O cálculo realizado segundo a Equação 3:

$$\text{Índice de Iodo (\%)} = \frac{(V_b - V_a) \cdot M \cdot 12,68}{P} \quad (3)$$

Sendo:

12,68: Massa molecular de iodeto de potássio (g/mol);

M: molaridade da solução de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>;

V<sub>b</sub>: volume gasto na titulação do branco (mL);

V<sub>a</sub>: volume gasto na titulação da amostra (mL);

P: massa da amostra (g).

##### 4.3.8.2. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE 20 °C

A determinação da densidade pode ser medida através de vários equipamentos. Neste caso, a determinação foi feita através de um

picnômetro, sendo usada água como líquido de referência. Primeiramente, fundiu-se a amostra do produto monoestearato de etilenoglicol. Enquanto isso, o picnômetro que estava em estufa a 100 °C, foi pesado e acrescido de água, anotando-se a massa. Após, deixava o aparelho secando para fazer a mesma medida agora com a amostra do produto. O cálculo para determinação da densidade foi feito através da Equação 4:

$$D (20^{\circ}C) = \frac{A}{B} \quad (4)$$

Onde:

A: Massa do picnômetro e amostra menos a tara do picnômetro (g);

B: Massa do picnômetro e água menos a tara do picnômetro (g).

#### 4.3.8.3. ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO

O índice de saponificação é a quantidade de álcali necessário para saponificar uma quantidade definida de amostra.

Para este procedimento primeiramente, fundiu-se aproximadamente 4 g da amostra. Em seguida, adicionou-se 50 mL de solução alcoólica de KOH junto à amostra e conectou-se um condensador, deixando ferver suavemente até a completa saponificação da amostra (aproximadamente 1 hora). Após era adicionado 1 mL de solução indicadora de fenolftaleína e titulava-se com solução de ácido clorídrico 0,5M até desaparecimento da coloração rosa, conforme metodologia AOCS, Cd 3-25. O cálculo para índice de saponificação era feito através da seguinte Equação 5:

$$\text{Índice Saponificação} = \frac{56,01.M.(B-A)}{P} \quad (5)$$

Onde:

56,01: Massa Molar do KOH (g/mol);

A: volume gasto na titulação da amostra (mL);

B: volume gasto na titulação do branco (mL);

P: massa da amostra (g).

#### 4.3.8.4. ÍNDICE DE HIDROXILA

Para a determinação do índice de hidroxila utilizou-se o método AOCS Cd 13-60, onde em um balão de fundo redondo de 250 mL, pesou-se 10 g da amostra de monoestearato de etilenoglicol. Adicionou-se 5 mL do reagente piridina-anidrido acético (3:1 v/v) e colocou-se o balão em banho-maria por 1 hora sobre refluxo. Após o aquecimento, adicionou-se 10 mL de água por meio do condensador para o balão e aqueceu-se em banho-maria com tempo adicional de 10 minutos em

refluxo. Utilizando um total de 25 mL de álcool butílico, lavou-se internamente o condensador e os lados do balão. Por fim, adicionou-se 1 mL de solução indicadora de fenolftaleína e titulou-se com solução de hidróxido de potássio alcoólica 0,5 M até a coloração rosa. O mesmo procedimento foi realizado sem a presença de monoestearato de etilenoglicol para se obter o branco. Paralelamente ao experimento anterior, pesou-se 9 g do éster num erlenmeyer para a determinação da acidez. Adicionou-se 10 mL de piridina e 1 mL de solução indicadora de fenolftaleína. Titulou-se com hidróxido de potássio alcoólico 0,5 M até a coloração ficar rosa. O índice de hidroxila foi determinado pela Equação 6:

$$I.H = \frac{[B+(W.A)-S]. N. 56,1}{c.W} \quad (6)$$

Onde:

A: Volume da solução de KOH necessária para titulação de acidez (mL);

B: Volume da solução de KOH necessária para titular o branco (mL);

C: Massa da amostra usada para a titulação de acidez (g);

S: Volume da solução de KOH necessária para titular a amostra (mL);

W: Massa da amostra usada para acetilação (g);

N: Normalidade ou molaridade da potassa alcoólica.

#### 4.3.8.5. ANÁLISE DE COR

As medidas de análise de cor foram feitas utilizando um colorímetro (CHORMA METER CR – 400, KONICA MINOLTA) operando no sistema CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , C, h). O índice  $L^*$  mede a luminosidade e varia de preto a branco;  $a^*$  mede a variação de cores entre vermelho ( $+a^*$ ) e verde ( $-a^*$ ), enquanto a coordenada  $b^*$  varia de amarelo ( $+b^*$ ) ao azul ( $-b^*$ ) (KONICA MINOLTA, 1998), sendo esta análise feita rotineiramente nas indústrias para o produto via catálise convencional. Os cálculos para diferença de cor  $\Delta E$  foram feitos através da Equação 7:

$$\Delta E * = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a *)^2 + (\Delta b *)^2} \quad (7)$$





## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

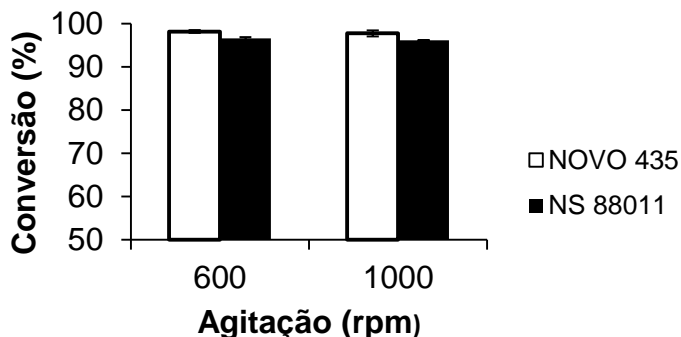
Neste capítulo estão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho, envolvendo a esterificação enzimática para produção de monoestearato de etilenoglicol em sistema livre de solvente.

### 5.1. TESTES PRELIMINARES

Sabe-se que a agitação é um parâmetro de extrema importância em reações de esterificação, pois promove a miscibilidade entre os substratos e previne que a enzima decante no reator (REMONATTO et al., 2015). Com base nisso, uma das primeiras etapas para a produção de monoestearato de etilenoglicol foi uma avaliação da melhor agitação para o sistema, fixando uma concentração de 2% (m/m) de duas diferentes lipases imobilizadas (Novozym 435<sup>®</sup> e NS 88011), a fim de verificar a influência direta da agitação, sendo pré-estabelecidos pelo grupo de pesquisa, valores relativamente elevados de 600 e 1000 rpm em função da alta viscosidade do meio reacional.

A Figura 6 apresenta as conversões obtidas para 600 e 1000 rpm de agitação com duas diferentes enzimas imobilizadas.

Figura 6 - Conversões em relação às lipases comerciais Novozym 435 e NS 88011 em duas diferentes agitações (600 e 1000 rpm), sendo fixados: Temperatura: 75 °C; Razão Molar entre os substratos: 1:1; Concentração de enzima: 2% (m/m); tempo: 6 horas.



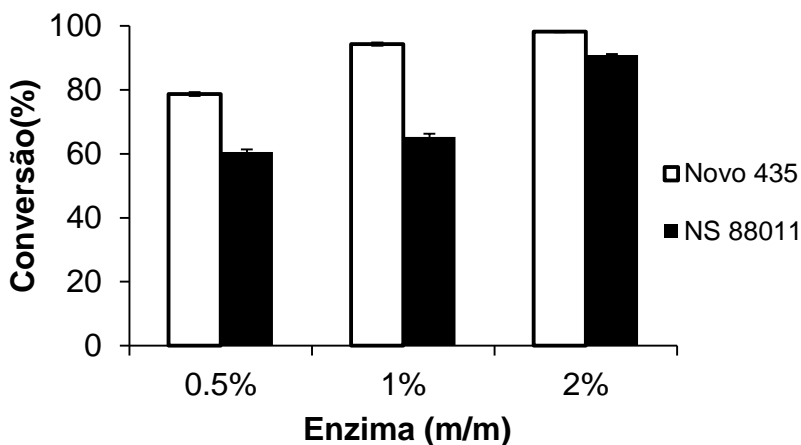
Através da Figura 6, podem-se observar conversões bastante próximas para as duas agitações testadas (600 e 1000 rpm). Desta forma, decidiu-se prosseguir os experimentos na agitação de 600 rpm, pela redução de gasto energético em diferentes concentrações de enzima que

variaram entre 0,5 e 2% (m/m), em um tempo de 6 horas de reação e temperatura de 75 °C, a qual foi usada pelo fato de o ácido ser sólido a temperatura ambiente e ter seu ponto de fusão entre 56 e 62 °C, sendo que em temperaturas abaixo disso a reação não aconteceria satisfatoriamente.

Nesta etapa utilizou-se também a enzima livre CALB, sendo que esta não teve um desempenho eficiente, ou seja, não foi obtida conversão ao éster emoliente, isto porque à medida que a temperatura se eleva em um sistema esperando o aumento da velocidade da reação, ocorre também a desnaturação da enzima, pois a molécula proteica absorve o excesso de energia do sistema e sua estrutura terciária se rompe, ocorrendo a desnaturação. Prosseguiram-se os testes apenas com as lipases comerciais imobilizadas que são de fato mais resistentes a temperaturas elevadas.

Na Figura 7, podem-se verificar os resultados de conversão para testes com as enzimas Novozym 435<sup>®</sup> e NS 88011 em diferentes concentrações após 6 horas de reação.

Figura 7 - Conversão em monoestearato de etilenoglicol após 6 horas para diferentes enzimas e concentrações, nas condições: Temperatura: 75 °C; Agitação: 600 rpm; Razão Molar: 1:1; Tempo: 6 horas.



De acordo com a Figura 7 pode-se observar que para os testes iniciais de 6 horas de reação e variação de enzima nas concentrações 0,5, 1 e 2% (m/m), as melhores conversões ou os menores índices de acidez foram obtidos para a concentração de 2% (m/m) de enzima em

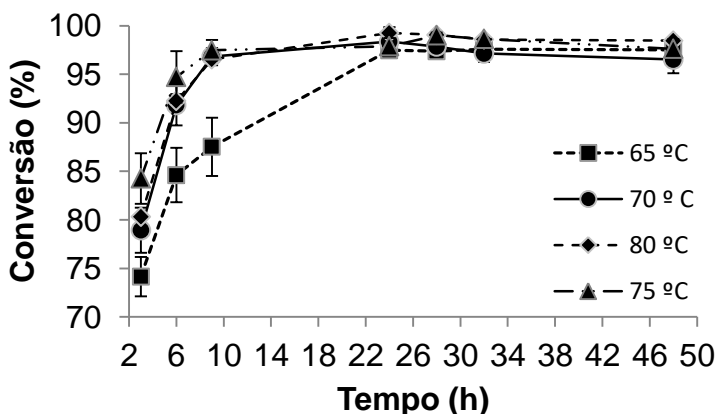
relação aos substratos. Porém, verificam-se conversões similares para as concentrações de 1 e 2% (m/m) de Novozym 435<sup>®</sup>. Como na indústria uma das questões mais críticas quanto ao uso de enzimas é o custo das mesmas, optou-se então por seguir os testes com 1% (m/m) da enzima Novozym 435<sup>®</sup>, sendo que esta em relação à NS 88011 conduziu a melhores conversões (94,26% em relação 65,23%).

Posteriormente, seguiu-se com a produção de monoestearato de etilenoglicol variando a temperatura e também a concentração de enzima.

## 5.2. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

Sabe-se que a temperatura tem papel fundamental na catálise enzimática, pois cada enzima tem uma faixa ótima de utilização, neste estudo buscou-se variar a temperatura a fim de verificar sua influência na produção de monoestearato de etilenoglicol. De acordo com a Figura 8 pode-se observar o efeito de diferentes temperaturas neste sistema reacional.

Figura 8 - Conversão em monoestearato de etilenoglicol em função do tempo nas diferentes temperaturas (65, 70, 75 e 80 °C), com as condições: Agitação: 600 rpm; Razão Molar: 1:1; Concentração de Novozym 435: 1% (m/m).



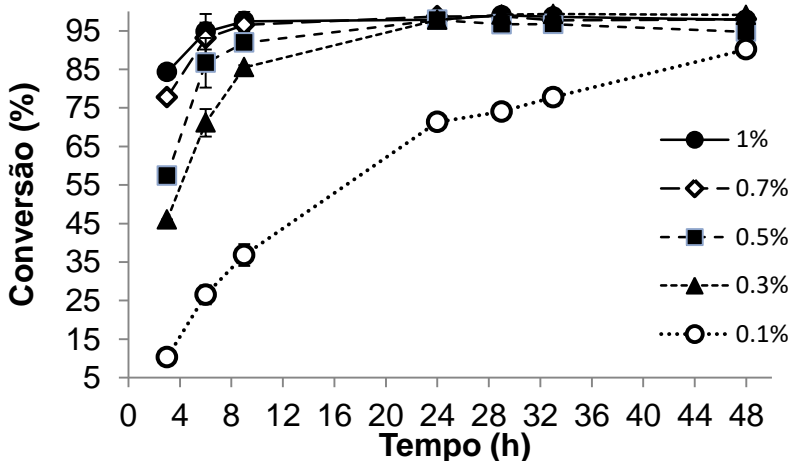
Com base nos experimentos, optou-se pela utilização de 75 °C para a realização dos experimentos posteriores, por se tratar de uma temperatura que conduziu a conversões elevadas, não extrapolando os limites que o banho termostático permite, e sendo seguro que não haveria nenhum problema em relação ao substrato sólido (ácido

esteárico), que em temperaturas menores acaba não solubilizando. Um aspecto relevante se refere quanto ao biocatalisador utilizado, sabe-se que a Novozym 435<sup>®</sup> tem sua temperatura ótima variando entre 40 e 70 °C, portanto apesar de um pouco acima de 70 °C, os resultados foram satisfatórios.

### 5.3. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA

A sequência dos estudos consistiu em variar a concentração de enzima, mantendo temperatura constante de 75 °C, agitação 600 rpm e razão molar 1:1 para a produção de monoestearato de etilenoglicol. Iniciou-se o processo com 1% (m/m) de enzima em relação ao substrato, e partiu-se então para concentrações menores, como é mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Conversão em monoestearato de etilenoglicol em função do tempo com diferentes concentrações de enzima (0,1; 0,3, 0,5, 0,7 e 1% (m/m)) nas condições: Temperatura: 75 °C; Razão molar: 1:1; Agitação: 600 rpm.



Observando a Figura 9 pode-se afirmar que quanto maior a concentração de enzima, maiores as conversões, porém em baixas concentrações de enzima, obtiveram-se resultados satisfatórios, sendo que para concentração de 0,1% (m/m) de enzima ainda obtém-se aproximadamente 90% de conversão, ou seja, em uma indústria ainda com uma quantidade pequena do biocatalisador, o que acarretaria em menores custos, talvez ao se prolongar o tempo de reação, haveria a

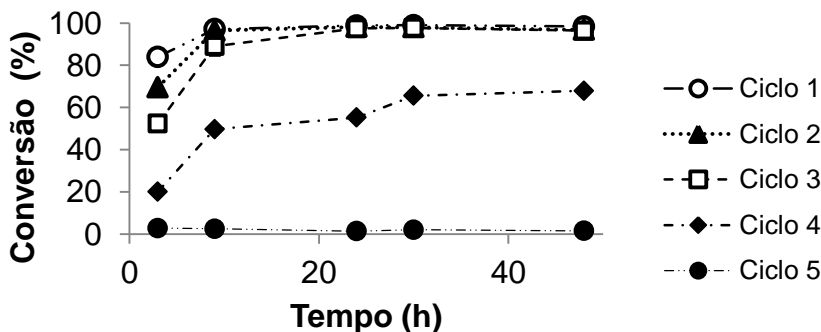
possibilidade de um produto puro, sem necessidade de etapas posteriores para purificação, como é o caso dos produtos obtidos via catálise convencional. Em estudo para a produção de monoéster de propileno glicol utilizando a enzima Lipozyme IM-77 em sistema com solvente, por exemplo, observou-se que a maior conversão foi obtida usando o excesso do doador de acil e grande quantidade de enzima (SHAW; WU; SHIEH, 2003), já para este estudo a reação estequiométrica e quantidades extremamente baixas de enzima levaram a conversões elevadas (99%), portanto, verifica-se a relevância deste estudo para a produção de um éster com propriedades emolientes, onde pequenas concentrações de enzima fornecem excelentes conversões.

#### 5.4. REUSO DO BIOCATALISADOR

Esta etapa também é de suma importância para a aplicação industrial, pois, quanto maior a possibilidade de reutilização do biocatalisador, menores os gastos e conseqüentemente maiores as chances de a indústria ter interesse em fazer a troca dos catalisadores tradicionais pelos biocatalisadores.

A Figura 10 mostra o comportamento do reuso da enzima em 5 ciclos de utilização, sendo que entre um ciclo e outro, a enzima, após cada reação de esterificação, era lavada com n-hexano e seca em estufa a 40 °C por 1 hora, posteriormente ficava em torno de 24 horas em dessecador e então era utilizada novamente.

Figura 10 - Gráfico da conversão em monoestearato de etilenoglicol em função do tempo durante o reuso enzimático. Condições: Temperatura 75 °C; Razão Molar: 1:1; Concentração de enzima: 1% (m/m).



Através da Figura 10 verifica-se que em 4 ciclos ainda se obtém altas porcentagens de conversão (em torno de 70%), o que não foi observado de fato para o quinto reuso. A principal justificativa para este resultado pode estar relacionada à perda da atividade enzimática pelo contato com o n-hexano ou mesmo com os substratos/produtos da reação.

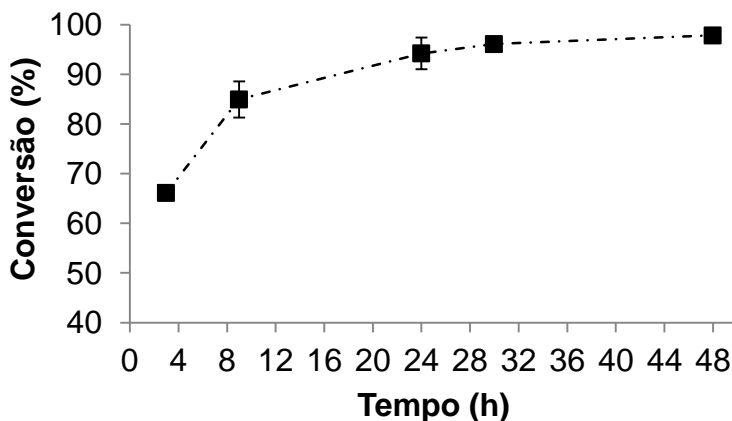
### 5.5. AMPLIAÇÃO DE ESCALA

O aumento de escala em bioprocessos é importante na área biotecnológica. O desafio é produzir grandes quantidades com uma produtividade alta e qualidade do produto (XING et al., 2009). Em bioprocessos as três escalas são: laboratório, planta piloto e produção industrial (JUNKER, 2014).

A ampliação de escala é de extrema importância para direcionar a maneira como a reação será conduzida em quantidades maiores de substrato. Normalmente, os problemas relacionados com a ampliação de escala advêm do fato que os tempos necessários para que os mecanismos ocorram aumentem com o aumento da escala.

Na Figura 11 são mostrados os resultados para ampliação de escala em reator encamisado de vidro e agitação mecânica. Esta ampliação foi de um reator de 150 mL para um de 500 mL. Em quantidades de reagente, conseguiu-se ampliar a escala em nove vezes.

Figura 11 - Conversão em função do tempo em escala ampliada. Condições: Temperatura 75 °C; Razão Molar: 1:1; Concentração de enzima: 1% (m/m).



De acordo com a Figura 11 observa-se que mesmo aumentando a quantidade de substrato em cerca de 9 vezes, o sistema se manteve inalterado e com conversões próximas de 100% em 48 horas de reação, sendo assim muito promissor sua utilização pela indústria.

#### 5.6. ANÁLISES PARA CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO FINAL

Nesta seção serão apresentados os resultados das análises feitas para o produto monoestearato de etilenoglicol, sendo de extrema importância deixar claro que não existem especificações na literatura aberta, sendo de exclusiva parte do cliente interessado no produto, as faixas aceitáveis para estes testes. As amostras utilizadas para estas análises foram àquelas obtidas nas condições experimentais que conduziram às maiores conversões: Temperatura: 75 °C; Razão Molar: 1:1; Concentração de enzima: 1% (m/m); Agitação: 600 rpm e Tempo: 48 horas. As amostras do produto já pronto eram submetidas a temperaturas entre 70 e 80 °C para seu total derretimento e então as análises de caracterização eram feitas. A análise de cor foi a única não submetida ao derretimento, isto é, a amostra em estado sólido foi submetida à análise.

A seguir será apresentada uma tabela contendo os resultados para índice de iodo, densidade 20 °C, índice de saponificação, índice de hidroxila.

Tabela 1- Valores obtidos para as análises de caracterização do produto monoestearato de etilenoglicol.

<b>Análise</b>	<b>Valores</b>
Índice de Iodo	0
Densidade 20 °C	0,89 g.cm <sup>-3</sup>
Índice de saponificação	201,03 mg KOH.g <sup>-1</sup>
Índice de Hidroxila	81,22 mg KOH g <sup>-1</sup>

Através da Tabela 1 podem-se observar os resultados para as análises de índice de iodo, saponificação, hidroxila e densidade. O índice de iodo, o qual quantifica as insaturações presentes no produto final revelaram um valor de zero, ou seja, como se era esperado não existem insaturações no ácido esteárico utilizado para as reações de esterificação, sendo que esta análise foi feita a fim da comprovação de pureza do ácido esteárico adquirido em grandes quantidades para a realização dos experimentos.

O resultado para a avaliação da densidade forneceu um valor de  $0,89 \text{ g.cm}^{-3}$ , uma vez que este teste foi feito em picnômetro tendo como líquido de referência a água. Já para o índice de saponificação, o resultado obtido foi  $201,03 \text{ mg KOH.g}^{-1}$ , sendo que esta análise é feita a fim de verificar a quantidade de álcali necessária para saponificar uma amostra com massa determinada. O índice de hidroxila, realizado para quantificação de hidroxilas livres no produto final obteve o valor de  $81,22 \text{ mg KOH.g}^{-1}$ .

#### 5.6.1. ANÁLISE DE COR

Na análise de cor, operando no sistema CIELAB ( $L^*, a^*, b^*, C, h$ ), sabe-se que o índice  $L^*$  mede a luminosidade e varia de preto a branco;  $a^*$  mede a variação de cores entre vermelho ( $+a^*$ ) ao verde ( $-a^*$ ), enquanto a coordenada  $b^*$  varia de amarelo ( $+b^*$ ) ao azul ( $-b^*$ ) (KONICA MINOLTA, 1998). Para o produto monoestearato de etilenoglicol os seguintes valores foram obtidos, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Valores  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $\Delta E$  para amostra do produto monoestearato de etilenoglicol nas condições: Temperatura  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Razão Molar: 1:1; Agitação: 600 rpm; Concentração de Enzima: 1%.

<b>Índice</b>	<b>Valor Externo</b>	<b>Valor Interno</b>
<b><math>L^*</math></b>	82,58	83,59
<b><math>a^*</math></b>	-0,94	-0,75
<b><math>b^*</math></b>	2,40	1,99
<b><math>\Delta E</math></b>	82,62	83,61

Os valores de  $\Delta E$  (diferença de cor) foram calculados segundo a Equação 9 e relacionam os índices  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , obtendo como resultados uma tendência a determinada coloração. No caso do éster monoestearato de etilenoglicol os valores de  $\Delta E$  foram próximos de 100, o que leva a uma tendência do produto à coloração branca, sendo que



esta coloração é de exigência do consumidor, não tendo uma especificação.



## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi avaliada a viabilidade técnica da produção de monoestearato de etilenoglicol, através de esterificação enzimática em sistema livre de solvente. A partir dos resultados obtidos é possível concluir que dentre os biocatalisadores testados a enzima que apresentou melhor desempenho foi a Novozym 435<sup>®</sup>. Em relação aos níveis de agitação testados de 600 rpm e 1000 rpm, o que se mostrou mais adequado foi 600 rpm. A temperatura que proporcionou melhores resultados foi de 75 °C e quando fixadas temperatura, agitação e razão molar, variando-se a concentração de enzima, observou-se que mesmo com baixas concentrações como o caso de 0,1% de enzima, os índices de conversão para o produto monoestearato de etilenoglicol mantiveram-se altos. Quando reutilizado o biocatalisador, os resultados foram ótimos, até o quarto ciclo de reuso. Conclui-se também que uma ampliação na escala obtendo resultados satisfatórios como foi o caso deste trabalho, é um aspecto bastante promissor em nível industrial. As análises qualitativas realizadas no produto obtido demonstraram a potencialidade de aplicação do mesmo, apesar da não haver uma especificação padrão destes valores na literatura especializada.

De maneira geral, este trabalho contribuiu para a obtenção de um produto para o setor de cosmético com propriedades emolientes, dito verde, por metodologia tecnicamente viável, por meio da síntese enzimática em sistema livre de solvente, trazendo assim, novas perspectivas para o setor de produção de cosméticos de interesse industrial.



## 7. REFERENCIAS

ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 15, p.6475-6490, 2013.

AOCS (1973). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Method Cd 3d-63.

AOCS (2003). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Method Cd 3-25.

AOCS (1997). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Method Cd 13-60.

BRADY, D; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 31, n. 11, p.1639-1650, 10 jul. 2009.

BON, E. P. S.; PEREIRA, J.R., N.; ANTUNES, A. M. S.; MAIOR, A. M. S.; ABARZÚA, E. G. O.; PINTO, G. F.; SILVA JR., J. G.; ANTUNES, O. A. C. **Tecnologia Enzimática**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIRJAN / SENAI, v. 1. p.113, 1999.

CARREA, G; RIVA, S. Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents, Chem. Int. Ed. v. 39, p. 2226-2254, 2000.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156, 2004.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipase. **Química Nova**, v. 18, p. 544 –554, 1995.

de CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, 27, n.1, p.146-156, 2004.

CHAMOULEAU, F.; COULON, D.; GIRARDIN, M.; GHOUL, M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. **J. Mol. Catal. B:Enzim.** V. 11, p.11, 949, 2001.

CHEMAX - MONOESTEARATO DE ETILENOGLICOL. Disponível em: (<http://www.chemax.com.br/monoestearato-etilenoglicol>). Acesso em: 21 de janeiro de 2018.

CIPOLATTI, E.P; SILVA, M.J.A.; KLEIN, M.; FEDDERN, V.; FELTES, M.M.C.; OLIVEIRA J.V.; NINOW, J.L.; D. Review- Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56–67, 2014.

COSMETICS INFO – The Science & Safety Behind Your Favorite Products (2016). Disponível em: <<http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/cetyl-esters-0>> Acessado em 30 de novembro de 2017.

CRODA - MONOESTEARATO DE ETILENOGLICOL. Disponível em: (<http://www.srbrasil.com/croda.html>). Acesso em: 21 de janeiro de 2018.

DABDOUB, M.J.; BRONZEL, J.L.; RAMPIN, M.A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, 776-792, 2009.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

D. LI, W. XIAOJING, N. KAILI, W. FANG, L. JUNFENG, W. PU, T. TIANWEI, Synthesis of wax esters by lipase-catalyzed esterification with immobilized lipase from *Candida* sp. 99-125, *Chin. J. Chem. Eng.* 19 (2011) 978–982.

EMFAL – Ficha técnica Diesterato de glicol – Disponível em: <[http://www.emfal.com.br/alcool/\\_ArquivoProdutos/60340.PDF](http://www.emfal.com.br/alcool/_ArquivoProdutos/60340.PDF)> Acessado em 25 de janeiro de 2017.

ETILENOGLICOL, FIT 2014 – Disponível em:< <http://laboratorios.cetesb.sp.gov.br/wpcontent/uploads/sites/47/2013/11/etilenoglicol.pdf>> Acesso em 25 de janeiro de 2017.

EUROMONITOR, 2016 – A economia da beleza: o setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos. Disponível em: < <https://economiadeservicos.com/2016/04/19/a-economia-da-beleza-o-setor-de-higiene-pessoal-perfumaria-e-cosmeticos/>> Acesso em: 20 de janeiro de 2018.

FABER, K. Biotransformations in organic chemistry. 3ed. Berlin: Springer Produktion-Gesellschaft., p.234, 1997.

FERREIRA, M.E; FALEIRO F.G. Biotecnologia: avanços e aplicações no melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO G.F; NETO, A. L de F. (ed téc). Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais, Simpósio, Capítulo 23, p.765-792, Planaltina, DF: EMBRAPA Cerrados, 2008.

FRACCASCIA, L.; GIANNOCARO, I.; ALBINO, V. Green product development: What does the country product space imply?. **Journal Of Cleaner Production**, [s.l.], v. 170, p.1076-1088, jan. 2018.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v.99, p. 277-286, 2008.

HILTERHAUS, L.; THUM, O.; LIESE, A. Reactor concept for lipasecatalyzed solvent-free conversion of highly viscous reactants forming two-phase systems. **Organic Process Research & Development**, v. 12, n. 4, p. 618-625, Jul-Aug 2008.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. September, p. 396–403, 1998.

JUNKER, B. H. Scale-up methodologies for Escherichia coli and yeast fermentation processes. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [S.I.], v. 97, n. 6, p.347-364, mar. 2004.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KHAN, NISHAT R.; RATHOD, VIRENDRA K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 50, n. 11, p.1793-1806, nov. 2015.

KONICA MINOLTA. Precise Color Communication: Color control from perception to instrumentation. Konica Minolta Sensing, Inc. 3- 91, Daisennishimachi, Sakai. Osaka 590-8551, Japan, 1998.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. Editora: Sarvier, São Paulo, 2000.

LERIN, L. et al. SUCCESSIVE CYCLES OF UTILIZATION OF NOVOZYM 435 IN THREE DIFFERENT REACTION SYSTEMS. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**. Rio de Janeiro, p. 181-188. jun. 2011.

LORTIE, R.; TRANI, M.; AND ERGAN, F. Kinetic study of the lipase catalyzed synthesis of triolein. **Biotechnol. Bioeng.** v. 41, p. 1021-106, 1993.

MANHEZI, A. C; BACHION, M. M; PEREIRA, A. L. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [s.l.], v. 61, n. 5, p.620-628, out. 2008.

MC KINLEY RESOURCES - MONOESTEARATO DE ETILENOGLICOL. Disponível em: <http://raw-materials.mckinleyresources.com/Asset/EGMS-TDS.pdf>. Acesso em: 21 de janeiro de 2018.

MILLER, C.; AUSTIN, H.; POSORSKE, L.; GONZLEZ, J.; **J. Am. Oil Chem. Soc.** 1988, 65, 927.

MOURÃO M, LAÍS, Tendências do uso de produtos naturais nas indústrias de cosméticos da França. *Revista Geográfica de América Central* 2011, 2 (Julho-Dezembro): Acessado em: 26 de junho de 2017 – Disponível:  
em:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=451744820171>> .



NEIDLEMAN, S.L. Enzymes in food industry: a backward glance. *Food Technology*, v. 45, p. 88-91, 1991.

Novozym 435. Ficha de informação de produto. *Novozymes*, p.2p. 2010a.

Novozym 435, carrier and enzyme leakage studies. *Novozymes*, p.3p. 2010b.

OLIVEIRA, L. G. De; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.742-756, 2009.

OLIVEIRA, M. A. De. Resolução enzimática de álcoois secundários. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

OTTMAN, J. A. Marketing Verde: desafios e Oportunidades para a nova era do Marketing. 1o ed. São Paulo: Makron Books Ltda, Pág. 18-44, 1994.

PAROUL, N. et al. Erratum to: Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification. *Bioprocess Biosystem Engineering*, [S.I.], v. 34, n. 3, p.331-337, 30 dez. 2010.

PEDRO, R. Espesantes, 2009 – Disponível em: <[http://www.freedom.inf.br/artigos\\_tecnicos/hc55/ricardopedro.asp](http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/hc55/ricardopedro.asp)> Acesso em: 02 de fevereiro de 2017.

PELLIS, A. et al. Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. **New Biotechnology**, [s.l.], p.1-16, jul. 2017.

PHARMA SPECIAL, Ácido Esteárico, 2017 – Disponível em: <[http://www.pharmaspecial.com.br/media/produtos/\\_lit\\_acido\\_estearico.pdf](http://www.pharmaspecial.com.br/media/produtos/_lit_acido_estearico.pdf)> Acesso em 25 de janeiro de 2017.

RASMUSSEN, J. E. (2011). Transitioning to Green: implementing a comprehensive environmental sustainability initiative on a university campus. Doctoral Dissertation, California State University, Long Beach, CA, USA.

RAJENDRAN, A; PALANISAMY, A; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [s.l.], v. 52, n. 1, p.207-219, fev. 2009.

REMONATTO, D. et al. Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean and canola oils in a free organic solvent system assisted by ultrasound. **Applied Biochemistry Biotechnology**, [S.I.], v. 176, n. 3, p.850-862, 15 abr. 2015.

ROTTAVA, I. et al. Screening of microorganisms for bioconversion of (-) $\beta$ -pinene and R-(+)-limonene to  $\alpha$ -terpineol. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 43, n. 7, p.1128-1131, set. 2010.

SHAW, J; WU, H.; SHIEH, C. Optimized enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate by direct esterification. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 81, n. 1, p.91-96, May 2003.

Sheldon, R.A., van Pelt, S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, 42(15), 6223-6235.

Souza, G; Magnani R. A biotecnologia na obtenção de “Cosméticos Verdes” – Disponível em: <[http://www.freedom.inf.br/artigos\\_tecnicos/hc63/artigo.asp](http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/hc63/artigo.asp)> Acesso em: 08 de março de 2018.

STOLOV, M. A. et al. Enthalpies of solution and enthalpies of solvation of organic solutes in ethylene glycol at 298.15K: Prediction and analysis of intermolecular interaction contributions. **Thermochemica Acta**, [s.l.], v. 648, p.91-99, fev. 2017.

SVENDSEN, A.; CLAUSEN, I. G.; PATKAR, S. A.; BORCH, K.; THELLERSEN, M.; *Method Enzymol.* 1997, 284, 317.

TORRES, B. B. Elementos de enzimologia. In: BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida. *Biotecnologia Industrial: Fundamentos*. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. Cap. 5. p. 151-176.

TSITSIMPIKOU, C.; DAFLOS, H.; KOLISIS, F. N.; J. Mol. Catal. B: Enzim., v. 3, p. 189, 1997.

VIANNI, R; BRAZ-FILHO, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 19, p.400-407, dez. 1995.

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

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 515-536, 2007.

XING, ZIZHUO et al. Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors. **Biotechnology Bioengineering**, [S.I.], v. 103, n. 4, p.733-746, 1 jul. 2009.

