

JEFFERSON CRIZEL PINHEIRO HOLZ

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ESTEARATO DE
CETOESTEARILA EM
SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, Como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Dr^a. Débora de Oliveira

Coorientador: Dr. Jorge L. Ninow

Coorientador: Dr. Lindomar A. Lerin

Florianópolis, 2018

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

Crizel Pinheiro Holz, Jefferson
SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ESTEARATO DE CETOESTEARILA
EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE / Jefferson Crizel
Pinheiro Holz ; orientador, Débora de Oliveira,
coorientador, Jorge Luiz Ninow, coorientador,
Lindomar Alberto Lerin, 2018.
78 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. Éster emoliente.
3. Esterificação. 4. Enzima. I. de Oliveira, Débora.
II. Luiz Ninow, Jorge. III. Alberto Lerin, Lindomar
IV. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.
V. Título.

“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente agradeço aos meus pais, Giltonio Holz e Mara Regina Crizel Pinheiro Holz, por me amar, apoiar e incentivar nas horas mais difíceis. Vocês são a minha base! Se hoje cheguei aqui, foi fruto do trabalho e dedicação de vocês! Obrigado por tudo! Amo muito vocês!
- Aos meus orientadores professores Débora de Oliveira, Lindomar A. Lerin e Jorge L. Ninow, muito obrigado pelos aconselhamentos e orientações que me foram passados. Obrigado também por toda dedicação e carinho;
- Ao professor José Vladimir de Oliveira, obrigado pelos conselhos e pela amizade;
- Aos meus avós Vilmar Cruz Gaspar e Serleida Crizel Gaspar, por todo carinho;
- Agradeço também todos os meus professores, que fizeram parte da minha trajetória acadêmica. Muito obrigado por toda dedicação.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC);
- A Capes pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa;
- A todos os meus colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) da UFSC, que sem dúvida foram mais que colegas de trabalho, se tornaram amigos. E espero poder cultivar estas amizades pelo resto da minha vida;
- Dentre estes amigos gostaria de destacar: Gabriela Nayana Pereira, Lindomar A. Lerin, Daniela Remonato (Peque), Jacqueline

Pires, Mara Cristina P. Zenevicz, Juliana Ribeiro Machado, Obrigado!
Vocês foram minha família neste período;

- A todos que de alguma forma me apoiaram, ajudaram e acreditaram em mim;
- Aos meus amigos e familiares: Anderson C. P. Holz, Andressa Resem, Cíntia C. Vianna, Felipe R. Almeida, Gustavo G. Holz, João C. Machado Neto, Karoline F. da Rosa, Marcos Vinicius N. dos Santos e Rodrigo G. Saad. Obrigado pela amizade e por se tornarem presentes mesmo com a distância;
- A DEUS, por toda força que ele me deu para que eu conquistasse mais este objetivo!

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”.

Clarice Lispector

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a reação de esterificação enzimática para produção de estearato de cetosteáril, um éster graxo que pode ser utilizado na indústria de cosméticos e de higiene pessoal como emoliente, por ele auxiliar na consistência dos produtos de beleza e fornecer uma sensação de maciez na pele. A esterificação para produção deste éster foi realizada a partir de materiais graxos, empregando-se como reagentes o ácido esteárico vegetal e o álcool cetosteárilico. O desenvolvimento deste trabalho apresentou diversos desafios, pois trata-se de um assunto pioneiro, que possui poucos dados de referência na literatura. Com isto, este trabalho contribuiu de forma positiva para o enriquecimento da literatura. Para realizar a maximização do processo foram testadas duas lipases comerciais imobilizadas, sendo elas a NS 88011 e a Novozym 435. Também foi realizado um estudo das condições de reação, como concentração de catalisador, tipo de catalisador enzimático, tempo de reação, influência do vácuo, temperatura do processo, razão molar dos reagentes e agitação. Através do delineamento experimental confirmou-se que para a maximização da esterificação a temperatura que deverá ser utilizada é a mais alta do estudo (75 °C), a razão molar deve ser de 1:1,5 (ácido/álcool) e a agitação também deve ser a mais alta avaliada no estudo (760 rpm). Nestas condições, no tempo reacional de 48 horas, foram obtidos elevados valores de conversão (99%) para a obtenção de ésteres de materiais graxos. Os ésteres obtidos foram caracterizados pela determinação do índice de acidez (0.6 mg KOH/g), pela determinação do índice de iodo (0 centigramas de iodo absorvido por grama da amostra), pelo índice de hidroxila (17.06 mg KOH/g), pelo índice de saponificação (133.68 mg KOH/g) e pela análise de cor do produto final.

Palavras-chaves: Esterificação; Ésteres Graxos; Lipases; Materiais Graxos, Estearato de cetosteáril.

ABSTRACT

In this work the enzymatic esterification reaction for the production of cetostearyl stearate, a fatty ester that can be used in the cosmetics and personal hygiene industry as emollient, was evaluated for its consistency of beauty products and provide a feeling of softness in the skin. Fatty materials were used for the production of cetostearyl stearate through esterification reaction of vegetable stearic acid and cetostearyl alcohol. The development of this work presented several challenges, as it is a pioneering subject, which has few data of reference in the literature. With this, this work contributed positively to the enrichment of the literature. To maximize the process, two immobilized commercial lipases were tested, being NS 88011 and Novozym 435. For the optimization a study of the reaction conditions, such as catalyst concentration, type of enzymatic catalyst, reaction time, influence vacuum, process temperature, molar ratio of the reactants and stirring. Through the experimental design it was confirmed that for the optimization of esterification the temperature to be used is the highest of the study (75 °C), the molar ratio should be 1:1.5 (acid/alcohol) and stirring should also be the highest evaluated in the study (760 rpm). Under these conditions, in the reaction time of 48 hours, high conversion values (99%) was obtained to obtain esters of fatty materials. The esters obtained were characterized by determining the acidity index (0.6 mg KOH/g), by determining the iodine value (0 centigrams of iodine absorbed per gram of the sample), hydroxyl number (17.06 mg KOH/g), saponification index (133.68 mg KOH/g) and color analysis of the final product.

Keywords: Esterification; Fatty Esters; Lipases; Fatty Materials; Cetoestearyl stearate.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ABIHPEC: Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos.

ANOVA: Análise de Variância.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

AOCS: American Oil Chemists Society.

CIE (*Comission Internationale d'Eclairage*).

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente.

COOH: Grupo Funcional Carboxila.

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional.

dr: Densidade Relativa.

ENGEBIO: Laboratório de Engenharia Bioquímica.

IA: Índice de Acidez.

IH: Índice de Hidroxila.

IS: Índice de Saponificação.

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*.

P.A.: pro analyse.

rpm: Rotações por minuto.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Faixa de estudo das variáveis independentes da matriz do planejamento experimental.....	44
Tabela 2: Avaliação das Lipases Novozym 435 e NS 88011 em diferentes concentrações sobre a síntese de Estearato de Cetoestearila. Condições: razão molar (1:1), temperatura (75°C), agitação (600 rpm), vácuo (600 mmHg) e tempo (6 horas).....	54
Tabela 3: Matriz do planejamento de experimentos realizados com a concentração de catalisador enzimático de 1% m/m e tempo reacional de 2 horas (valores reais e codificados).....	60
Tabela 4: Média das variações externas e internas das coordenadas das cores do éster.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ranking mundial do consumo de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos.....	25
Figura 2: Substâncias que possuem efeito emoliente.....	28
Figura 3: Reação de esterificação e hidrólise (inversa).....	29
Figura 4: Reação de esterificação para produção do estearato de cetoesterila.....	35
Figura 5: Aparato experimental (reator, banho termostático, bomba de vácuo e vacuômetro).....	40
Figura 6: Sistema de agitação mecânica e serpentina interna.....	41
Figura 7: Reagentes (álcool cetosteárico (esquerda) e ácido esteárico (direita)).....	42
Figura 8: Fluxograma do processo de esterificação enzimática para produção de estearato de cetoesterila.....	43
Figura 9: Espaço de Cor CIELAB, com as coordenadas L*, a*, b*.....	51
Figura 10: Avaliação da influência do vácuo na reação de esterificação. Condições: concentração de biocatalisador 2% (m/m), razão molar 1:1, temperatura 75°C, agitação 600 rpm e tempo de 6 horas.....	55
Figura 11: Cinética reacional da síntese enzimática para seleção do tempo reacional. Condições: razão molar de ácido/álcool 1:1, temperatura 75 °C, agitação 600 rpm, vácuo 600 mmHg, tempo de reação 6 horas e concentração de 1% m/m de NS 88011.....	57
Figura 12: Superfície de resposta gerada a partir da combinação das variáveis, agitação e razão molar.....	61
Figura 13: Superfície de resposta gerada a partir da combinação das variáveis, agitação e temperatura.....	62

Figura 14: Superfície de resposta gerada a partir da combinação das variáveis, razão molar e temperatura.....	63
Figura 15: Avaliação cinética de 48 horas da reação de esterificação em condições otimizadas. Condições: biocatalisador NS 88011 (1% m/m), vácuo (600 mmHg), temperatura de 75°C, agitação de 760 rpm, razão molar 1:1,5 (ácido/álcool) e tempo de 48 horas.....	64
Figura 16: Comparação das conversões em diferentes concentrações da lipase NS 88011. Condições experimentais: vácuo de 600 mmHg, temperatura de 75 °C, agitação de 760 rpm, razão molar 1:1,5 (ácido/álcool) e tempo de 48 horas.....	66
Figura 17: Reuso do catalisador enzimático (NS 88011) na reação de esterificação para produção do estearato de cetoestearila. Condições experimentais: biocatalisador NS 88011 (1% m/m), vácuo de 600 mmHg, temperatura de 75 °C, agitação de 760 rpm, razão molar 1:1,5 (ácido/álcool) e tempo de 48 horas.....	67

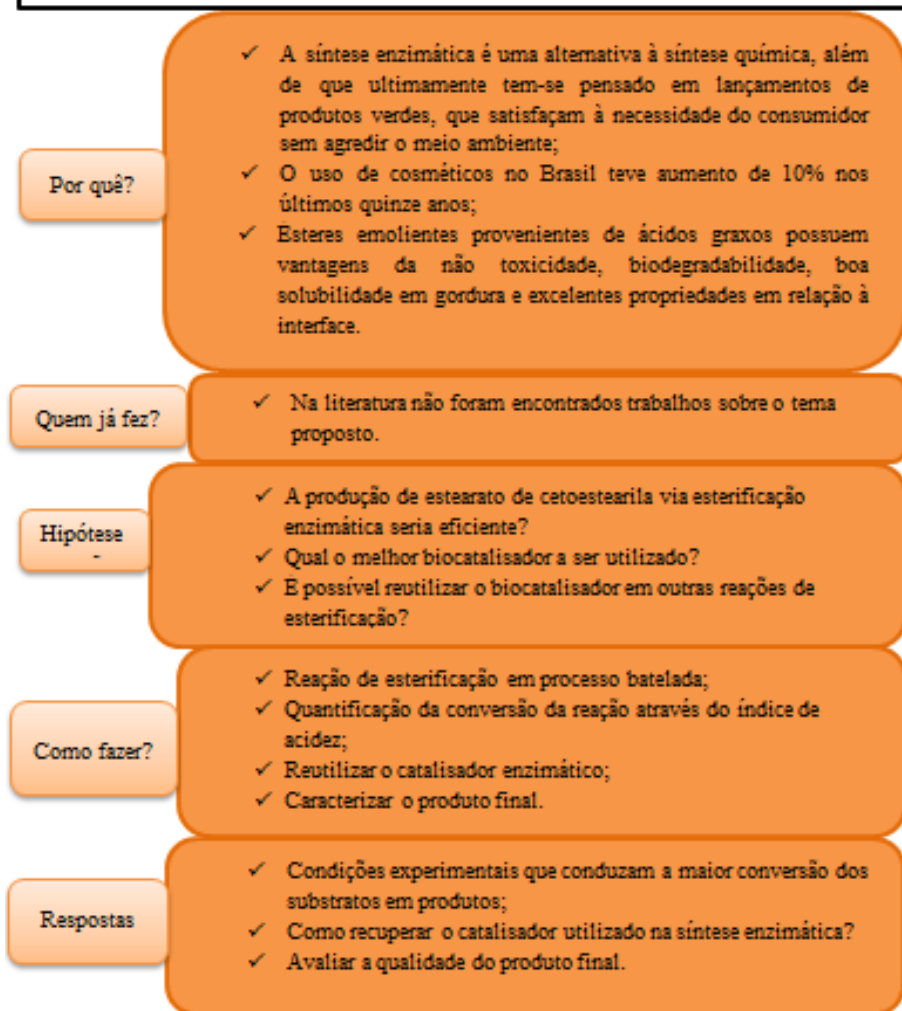
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. OBJETIVO GERAL.....	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1. COSMÉTICOS.....	24
3.2. COSMÉTICOS VERDES.....	25
3.3. MATERIAL GRAXO/EMOLIENTE.....	27
3.4. REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	29
3.5. CATALISADORES QUÍMICOS.....	29
3.6. CATALISADORES ENZIMÁTICOS / LIPASES.....	30
3.6.1. Enzima imobilizada.....	31
3.7. ÁCIDOS GRAXOS / ÁCIDO ESTEÁRICO.....	33
3.8. ÁLCOOIS GRAXOS / ÁLCOOL CETOESTEARÍLICO.....	34
3.9. ÉSTERES GRAXOS / ESTEARATO DE CETOESTERILA.....	34
3.10. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. MATERIAIS.....	38
4.1.1. Especificação dos reagentes.....	38
4.1.2. Catalisadores enzimáticos.....	38
4.2 MÉTODOS.....	39
4.2.1. Equipamentos e Instrumento.....	39
4.2.2. Metodologia experimental.....	42
4.2.3. Testes preliminares.....	43
4.2.4. Otimização das condições experimentais para produção de estearato de cetosteáril.....	44

4.2.5. Avaliação cinética.....	45
4. 2.6. Reuso do catalisador enzimático.....	45
4.3. METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO.....	45
4. 3.1. Método Titulométrico.....	46
4. 3.2. Índice de acidez.....	46
4. 3.3. Conversão (%) em ésteres.....	47
4. 3.4. Determinação do índice de iodo.....	48
4. 3.5. Índice de Hidroxila (AOCS Cd 13-60).....	49
4. 3.6. Determinação do índice de Saponificação (AOCS. Cd 3-25).....	50
4. 3.7. Determinação do índice de cor.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1. TESTES PRELIMINARES.....	53
5.2. INFLUÊNCIA DO VÁCUO.....	55
5.3. CINÉTICA REACIONAL.....	56
5.4. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ESTERIFICAÇ.....	58
5.5. CINÉTICA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE ESTEARATO DE CETOESTEARILA NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.....	64
5.6. INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ENZIMÁTICAS.....	65
5.7. REUSO DO CATALISADOR ENZIMÁTICO.....	67
5.8. CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO OBTIDO.....	68
5.8.1. Determinação do índice de iodo.....	68
5.8.2. Índice de hidroxila.....	68
5.8.3. Determinação do índice de saponificação.....	69
5.8.4. Determinação da cor.....	69
6. CONCLUSÕES.....	70
7. REFERÊNCIAS.....	71

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ESTEARATO DE CETOESTEARILA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE



1. INTRODUÇÃO

As mudanças econômicas e sociais do século 20, em conjunto com produções em grande escala de substâncias sintéticas derivadas do petróleo, foram as principais responsáveis pelo surgimento de uma vasta e rentável indústria de cosméticos e produtos para o cuidado pessoal, estendendo o seu consumo para todos os segmentos sociais (GALEMBECK; CSORDAS, 2010).

O segmento cosmético no Brasil apresentou nos últimos anos um grande crescimento, passando de um faturamento líquido de imposto sobre vendas de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 42,6 bilhões em 2015 (ABIHPEC, 2016).

Juntamente com esse crescimento, surgiu a preocupação em relação aos impactos ambientais e sociais que são gerados pelas indústrias de cosméticos (MORAIS; ANGELIS, 2012). Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), impacto ambiental é qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas.

A fim de minimizar este impacto ambiental, novas tecnologias industriais limpas estão sendo desenvolvidas. Essas tecnologias vão além da ideia de reciclagem, economia energética, combate ao desperdício e controle da poluição. Elas se baseiam na modificação dos próprios princípios de fabricação (VEIGA et al., 2006).

Atualmente, a indústria de cosméticos, higiene pessoal e perfumaria está selecionando suas matérias primas, para produção de cosméticos, e desenvolvendo novas metodologias de processamento, visando à sustentabilidade (GALEMBECK; CSORDAS, 2010).

Uma das metodologias de processamento que está em destaque é a catálise via enzimática. Esta forma de processamento está sendo preferida quando comparada com métodos químicos, por ser ambientalmente correta, com economia de energia e recursos por atuarem em condições de reações mais brandas, além de serem altamente específicas, reduzindo a obtenção de subprodutos indesejados (SHARMA; CHAUHAN; KANWAR, 2011).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo a produção enzimática de um éster (estearato de cetoestearila) da classe dos emolientes, a partir da esterificação de um álcool graxo e um ácido graxo, com a finalidade de substituir emolientes hoje obtidos

industrialmente via petroquímica, utilizados comumente nas composições de cosméticos e produtos de higiene pessoal. Este trabalho propõe a desenvolver uma nova forma de produção para o estearato de cetosteáril, contribuindo assim para o avanço da tecnologia, visto que este trabalho é pioneiro por não apresentar estudo similar na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Sintetizar o éster estearato de cetoestearila, através da esterificação dos materiais graxos, ácido esteárico vegetal e álcool cetoestearílico, em sistema livre de solvente utilizando lipases comerciais imobilizadas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Avaliar o desempenho de diferentes lipases comerciais imobilizadas para esterificação de ácido esteárico e álcool cetoestearílico em sistema livre de solvente;
- ▶ Testar diferentes concentrações de lipases sobre a síntese de estearato de cetoestearila;
- ▶ Avaliar a cinética reacional para a produção enzimática de estearato de cetoestearila;
- ▶ Otimizar as principais variáveis de processo (temperatura, razão molar e agitação) sobre a produção enzimática de estearato de cetoestearila em sistema livre de solvente sob vácuo;
- ▶ Estudar o reuso do biocatalisador na síntese de estearato de cetoestearila;
- ▶ Caracterizar o produto da reação - estearato de cetoestearila - quanto às propriedades físico-químicas (índice de hidroxila, índice de iodo, índice de saponificação e determinação da cor).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. COSMÉTICOS

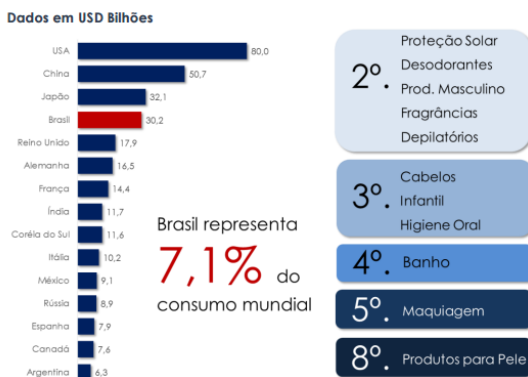
Os cosméticos são geralmente associados à saúde e o prolongamento da juventude. Nas mensagens publicitárias das empresas de cosméticos, pode-se observar fortemente a relação entre beleza, saúde e juventude, que comparecem como mercadorias simbólicas anunciadas, subliminar e conjuntamente, com a mercadoria concreta: o produto cosmético (MELO; SANTANA; BRITO, 2005).

Conforme a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA Nº 211, de 14 de Julho de 2005 e a RDC Nº 4, de 30 de Janeiro de 2014, os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes podem ser definidos como: Estes produtos são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado.

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos – ABIHPEC, o Brasil ocupa a quarta posição no mercado mundial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, que representa 7,1% do consumo mundial (Figura 1). O Brasil ocupa o segundo lugar no mercado consumidor mundial em proteção solar, desodorantes, produtos masculinos, fragrâncias e produtos para depilação (ABIHPEC, 2016).

Na Figura 1, podemos observar o ranking mundial do consumo de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos. Onde o Brasil encontra-se em quarto lugar, com o total de 7,1% do consumo mundial. Nesta mesma figura podemos observar o ranking mundial do consumo de alguns produtos específicos, como: Brasil está em segundo colocado no consumo mundial de protetores solares e desodorantes, terceiro colocado no consumo de produtor para cabelo e produtos de higiene oral, quarto lugar em produtos para banho, quinto no consumo de maquiagem e oitavo lugar no consumo de produtos para pele.

Figura 1: Ranking mundial do consumo de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos.



Fonte: ABIHPEC (2016).

De acordo com a ABIHPEC, o setor brasileiro de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos vem apresentando um crescimento superior, quando comparado com outros setores da indústria nacional. Nos últimos 20 anos este setor apresentou um crescimento médio deflacionado composto próximo a 11,4% (ABIHPEC, 2016).

Esse crescimento está relacionado com diversos fatores, tais como: aumento da expectativa de vida da população, que está se preocupando mais com a aparência; participação crescente da mulher brasileira no mercado de trabalho nacional; as classes C e D da população estão tendo maior acesso aos produtos, devido ao crescimento de sua renda mensal e da própria inovação das indústrias, que vêm utilizando tecnologia para aumentar a produtividade, favorecendo os preços praticados pelo setor, com aumentos menores do que os índices de preços da economia em geral (ABIHPEC, 2016).

3.2. COSMÉTICOS VERDES

Para que a indústria de higiene, cosmético e perfumaria continue crescendo, são necessárias algumas mudanças a fim de satisfazer as exigências dos consumidores, que cada vez mais priorizam produtos sustentáveis (GONÇALVES; HENKES, 2016).

Estes consumidores estão preocupados com a compra de produtos de empresas que refletem os valores corretos e morais, e vários aspectos dos quais o meio ambiente é apenas um deles. Diante do exposto, as companhias, de diversos setores, precisam demonstrar que possuem uma postura correta, tanto no que diz respeito às leis, aos direitos humanos e ao meio ambiente (TAMASHIRO, 2012).

O interesse crescente pela preservação da natureza é responsável pelo surgimento e consolidação de um novo nicho de mercado, o de cosméticos ‘verdes’, isto é, aqueles produzidos de forma a minimizar o impacto ao meio ambiente (MELO, 2002).

Para que um produto possa ser considerado verde/sustentável ele deve ser fabricado com a mínima quantidade de matérias-primas, sendo essas renováveis ou recicláveis, que conservem recursos naturais no processo de extração, ser fabricado com a máxima eficiência energética e com a mínima utilização de água, ser acondicionado em embalagens ambientalmente amigável, sendo reutilizáveis e biodegradáveis (RASMUSSEN, 2011; TAMASHIRO 2012).

Entretanto, não existem produtos completamente verdes ou ecologicamente corretos, no processo produtivo, todo produto consome energia, recursos e gera emissões na atmosfera, porém mudanças nas matérias primas utilizadas e/ou mudanças no processo de fabricação do produto podem ser feitas a fim de gerar um produto com um menor impacto ambiental (TAMASHIRO 2012).

Segundo Rasmussen (2011), existe uma necessidade de que as indústrias sofram uma transição para produtos que apresentem um baixo impacto ambiental em sua fabricação. Assim, as empresas buscam atender às necessidades da sociedade, principalmente no que se diz respeito às tecnologias e aos novos padrões de produção, comercialização e consumo de produtos e serviços, que tem gerado efeitos diretos sobre o meio ambiente.

Neste contexto, surge a necessidade de as empresas de cosméticos investirem cada vez mais na fabricação e lançamento de produtos verdes/sustentáveis, com a utilização de matérias-primas e/ou processos sustentáveis, que satisfaçam às necessidades humanas, sem agredir o meio ambiente. Esta necessidade tem sido impulsionada pela demanda de produtos que possuem baixo impacto ambiental, que podem ser classificados como cosméticos orgânicos, que possuem ingredientes orgânicos certificados; e os cosméticos naturais, produzidos com extratos ou óleos de plantas e ingredientes de origem natural, isentos ou apresentando concentrações mínimas de ingredientes sintéticos (RIBEIRO, 2010).

3.3. MATERIAL GRAXO/EMOLIENTE

Os componentes necessários para as formulações de cosméticos podem ser divididos em: água, álcool etílico, umectantes, materiais graxos, tensoativos, espessantes hidrofílicos, conservantes (antimicrobianos, antioxidantes, sequestrantes), corantes e fragrâncias (CORRÊA, 2012). Dentre os componentes citados acima merecem destaque os materiais graxos, pois tradicionalmente sua produção é realizada em escala industrial com o auxílio de catalisadores químicos. Porém, é possível obter ésteres graxos através da esterificação catalisada por enzimas (HAAG; PASTORE Jr; FARIA, 2005).

Materiais graxos são substâncias que apresentam elevada capacidade de emoliência. Eles apresentam baixo ponto de fusão e podem ser aplicados no corpo humano (cabelo e pele). Os fluidos de silicone, ácidos graxos, álcoois graxos, ésteres graxos e triglicerídeos são exemplos de materiais graxos (MORSELLI, 2014).

A escolha adequada do material graxo para compor a formulação de um cosmético é de suma importância, pois é possível determinar o tipo de comportamento do material graxo a partir do número de átomos de carbono, ligações duplas e grupos funcionais (MORSELLI, 2014).

Os materiais graxos fornecem características fundamentais para a qualidade de um cosmético, estas características são: espalhamento, absorção e sensação de lubrificação na pele (HAAG; PASTORE Jr; FARIA, 2005).

Os emolientes são substâncias que possuem a capacidade de formar uma película sobre a epiderme, fazendo com que ocorra uma diminuição da emissão de água pelos poros. Eles também são responsáveis pelas características sensoriais deixadas pelo produto. A classificação dos emolientes pode ser feita a partir de suas propriedades físico-químicas (ponto de fusão, ponto de turvação, viscosidade, poder dissolvente, polaridade, estabilidade à hidrólise ácida ou alcalina) e quanto às propriedades de aplicação sobre a pele (grau de espalhamento, grau de absorção/penetração, tato oleoso ou seco, compatibilidade dermatológica, baixa toxicidade). Mas, a melhor classificação para o entendimento de quais substâncias tem efeito emoliente é segundo a estrutura química (HAAG; PASTORE Jr; FARIA, 2005). A Figura 2 apresenta as substâncias que possuem efeito de emoliente, segundo HAAG; PASTORE Jr; FARIA (2005).

Figura 2: Substâncias que possuem efeito emoliente.

ESTRUTURA QUÍMICA
Hidrocarbonetos derivados do petróleo
Triglicerídeo vegetal ou animal
Ésteres de ácidos graxos e álcoois graxos
Álcoois graxos saturados e insaturados
Álcoois de Guebert
Ácidos graxos
Silicones
Ésteres graxos

Fonte: HAAG; PASTORE Jr; FARIA (2005).

Na tabela acima é possível observar uma grande diversidade de emolientes que devem ser escolhidos conforme as características desejadas para o produto final, características do mercado consumidor (pessoas de pele oleosa, seca), facilidade de incorporação, compatibilidade com outros componentes e preço, motivos pelos quais, geralmente é utilizada uma mistura de emolientes (HAAG; PASTORE Jr; FARIA, 2005).

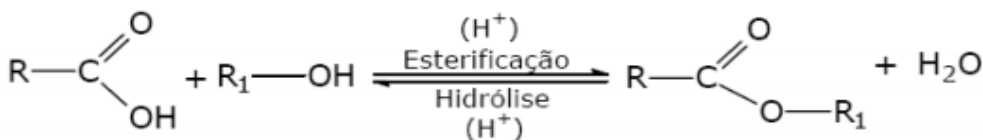
Atualmente, a qualidade do produto final e a sua produção sustentável são fatores de grande importância para o mercado. Para tais fatores serem alcançados, as matérias primas selecionadas devem ser provenientes de fontes naturais ou renováveis, respeitando os princípios sociais e ambientais de sustentabilidade e que sejam benéficas à saúde. A escolha das matérias-primas é de suma importância, pois essas representam aproximadamente 65% do custo direto de produção de um cosmético (BERGER, 2009; GALEMBECK; CSORDAS, 2010).

Neste contexto, a biotecnologia tem contribuído para o desenvolvimento de novos produtos, como ésteres da classe dos emolientes, com auxílio de catalisadores enzimáticos, tornando possível a produção de ésteres a partir de um álcool e ácidos graxos (GANDHI, 1997; YAHYA et al., 1998).

3.4. REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

A esterificação, reação reversível de um ácido carboxílico com um álcool (havendo produção de água), é o método mais comum e mais utilizado em processos industriais para obtenção de ésteres. Este processo ocorre a partir da substituição de uma hidroxila (-OH) de um ácido por um radical alcoxi (-OR). Reações de esterificação são exemplos clássicos de reações reversíveis; onde a reação inversa é conhecida como hidrólise, conforme mostrado na Figura 3 (SERRA, 2010).

Figura 3: Reação de esterificação e hidrólise (inversa).



Fonte: SERRA (2010).

A reação de esterificação é de grande importância para a produção de ésteres de interesse comercial, principalmente nas áreas de solventes, diluentes, plastificantes, surfactantes, polímeros, essências e fragrâncias sintéticas, e como intermediário químico para indústrias farmacêuticas, herbicidas e pesticidas (SERRA, 2010).

Na esterificação, a adição de catalisadores é facultativa, porém sem esta adição a reação é extremamente lenta e requer muitos dias para alcançar o equilíbrio. Isso ocorre devido à fraca acidez dos ácidos carboxílicos. Assim, as esterificações são facilitadas através do aumento da temperatura do meio reacional e presença de catalisador (SERRA, 2010).

3.5. CATALISADORES QUÍMICOS

Os catalisadores químicos são substâncias que aumentam a velocidade de uma reação. Eles não apresentam nenhum efeito sobre a composição dos reagentes, e também não são consumidos na reação.

Estes catalisadores são utilizados, como uma forma convencional, para auxiliar nas transformações dos produtos, principalmente derivados da transformação de óleos e gorduras (AL SAADI; JEFFREYS, 1981; FACCIO, 2004).

Catalisadores químicos podem ser ácidos ou básicos, geralmente os catalisadores ácidos levam à formação de subprodutos indesejáveis, que dificultam a separação e a recuperação do produto, com isso, os catalisadores ácidos, apresentam baixos rendimentos. Outro ponto negativo é a ação corrosiva, que implica na necessidade de equipamentos específicos para seu uso (AL SAADI; JEFFREYS, 1981; FACCIO, 2004).

Os catalisadores básicos também apresentam algumas limitações, como a necessidade de as reações serem conduzidas somente com óleos vegetais neutros ou de baixa acidez, isso ocorre pela presença de ácidos graxos livres neutraliza a ação catalítica. Além disso, a separação dos produtos formados na reação apresenta algumas dificuldades, que resultam em perdas no rendimento (FACCIO, 2004).

3.6. CATALISADORES ENZIMÁTICOS / LIPASES

As enzimas são biomoléculas que possuem a característica de aumentar a velocidade de reações químicas sem alterar o equilíbrio e sem serem consumidas pela reação. A grande maioria das enzimas é de natureza proteica, sendo constituídas por longas cadeias de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Estes catalisadores apresentam um alto grau de especificidade devido ao sítio ativo situado na enzima (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

Muitas reações químicas, que são catalisadas por catalisadores químicos, podem ser catalisadas por enzimas. As enzimas são proteínas que possuem atividade catalítica, com isto, elas são capazes de acelerar a velocidade de uma reação química. Outra vantagem destes biocatalisadores é o fato deles serem ecologicamente corretos (MONTEIRO; SILVA, 2009).

A classificação das enzimas varia de acordo com sua forma de obtenção, sendo elas enzimas de origem vegetal, animal e microbiana (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Entre as enzimas mais empregadas tanto em pesquisas acadêmicas, como em utilização industrial (indústria alimentícia, de

cosméticos e perfumes, biomédica, pesticidas, detergentes, entre outras), encontram-se as lipases (PANDEY et al., 1999).

As lipases são um determinado grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases, que atuam sobre ligações éster. Elas não apenas catalisam reações de hidrólise, mas também de síntese em meios aquo-restritos, como reações de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise, e podem atuar sobre substratos não naturais (JAEGER; EGGERT, 2002; FACCIO, 2004).

Antigamente as lipases eram predominantemente obtidas a partir de pâncreas de animais, e eram usadas como auxiliar digestivo para o consumo humano. Atualmente, elas podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (FACCIO, 2004).

As lipases obtidas de fontes microbianas são um grupo de enzimas que apresentam uma grande aplicação biotecnológica, devido principalmente às suas propriedades de atuação enzimática e especificidade ao substrato, e facilidade de produção em grande escala, sendo um dos grupos de enzimas mais utilizados no segmento industrial (HASAN et al., 2006).

Estas enzimas possuem um enorme potencial biotecnológico, sua utilização apresenta diversas vantagens por elas possuírem uma alta estabilidade em solventes orgânicos, não requerem a presença de cofatores, possuem uma larga especificidade pelo substrato, possui uma formação de produtos mais puros devido à alta seletividade do catalisador e atua em condições amenas de temperatura e pH necessárias à síntese, em contraposição às condições extremas associadas ao uso de processos químicos (JAEGER & REETZ, 1998; DIAS et al., 2005).

Pode-se destacar a síntese de ésteres de ácidos graxos, como um dos processos de maior importância, que podem ser catalisados pelas lipases. Seu estudo e aplicação vem crescendo tanto em pesquisas acadêmicas como no uso industrial, em função da importância de inúmeros ésteres (JAEGER et al., 1994; YAHYA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2004).

3.6.1. Enzima imobilizada

A imobilização enzimática consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para que seja possível fazer a reutilização do catalisador, aumentando assim sua viabilidade econômica (GUISAN,

2006). A imobilização pode ser realizada por diferentes metodologias, podendo ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelas ligações cruzadas pelo uso de um reagente multifuncional, por um confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (DALLA-VECCHIA et al., 2004). As técnicas de imobilização são de extrema importância, pois com elas é possível fazer o reuso do catalizador enzimático, facilitam a separação dos produtos e aumentam a estabilidade em solventes orgânicos (SOARES et al., 1999).

O principal objetivo da imobilização enzimática é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, se espera que não ocorra qualquer alteração, tanto estrutural quanto modificações no sítio ativo (GANDHI, 1997).

Enzimas imobilizadas apresentam uma série de vantagens e as razões para a escolha de um derivado imobilizado variam de acordo com sua aplicação, incluindo: maior duração de tempo da atividade catalítica; possibilidade de operação contínua do processo, com maior facilidade de controle; facilidade de separação do produto final; maior estabilidade ao pH e à temperatura e a reação pode ser facilmente interrompida, em um nível desejado, pela remoção da enzima, caso o processo seja batelada, ou ajuste do tempo de residência se é usado um reator contínuo (GUISAN, 2006; HANEFELD et al., 2009; DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Com a imobilização da enzima, é possível ocorrer uma inibição ou um aumento da sua atividade e estabilidade, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (SOARES et al., 1999).

Em uma reação, as enzimas livres tendem a agregar-se e prendem-se às paredes do reator, quando estão suspensas em um solvente orgânico. Isso ocorre principalmente quando existe presença de água no sistema. A imobilização de enzimas em suportes sólidos apresenta diversas vantagens, tais como: a eliminação do problema das enzimas livres em solventes orgânicos, elas propiciam também um aumento da estabilidade térmica e química da lipase, permitindo um melhor controle do processo e da qualidade do produto. Outros benefícios da imobilização são a necessidade de baixos teores de água nas reações, e a facilidade da separação do biocatalisador do sistema de reação permitindo a reutilização da enzima, resultando em processos economicamente mais viáveis. Essa técnica também minimiza o efeito

de desnaturação de muitos solventes orgânicos sobre a maioria das enzimas, isso ocorre através de um material hidrofílico, que permite a manutenção de um microambiente de alta atividade de água em torno das moléculas de enzima (MALCATA et al., 1990; NORDISK, 1992; ILLANES, 1994; CASTRO, 1995).

Para as reações de esterificação, é de extrema importância o uso de enzimas imobilizadas que proporcionam reações com baixas concentrações de água, pois, assim o equilíbrio químico é deslocado no sentido da formação de produtos (FACCIO, 2004).

3.7. ÁCIDOS GRAXOS / ÁCIDO ESTEÁRICO

Os  cidos graxos podem ser diferenciados a partir de três formas: número de átomos de carbono que está presente em sua cadeia (variando de 4 a 24 átomos), tamanho da cadeia (podendo ser curta, média ou longa), e também pela posição das ligações duplas (podendo não apresentar nenhuma ligação dupla (saturados), uma ligação dupla (monoinsaturados) e duas ou mais ligações duplas (poli-insaturados)). Na natureza, a grande maioria dos ácidos graxos saturados, possui números pares de átomos de carbono em sua estrutura (CHOW, 2008).

Em relação ao tamanho da cadeia, os ácidos graxos podem ser divididos em quatro grupos distintos, sendo eles:  cidos graxos de cadeia curta, todos ácidos que possuem uma cauda alifática com menos de seis átomos de carbono; cadeia média, possuir cauda alifática que varie de 6 a 12 átomos de carbono; cadeia longa, cauda alifática com 12 ou mais átomos de carbono; e de cadeia muito longa, a cauda alifática destes ácidos graxos possui mais de 22 átomos de carbono. Na natureza, é extremamente baixa a ocorrência de ácidos graxos muito longos. Os  cidos mais comuns são os que apresentam uma variação de 12 a 22 átomos de carbono, eles são encontrados em uma variedade de plantas e animais (GAMBARRA NETO, 2008).

O  cido esteárico (octanóico) pertence a uma classe de compostos chamados ácidos carboxílicos, que são caracterizados por possuirem o grupo funcional carboxila (COOH). Ele é um ácido graxo saturado, de cadeia longa (18 átomos de carbono), e possui a característica de ser saponificado, com isto é muito utilizado em formulações cosméticas. Pelo seu alto ponto de solidificação, ele é muito usado como um agente doador de viscosidade e consistência em formulações de cremes. O  cido esteárico está presente em grande parte

das gorduras animais e dos óleos vegetais (FERREIRA, 2010; CORRÊA, 2012).

3.8. ÁLCOOIS GRAXOS / ÁLCOOL CETOESTEARÍLICO

O álcool cetoestearílico é um álcool pertencente à classe dos álcoois graxos. Quando de origem natural é produzido a partir de óleos vegetais. Quando sintético, é composto por uma mistura de cadeias carbônicas (16 e 18 carbonos). Ele é encontrado no mercado com a proporção de 30% (álcool cetílico) e 70% (álcool estearílico) (CORRÊA, 2011).

Possui grande importância na composição de emulsões, pois apresentam propriedades de espessamento, emoliência e função co-tensioativa, auxiliando na estabilidade das preparações cosméticas, além disso, confere viscosidade às emulsões, e devido característica intrínseca, promove aspecto translúcido na formulação final. Ele é utilizado em diversas formulações, como: de cremes corporal, facial, condicionador capilar, protetores solar, proporcionando proteção e suavidade no local de aplicação, pois possui compatibilidade com a pele (CORRÊA, 2011).

O álcool cetoestearílico é insolúvel em água. Sua adição na formulação de emulsões auxilia a viscosidade e a tensoatividade, propiciando o uso de menores concentrações de tensoativos, e garantindo estrutura mais complexa (MORSELLI, 2014).

3.9. ÉSTERES GRAXOS / ESTEARATO DE CETOESTERILA

Ésteres de origem natural, como ésteres derivados do óleo de baleia, cera de carnaúba e óleo de jojoba, têm sido utilizados em diversos setores industriais. Porém eles apresentam alto custo e baixa disponibilidade no mercado. Desta forma, há uma demanda pela produção de ésteres que utilizem matérias primas de fácil acesso e baixo valor (MARTINEZ et al., 1988).

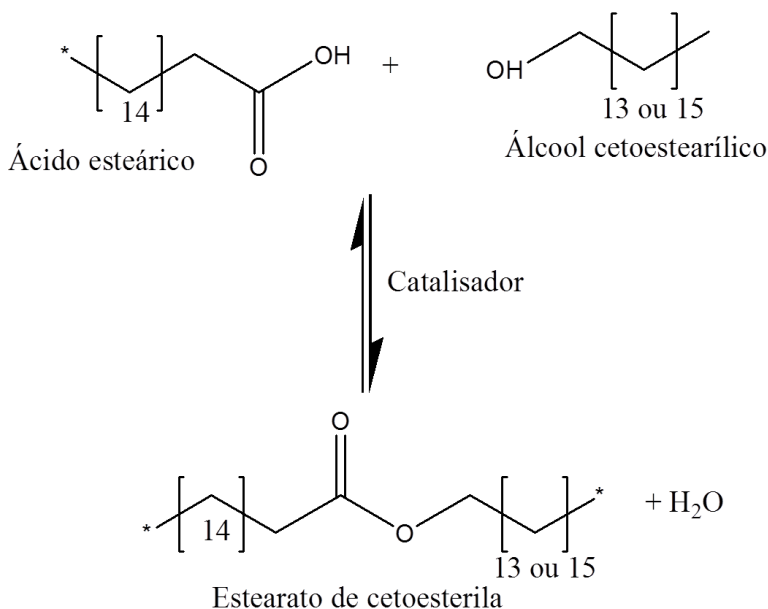
Em temperatura ambiente, os ésteres podem ser sólidos ou líquidos, dependendo da estrutura química dos ácidos e álcoois de origem. Se ambos os reagentes possuem cadeia longa, o resultado é um éster sólido, caso um dos reagentes possua cadeia curta o produto será

um éster líquido. Eles podem sofrer hidrólise em pHs extremos e em altas temperaturas (MORSELLI, 2014).

O estearato de cetoesterila é um éster obtido a partir de uma esterificação de álcoois e ácidos graxos (Figura 5). Estas matérias primas possuem baixo valor comercial e estão disponíveis em grande escala no mercado, viabilizando assim a sua utilização. São diversas as aplicações destes ésteres, com utilização principal em indústrias de alimentos, detergentes, cosméticos e farmacêuticos (MARTINEZ et al., 1988; CARTA et al., 1995).

Na Figura 4 pode-se observar um esquema da reação de esterificação do estearato de cetoesterila a partir do ácido esteárico e álcool cetoestearílico em presença de um catalisador, onde a reação gera uma molécula do éster graxo e uma molécula de água.

Figura 4: Reação de esterificação para produção do estearato de cetoesterila.



3.10. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Ultimamente vem surgindo à necessidade de uma mudança de processos e matérias primas com alto impacto ambiental para formas de produção que sejam ambientalmente amigáveis. Esta necessidade vem crescendo pela percepção da sociedade exigir produtos e serviços que não gerem danos ao meio ambiente.

Com isto, a comunidade acadêmica e empresarial promovem ações e debates, com a finalidade de integrar a responsabilidade socioambiental ao planejamento estratégico das organizações, especificamente na questão do meio ambiente.

Estas ações e debates não se tratam apenas de um ajuste às questões da legislação referente ao meio ambiente, mas também a pressão mercadológica de grupos de consumidores que estão preocupados com a compra de produtos de empresas que refletem valores corretos e morais, dos quais a preocupação com os aspectos ambientais é apenas um deles.

A partir destes fatos, surge a oportunidade de empresas e universidades desenvolverem pesquisas com novas tecnologias, formas de processamento de produtos e matérias primas que apresentem um baixo impacto ambiental,

Um exemplo claro destas tecnologias de baixo impacto ambiental é a produção de ésteres, que apresentam capacidade emoliente, a partir da reação de esterificação com auxílio de lipases, sendo que estes biocatalisadores substituem a utilização de catalisadores ácidos ou básicos, formando produtos “limpos” por não produzir subprodutos indesejáveis, devidos a especificidade da enzima, e demandarem temperaturas e pressões de processo bem menores que os utilizados convencionalmente, atraindo assim a atenção dos consumidores que estão preocupados com o impacto ambiental do produto. As enzimas também possuem outra vantagem, elas podem ser reutilizadas em diversas reações quando estão imobilizadas, sendo este aspecto de suma importância para a viabilidade econômica do processo.

Diante do exposto na seção da revisão bibliográfica, no que concerne ao estado da arte, fica evidente a importância da realização deste trabalho, apresentando uma nova forma de produção do estearato de cetoestearila, um éster emoliente que pode ser utilizado na formulação de cosméticos. Este trabalho apresenta um grande potencial para estudos científicos, sendo importante destacar, que até o momento não foram encontrados trabalhos disponíveis na literatura sobre

produção do estearato de cetoestearila produzido via esterificação enzimática; sendo este um trabalho pioneiro, dando início a uma nova forma de produção de ésteres emolientes para a indústria de cosméticos, que apresentam um baixo impacto ambiental, desta forma enriquecendo a literatura científica e propondo a aplicação de novas tecnologias ao setor industrial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Estão descritos, neste tópico, todos os materiais, metodologias e equipamentos utilizados para a realização dos experimentos. Todas as reações foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), pertencente ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina.

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Especificação dos reagentes

Para a realização das reações de esterificação foram utilizados dois reagentes, ácido esteárico vegetal e álcool cetosteárflico, ambos adquiridos da empresa ALMAD - Brasil.

Para a caracterização do produto foram utilizados os demais reagentes de grau analítico: éter etílico PA (Vetec), álcool etílico 99,8% (Vetec), hidróxido de potássio (Vetec) e solução do indicador fenolftaleína.

Para o processo de recuperação do catalisador enzimático foi utilizado n-hexano P.A., adquirido da empresa Synth – Brasil.

4.1.2. Catalisadores enzimáticos

Nas reações foram testadas duas lipases imobilizadas comerciais (Novozym 435 e NS 88011), ambas produzidas/imobilizadas e gentilmente cedidas pela empresa NOVOZYMES, Araucária-PR/Brasil.

A enzima Novozym 435 foi produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, e imobilizada em Lewatit VP OC 1600, uma resina macroporosa com uma superfície hidrofóbica. Ela é preparada via interface de ativação na superfície hidrofóbica do suporte. Essa enzima imobilizada é formada por partículas de formato esférico, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, e densidade de

aproximadamente 430 kg/m³. Segundo a Novozymes Brasil, essa enzima pode ser utilizada em uma faixa de temperatura que varia de 40-70 °C.

A lipase NS 88011 foi produzida a partir da lipase de *Candida antarctica* e imobilizada em uma resina polimérica hidrofóbica. NS 88011 sem maiores informações na literatura.

4.2 MÉTODOS

4.2.1. Equipamentos e Instrumento

Para as reações de esterificação foi utilizado um reator de aço inox com capacidade de 300 mL (Autoclave Engineers, modelo A303060B86000), que possui um sistema de agitação mecânico e uma serpentina interna para controle da temperatura, para o controle da temperatura foi acoplado um banho termostático (Microquímica, modelo MQBTZ99-20), uma bomba de vácuo (Quimis, modelo Q35502) e um vacuômetro (também foram acoplados ao reator), a fim de gerar vácuo no reator e medir esse vácuo gerado.

Na Figura 5 podemos observar todo o aparato experimental utilizado nas reações de esterificação. A direita da figura está à bomba de vácuo (Quimis), no centro o banho termostático (Microquímica) e a esquerda encontra-se o reator (Autoclave Engineers) com o vacuômetro acoplado.

Figura 5: Aparato experimental (reator, banho termostaticado, bomba de vácuo e vacuômetro).



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 5 pode-se observar o reator, o banho termostático e a bomba de vácuo. Após todos os aparatos serem acoplados ao reator, a temperatura desejada era selecionada, no banho termostático e então o banho era ligado, com circulação de água para aquecer a serpentina.

Abaixo na Figura 6, é possível observar o sistema de agitação mecânica e a serpentina interna.

Figura 6: Sistema de agitação mecânica e serpentina interna.



Fonte: Próprio autor.

Pode-se observar na parte superior da Figura 6 a serpentina e o agitador mecânico do reator utilizado para as reações de esterificação. Na parte inferior da imagem encontra-se o reator de aço inox, onde é realizada a reação. Após colocar os reagentes e o biocatalisador, o cilindro é erguido e fechado com o auxílio de parafusos. A utilização destes parafusos é de fundamental importância para a correta fixação do reator e também o fechamento adequado propicia a presença de vácuo após a bomba de vácuo ser acionada.

4.2.2. Metodologia experimental

Os reagentes, ácido esteárico e álcool cetosteárico, foram previamente pesados e aquecidos, em banho termostático, até seu ponto de fusão. Após atingir o ponto de fusão, os reagentes foram misturados, no reator de aço inox, e uma alíquota de aproximadamente 1 mL foi retirada para quantificar o índice de acidez inicial, após a retirada da amostra era adicionado ao reator o catalisador enzimático (lipase). O reator, com a mistura, foi acoplado aos demais equipamentos. Neste momento o banho termostático e a serpentina interna já estão em uma temperatura adequada para a reação. Após isso, a reação iniciava com o reator sendo fechado, e a bomba de vácuo e agitação sendo acionadas.

Na Figura 7 pode-se observar os reagentes álcool cetosteárico (esquerda) e ácido esteárico (direita), ambos sólidos em temperatura ambiente.

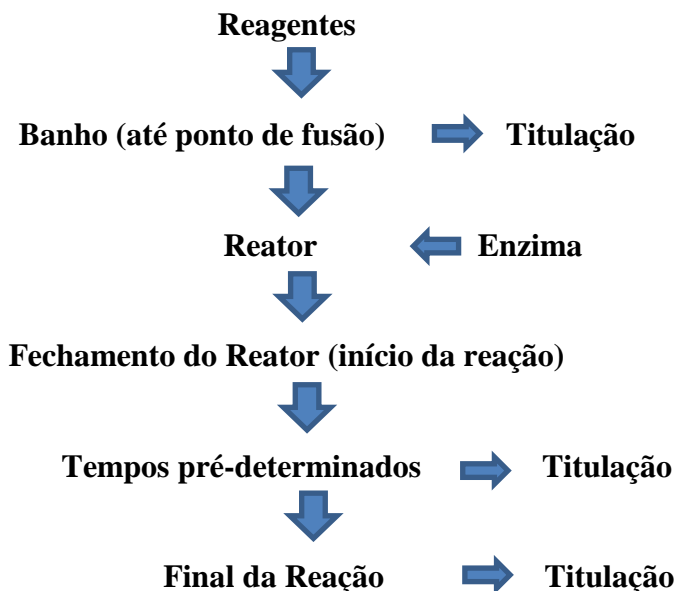
Figura 7: Reagentes (álcool cetosteárico (esquerda) e ácido esteárico (direita)).



Fonte: Próprio autor.

A seguir, na Figura 8, pode-se observar o fluxograma de produção do estearato de cetosteárico, onde é demonstrado o passo a passo do processo.

Figura 8: Fluxograma do processo de esterificação enzimática para produção de estearato de cetosteáril.



4.2.3. Testes preliminares

Para os testes iniciais, foram fixadas algumas condições experimentais: Agitação (600 rpm), temperatura (75 °C), vácuo (600 mmHg), razão molar (1:1) e tempo de reação (6 horas). Nestas condições, foram testadas duas diferentes lipases comerciais imobilizadas (Novozym 435 e NS 88011), em três diferentes concentrações (0,5; 1 e 2% da massa total de substratos). Para verificar a influência do catalisador na reação, também foi testada uma reação sem a adição do biocatalisador (controle). Todos estes testes foram feitos com o objetivo de se definir a concentração enzimática mais adequada para a obtenção do produto de interesse.

Após estes testes, foi avaliada a influência do vácuo na reação de esterificação. Para isto, foi selecionado aleatoriamente, o experimento 2% (m/m) da lipase NS 88011. Este experimento foi

realizado nas mesmas condições anteriormente citadas, porém sem a presença de vácuo.

Ao final dos testes preliminares, o experimento com a lipase NS 88011 na concentração de 1% (massa total dos substratos) foi selecionado, para que fosse feito um estudo cinético da reação. Esta cinética ocorreu nos tempos (0,1, 2, 3, 4 e 6 h), onde foi possível selecionar o tempo de reação a ser fixado para o planejamento experimental.

4.2.4. Otimização das condições experimentais para produção de estearato de cetosteáril

Com a lipase (NS 88011), a concentração do catalisador (1% da massa total dos substratos) e o tempo de reação (2 horas), selecionados, foi realizado um planejamento experimental fatorial DCCR 2³ com três pontos centrais e seis pontos axiais, totalizando 17 experimentos.

A Tabela 2 apresenta a faixa de estudo das variáveis independentes da matriz do planejamento experimental.

Tabela 1: Faixa de estudo das variáveis independentes da matriz do planejamento experimental.

	Níveis				
Variáveis	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	61,6	65	70	75	78,4
Razão Molar (ácido:álcool)	1:0,83	1:1	1:1,25	1:1,5	1:1,67
Agitação (rpm)	250,8	380	600	760	889,2

4.2.5. Avaliação cinética

Foi realizada avaliação cinética na condição otimizada: lipase NS 88011 (1% m/m), 75 °C, 760 rpm, vácuo (600 mmHg) e razão molar (1:1,5). Os tempos selecionados para análise do índice de acidez na cinética foram: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 31 e 48 h.

Também foi realizada avaliação cinética variando a concentração de enzimas na condição otimizada obtida no planejamento de experimentos. Foram estudadas variações na concentração enzimática de 0,5; 0,7 e 1% em relação à massa total dos reagentes, a fim de verificar a possibilidade de reduzir a quantidade de catalisador necessário para a síntese de estearato de cetoestearila.

4.2.6. Reuso do catalisador enzimático

Na condição otimizada no planejamento de experimentos foi realizado estudo do reuso do biocatalisador. As condições utilizadas foram: lipase NS 88011 (1% m/m), temperatura de 75 °C, razão molar de 1:1,5, agitação de 760 rpm, 2 horas de reação e vácuo de 600 mmHg. Após cada reação a enzima foi recuperada para uso no próximo ciclo de uso. A enzima foi separada do meio reacional, submetida a sucessivas lavagens com n-hexano e secagem em estufa 40 °C por 4 h. Para cada recuperação foram realizadas 3 lavagens, com aproximadamente 10 mL de n-hexano cada uma. Após esta etapa, a lipase era mantida em dessecador por no mínimo 12 horas e então usada em uma nova reação. Alíquotas de aproximadamente 1 g foram retiradas em tempos pré-determinados (0, 5, 8, 24, 31 e 48 h) para as análises de índice de acidez.

4.3. METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO

4.3.1. Método Titulométrico

As amostras coletadas foram analisadas através do método de titulação por hidróxido de potássico, segundo IUPAC 2.201. Este método foi escolhido, pois neste caso, pode substituir a utilização da cromatografia gasosa para a quantificação dos ácidos graxos. Na literatura são encontrados diversos trabalhos que podem comprovar a similaridade entre estes dois métodos (MARCHETTI e ERRAZU, 2010; SATYARTHI et al., 2010; LEMAIRE et al., 2011; ZHANG et al., 2012; SANTIN, 2014).

A utilização do método titulométrico para quantificar ácidos graxos possui diversas vantagens, tais como: rapidez na quantificação, baixo custo, não necessita a evaporação do excesso de álcool e a amostra pode ser quantificada sem a necessidade de fazer a remoção completa da água, que é produzida pela reação de esterificação.

Esta técnica consiste basicamente na determinação da acidez de um meio reacional. Os ácidos graxos livres presentes na amostra possuem a capacidade de reagir com a solução de hidróxido de potássio, a partir disto, é possível quantificar os ácidos graxos livres em miligrama de hidróxido de potássio por grama de amostra. Em geral, o índice encontrado é equivalente ao dobro do percentual dos ácidos graxos livres correspondentes da amostra.

4.3.2. Índice de acidez

A partir dos valores de volume de hidróxido de potássio gasto na titulação, medido na bureta, e do valor em gramas da amostra pesada, é possível determinar a porcentagem de ácidos graxos livres e o índice de acidez, este índice fornece a quantidade de ácido que foi consumido na reação de esterificação. Assim que a amostra é retirada do reator, ela é pesada (1 g da amostra) e diluída em 40 mL da solução de 1:1 éster/etanol. Logo em seguida são adicionadas de 3-4 gotas de fenolftaleína, e então esta mistura é titulada com hidróxido de potássio (0,1 M), sob agitação vigorosa até atingir o ponto de viragem. O índice de acidez é calculado conforme a Equação 1:

$$IA = \frac{(V_{KOH} * MM_{KOH} * C_{KOH})}{M_A}$$

(Equação 1)

Onde:

IA = Índice de acidez (mg de KOH/g);

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

MM_{KOH} = Massa molar de KOH (56,1 g/mol);

C_{KOH} = Concentração molar do KOH usado na titulação (mol/L);

M_A = Massa de amostra utilizada para titular (g).

Este índice é definido como a quantidade em miligramas de hidróxido de potássio que é necessário para que seja possível neutralizar um grama da amostra.

4.3.3. Conversão (%) em ésteres

Com os valores de índices de acidez inicial e final das reações é possível determinar o percentual de conversão dos ácidos graxos em ésteres na reação de esterificação. A Equação 2 apresenta o cálculo de conversão dos ácidos graxos em ésteres:

$$CONV_{ésteres} = \frac{(IA_{inicial} - IA_{final})}{IA_{inicial}} * 100$$

(Equação 2)

Onde:

CONV_{ésteres} = Conversão dos ácidos graxos em ésteres (%);

IA_{inicial} = Índice de acidez inicial (mg KOH/g);

IA_{final} = Índice de acidez final (mg KOH/g).

Com o valor de conversão é possível verificar a porcentagem dos reagentes (ácido esteárico e álcool cetosteárico) que foram convertidos em produto (estearato de cetosteárico).

4.3.4. Determinação do índice de iodo

A determinação do índice de iodo foi realizada através do método Wijs, o qual faz a mensuração do grau de instauração de óleos ou gorduras, expressos em termos do número de centigramas de iodo absorvido por grama da amostra (% iodo absorvido).

Este método é aplicável a todos os óleos e gorduras normais que não possuam ligações duplas conjugadas. Cada óleo possui um respectivo intervalo característico do valor de índice de iodo. A fixação do iodo ou de outros halogênios se dá nas ligações etilênicas dos ácidos graxos.

Para esta determinação a amostra foi fundida e filtrada através de papel filtro, para remover algumas impurezas sólidas e traços de umidade. Posteriormente foi pesado aproximadamente 0,25 g da amostra em frasco Erlenmeyer de 500 mL e logo após foi adicionado 10 mL de ciclohexano. Após este procedimento foi transferido para o erlenmeyer, com auxílio de bureta, 25 mL de solução de Wijs. A amostra foi agitada com movimento de rotação, assegurando perfeita homogeneização. Ao término da homogeneização, o frasco foi colocado em repouso ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, por 30 minutos. Após este tempo foi adicionada 10 mL da solução de iodeto de potássio a 15% e 100 mL de água recentemente fervida e fria. Para a determinação quantitativa foi realizada uma titulação com solução tiosulfato de sódio 0,1 M até o aparecimento de uma fraca coloração amarela. Logo após foi adicionada 1 a 2 mL de solução indicadora de amido 1% e foi titulado até o completo desaparecimento da cor azul. Também foi realizada uma determinação em branco, sendo realizado este procedimento, porém sem adição da amostra. Na equação abaixo está descrito o cálculo para o índice de iodo. O índice de iodo foi calculado através da Equação 3:

$$\text{Índice de Iodo} = \frac{(V_B - V_A) * M * 12,68}{P}$$

(Equação 3)

Onde:

M = molaridade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

VB = mL gasto na titulação do branco;

VA = mL gasto na titulação da amostra;

P = amostra (g).

4.3.5. Índice de Hidroxila (AOCS Cd 13-60)

Este índice é definido através da quantidade de miligramas de hidróxido de potássio equivalente ao conteúdo de radicais hidroxila por grama de amostra. Este índice indica a quantidade de hidroxilas que foram inseridas na molécula.

Para esta determinação, pesou-se em um balão de fundo redondo de 250 mL, 10 g da amostra de éster. Logo após adicionou-se 5 mL da mistura piridina-anidrido acético (3 volumes/1 volume) e colocou-se o balão em um banho-maria por 1 hora sobre refluxo. Após o aquecimento, foram adicionados 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 indicador de fenolftaleína e titulou-se com hidróxido de potássico alcoólico 0,5 M até a coloração rosa.

O mesmo procedimento foi realizado sem a presença da amostra para obter-se o branco. Paralelamente ao experimento anterior, foi pesado 9 g do éster em um Erlenmeyer para a determinação da acidez. Adicionou-se 10 mL de piridina e 1 mL de solução indicadora de fenolftaleína. Titulou-se com potassa alcoólica 0,5 M até a coloração ficar rosa. O índice de hidroxila foi determinado pela Equação 4:

$$IH = \left[B + \left(w * \frac{A}{C} \right) - S \right] * N * \frac{56,1}{W}$$

(Equação 4)

Onde:

A: Volume da solução de KOH necessária para titulação de acidez, em mL;

B: Volume da solução de KOH necessária para titular o branco, em mL;

C: Massa da amostra usada para a titulação da acidez, em g;

S: Volume da solução de KOH necessária para titular a amostra acetilada, em mL;

W: Massa da amostra usada para acetilação, em g;

N: Normalidade ou molaridade da potassa alcoólica.

4.3.6. Determinação do índice de Saponificação (AOCS. Cd 3-25)

Este método é definido para quantificar o álcali necessário para saponificar uma quantidade pré-determinada de amostra. Esta determinação é aplicável a todos os óleos e gorduras e expressa o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para saponificar um grama de amostra.

Para realizar este método a amostra deve ser fundida e filtrada em papel de filtro para remover quaisquer impurezas e traços de umidade. Após o término deste procedimento, cerca de 4-5 g da amostra foi pesado, e foram adicionados 50 mL da solução alcoólica de KOH.

A amostra pesada foi colocada em um condensador, e este foi conectado e colocado em banho-maria, até a completa saponificação da amostra (aproximadamente uma hora).

Após o resfriamento do frasco, foi lavada a parte interna do condensador com um pouco de água. Desconectou-se o condensador, e adicionou-se 1 mL do indicador e após foi realizada a titulação com a solução de ácido clorídrico 0,5 M até o desaparecimento da cor rósea. O cálculo foi realizado pela Equação 5.

$$IS = \frac{56,1 * M * (B - A)}{P}$$

(Equação 5)

Onde:

IS= índice de saponificação;

M= massa molar KOH;

A = volume gasto na titulação da amostra;

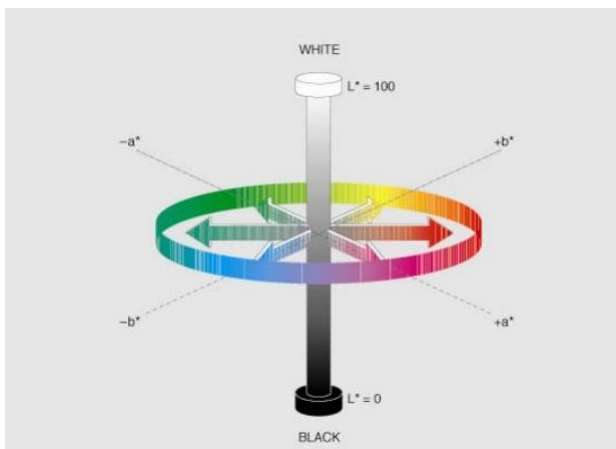
B = volume gasto na titulação do branco;

P = n° de g da amostra.

4.3.7. Determinação do índice de cor

A cor do éster obtido foi determinada pelo sistema CIE (*Comission Internationale d'Eclairage*) (HUNTERLAB, 2015), através das coordenadas de cor (L^* a^* b^*). Estas coordenadas podem ser definidas como: L^* indica a luminosidade das amostras, que varia do preto (0%) ao branco (100%), a^* é a coordenada de cromaticidade, ela varia do verde ao vermelho, e b^* que é a coordenada de cromaticidade que contém a variação do azul ao amarelo (KHAN et al., 2009). Na Figura 9 pode-se observar as coordenadas e suas respectivas faixas de variações.

Figura 9: Espaço de Cor CIELAB, com as coordenadas L^* , a^* , b^* .



Fonte: KHAN et al. (2009).

Para realizar esta determinação foi utilizado um espectrofotômetro portátil da marca KONICA MINOLVA, modelo CHROMA METER CR-400. Este instrumento de medição foi projetado para avaliar a cor de objetos, especialmente com superfícies em condições mais suaves ou com variação de cor mínima.

Segundo a Equação 7 foi possível calcular a diferença de cor (ΔE) a partir das coordenadas encontradas.

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

(Equação 7)

Onde:

L^* = luminosidade das amostras;

a^* = coordenada de cromaticidade (verde/vermelho);

b^* = coordenada de cromaticidade (azul/amarelo);

ΔE = diferença de cor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente capítulo tem por objetivo apresentar e discutir os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho que visou à produção de estearato de cetosteáril a partir da esterificação enzimática de ácido esteárico e álcool cetosteárilico.

5.1. TESTES PRELIMINARES

Para a determinação das condições experimentais que maximizem a produção de estearato de cetosteáril foram realizados testes iniciais com o objetivo de selecionar as melhores condições de concentração e tipo de enzima. As condições fixadas para este teste foram: razão molar de ácido/álcool (1:1), temperatura (75 °C), agitação (600 rpm), vácuo (600 mmHg) e tempo (6 horas de reação). Estas condições foram fixadas de forma aleatória, pois não foram encontrados estudos similares na literatura.

Na Tabela 2 pode-se observar que nestes testes iniciais foram variadas as concentrações enzimáticas em 0,5; 1 e 2% em relação a massa total dos reagentes. Nestas diferentes concentrações também foram testadas duas diferentes lipases (NS 88011 e Novozym 435). A fim de verificar a influência do biocatalisador, também foi realizada uma reação sem a presença do catalisador enzimático.

Para controle, foi realizado um ensaio nas mesmas condições dos testes iniciais, razão molar (1:1), temperatura (75°C), agitação (600 rpm), vácuo (600 mmHg) e tempo (6 horas), porém sem a presença do catalisador enzimático. Os valores iniciais de índice de acidez encontrados nos ensaios foram de aproximadamente 120 mg KOH/g, para o ensaio controle, após as 6 horas de reação o valor de índice de acidez encontrado foi de 113,7 mg KOH/g. Com isso, podemos verificar que a presença do biocatalisador é fundamental para auxiliar na conversão de reagentes em produtos, pois o ensaio controle apresentou um valor de conversão muito baixo, somente 5,3% dos reagentes se transformaram em produto, no tempo de 6 horas.

Tabela 2: Avaliação das Lipases Novozym 435 e NS 88011 em diferentes

Biocatalisador	Índice de acidez (mg KOH/g)	Conversão (%)
0.5% Novozym 435	12.7	89.4
0.5% NS 88011	14.4	88
1% Novozym 435	12.5	89.6
1% NS 88011	10.1	91.6
2% Novozym 435	12.4	89.7
2% NS 88011	8.9	92.6

concentrações sobre a síntese de Estearato de Cetoestearila. Condições: razão molar (1:1), temperatura (75°C), agitação (600 rpm), vácuo (600 mmHg) e tempo (6 horas).

Para estes experimentos o desvio padrão amostral foi calculado, com o objetivo de medir a dispersão dos resultados. Porém como o resultado encontrado foi relativamente baixo, valor menor que dois (2), este desvio não foi inserido no gráfico, pois a sua visualização fica imperceptível.

A partir destes testes pode-se observar que quando a reação ocorreu com a presença de um catalisador enzimático, esta apresentou baixos níveis de índice de acidez (8,9 - 14,4 mg KOH/g) em comparação com a reação que ocorreu sem a adição da lipase (113,7 mg KOH/g). A reação que ocorreu sem a presença da lipase apresentou um alto índice de acidez, mostrando um baixo

valor de conversão dos reagentes em produtos, já que em 6 horas de reação o índice de acidez passou de 122,6 mg KOH/g (I.A. inicial) para 113,7 mg KOH/g.

Com isso pode-se concluir que a presença do biocatalisador na reação de esterificação influenciou de modo positivo, aumentando a velocidade da transformação de substratos em produtos. Também foi possível concluir que as lipases testadas apresentaram atividade de esterificação, auxiliando na conversão dos materiais graxos em ésteres.

Quando a lipase NS 88011 na concentração de 2% (m/m) foi utilizada o valor do índice de acidez, na reação de 6 horas, passou de 119,7 mg KOH/g para 8,9 mg KOH/g, demonstrando um alto valor de conversão dos ácidos graxos em ésteres, um resultado satisfatório, pois no tempo de 6 horas de reação a quantidade de reagente (ácido graxo) que reagiu é extremamente alta em comparação com a reação que não possui um biocatalisador.

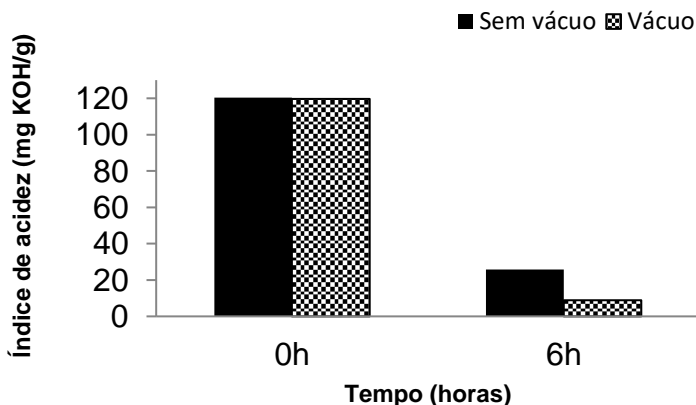
Em relação à comparação do tipo da enzima, pode-se destacar a enzima NS 88011, pois ela apresentou valores de índice de acidez (8,9 – 14,4 mg KOH/g) similares aos da enzima Novozym 435 (12,4 – 12,7 mg KOH/g), sendo que a NS 88011 apresenta maior viabilidade econômica, pois ela possui um valor comercial inferior ao da lipase Novozym 435. Com isso, a lipase NS 88011 foi selecionada para a próxima etapa do estudo.

A partir destes resultados foi selecionada a porcentagem de um (1% m/m) para a enzima NS 88011, pois nesta condição, o valor de índice de acidez obtido foi satisfatório no tempo reacional de 6 horas (10,1 mg KOH/g), apresentando um valor menor que o gerado pela enzima Novozym 435 (12,5 mg KOH/g).

5.2. INFLUÊNCIA DO VÁCUO

Após a realização dos testes iniciais, foi avaliada a influência do vácuo na síntese enzimática. Para isto, foi selecionado aleatoriamente, o experimento 2% m/m de lipase NS 88011. Este experimento foi reproduzido, nesta etapa, sem a presença de vácuo. Os resultados estão expressos na Figura 10.

Figura 10: Avaliação da influência do vácuo na reação de esterificação. Condições: concentração de biocatalisador 2% (m/m), razão molar 1:1, temperatura 75°C, agitação 600 rpm e tempo de 6 horas.



Para a avaliação da influência do vácuo na reação de esterificação, também foi realizado um desvio padrão amostral. Porém, devido ao baixo valor encontrado, menor que dois (2) este desvio não foi inserido no gráfico, pois a sua visualização fica imperceptível.

Após analisar a Figura 10 foi possível verificar a influência do vácuo (600 mmHg) na reação de esterificação. O experimento sem presença de vácuo apresentou valor de índice de acidez inicial de 120,3 mg KOH/g, após 6 horas de reação este índice baixou para 25,8 mg KOH/g. Já para o experimento com a presença de vácuo (600 mmHg), o valor inicial de índice de acidez que era de 119,7 mg KOH/g passou para 8,9 mg KOH/g após as 6 horas de reação.

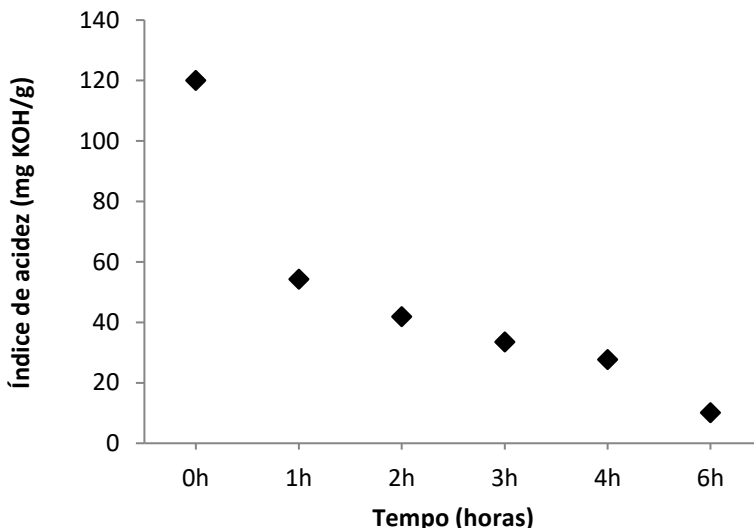
Com isso, pode-se observar que a reação com a presença de vácuo apresentou aproximadamente um terço (1/3) do valor de índice de acidez do experimento sem a presença de vácuo. Portanto, a presença de vácuo é fundamental para uma síntese enzimática eficiente; este fato ocorre, principalmente, porque a presença de vácuo auxilia na retirada do excesso de água que é formado na reação de esterificação.

Segundo Yang e Russel (1996), o excesso de água na reação prejudica a eficiência do processo, pois facilita a agregação da enzima podendo provocar um decréscimo de sua atividade.

5.3. CINÉTICA REACIONAL

Após a seleção de uma condição inicial, razão molar de ácido/álcool (1:1), temperatura (75 °C), agitação (600 rpm), vácuo (600 mmHg), tempo (6 horas de reação) e concentração enzimática de 1% m/m de NS 88011, foi feito um estudo cinético da síntese enzimática para produção do éster a fim de selecionar o tempo de reação que será utilizado para um estudo da otimização da síntese. A Figura 11 apresenta os resultados obtidos nesta etapa.

Figura 11: Cinética reacional da síntese enzimática para seleção do tempo reacional. Condições: razão molar de ácido/álcool 1:1, temperatura 75 °C, agitação 600 rpm, vácuo 600 mmHg, tempo de reação 6 horas e concentração de 1% m/m de NS 88011.



O desvio padrão amostral foi calculado, para a cinética da síntese enzimática. Este desvio foi calculado para medir a dispersão dos resultados de índice de acidez. Como os valores dos desvios foram menos que dois (2), estes desvios acabaram não sendo inserido no gráfico, pois a sua visualização fica imperceptível.

Após avaliar a cinética reacional nas condições apresentadas acima foi possível observar, na Figura 11 que, de modo geral, o aumento do tempo reacional conduz a um aumento de conversão dos reagentes graxos em ésteres graxos, pois com o passar do tempo observa-se a diminuição do índice de acidez. Porém, a seleção de um tempo reacional para a realização do planejamento experimental deve levar em conta não só a conversão dos

reagentes em produtos, mas também a otimização do tempo e a economia de energia.

Após análise da cinética da reação de esterificação, Figura 11, pode-se verificar que no tempo zero (0), antes do início da reação, o

valor encontrado para o índice de acidez foi de 120 mg KOH/g. Após o tempo de uma (1) hora de reação, o valor de índice de acidez foi novamente medido, e o valor encontrado foi de 54,3 mg KOH/g. Com isso, pode-se observar que após uma (1) hora de reação, o valor do índice de acidez reduziu pela metade. Ao final da segunda hora de reação, o valor do índice de acidez continuou reduzindo (41,9 mg KOH/g). Na terceira hora de esterificação, o valor de índice de acidez encontrado foi de 33,5 mg KOH/g. Para a quarta hora de reação, o valor do índice de acidez continuou baixando, chegando a 27,7 mg KOH/g, aproximadamente um quarto do valor inicial do índice de acidez. No último ponto da cinética estudado, seis (6) horas de esterificação, o valor do índice de acidez encontrado foi de 10,1 mg KOH/g. Levando em consideração estes resultados, para a próxima etapa do trabalho foi selecionado o tempo reacional de duas (2) horas. Além de ser um baixo tempo reacional, possibilitando a realização de diversos experimentos em um curto período de tempo, o mesmo está relacionado a um baixo consumo de energia. Outra vantagem que se pode destacar é o fato de que em 2 h de reação os valores encontrados de índice de acidez podem ser considerados satisfatórios, pois neste tempo estes valores diminuiriam mais que a metade (41,9 mg KOH/g) quando comparados com o índice de acidez inicial da reação (120 mg KOH/g (tempo 0h)).

5.4. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ESTERIFICAÇÃO

Após definida a lipase mais eficiente e sua respectiva concentração (NS 88011, 1% m/m) e o tempo de reação (2 h), foi realizado um planejamento experimental DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) 2^3 com três pontos centrais e seis pontos axiais, totalizando 17 experimentos. As variáveis que foram estudadas neste planejamento foram a temperatura, a razão molar e a agitação, a partir destas variáveis, foi possível analisar o índice de acidez e a conversão do ácido graxo e álcool graxo em estearato de cetosteáril.

Através da tabela 3 é possível destacar a elevada reprodutibilidade dos ensaios, que apresentaram valores próximos em seus pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11), com as respectivas conversões de 61, 61 e 63%.

Também é possível observar o comportamento das reações com a variação da temperatura, onde em todos os casos, quando houve só a mudança da variável temperatura, esta influenciou de maneira positiva,

sendo que quanto maior a temperatura maior a conversão em ésteres. Esse comportamento pode ser observado nos ensaios 7 e 8, onde ambos tiveram a razão molar (1:1,5) e a agitação (760 rpm) fixadas e a temperatura variando de 65 (ensaio 7) para 75 °C (ensaio 8). Com esta variação na temperatura observou-se um aumento na conversão dos reagentes em produtos de 72 (ensaio 7) para 79% (ensaio 8). Na Tabela 3, é possível observar as variáveis do planejamento experimental com seus valores reais e codificados.

Outra variável que apresentou influência sobre a reação de esterificação foi a razão molar. Quando fixados os valores de temperatura e agitação, foi possível observar que com o aumento da razão molar houve um aumento de conversão em ésteres. Isso pode ser observado nos ensaios 6 e 8, onde ambos tiveram a variável temperatura (75 °C) e a variável agitação (760 rpm) fixadas. No ensaio 6 a razão molar utilizada foi de 1:1 (ácido/álcool) e o valor de conversão foi de 61%, enquanto que no ensaio 8 a razão molar utilizada foi de 1:1,5 (ácido/álcool) e o valor de conversão foi de 79%.

O aumento da razão molar influenciou de maneira positiva na conversão, pois quando o álcool é usado em excesso ele assegura o deslocamento do equilíbrio da reação em função da síntese, e minimiza as limitações de difusão. Porém, níveis excessivos de álcool provocam a inibição da atividade enzimática, diminuindo sua atividade (RODRIGUES, 2009).

Quando a temperatura e a razão molar foram fixadas nos ensaios, foi possível observar que com o aumento da agitação na reação houve um aumento da taxa de conversão. Isso ocorre, pois com o aumento da agitação também se aumenta a homogeneidade do meio, fazendo com que as enzimas estejam em maior contato com o substrato, acelerando a reação química.

A influência da agitação pode ser observada quando comparados os ensaios 4 e 8. Nestes ensaios as variáveis razão molar e a temperatura foram fixadas em 1:1,5 e 75 °C, respectivamente. A reação do ensaio 4 ocorreu com uma agitação de 380 rpm, o que resultou em um valor de conversão dos reagentes em produto de 64%. No ensaio 8 a reação teve uma agitação de 760 rpm, conduzindo a um valor de conversão de 79%.

A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento com os valores codificados e reais das variáveis, juntamente com os valores de índice de acidez e conversão obtidas para cada experimento.

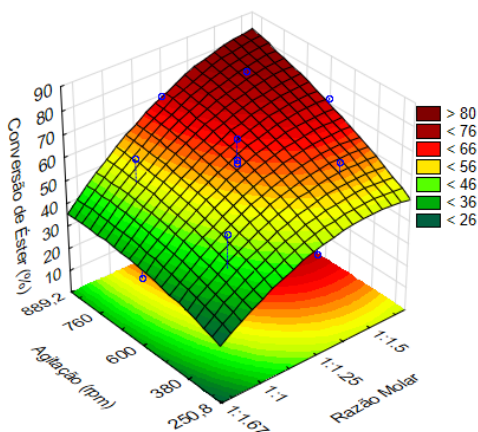
Tabela 3: Matriz do planejamento de experimentos realizados com a concentração de catalisador enzimático de 1% m/m e tempo reacional de 2 horas (valores reais e codificados).

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão Molar (ácido:álcool)	Agitação (rpm)	AGL (%)	I. A.	Conversão (%)
1	-1 (65)	-1 (1:1)	-1 (380)	29,3	57,8	38
2	1 (75)	-1 (1:1)	-1 (380)	21,3	42	55
3	-1 (65)	1 (1:1,5)	-1 (380)	20,9	41,1	57
4	1 (75)	1 (1:1,5)	-1 (380)	17,1	33,8	64
5	-1 (65)	-1 (1:1)	1 (760)	25,4	50,1	46
6	1 (75)	-1 (1:1)	1 (760)	18,3	36,1	61
7	-1 (65)	1 (1:1,5)	1 (760)	13,4	26,4	72
8	1 (75)	1 (1:1,5)	1 (760)	10,8	21,3	79
9	0 (70)	0 (1:1,25)	0 (600)	18,7	36,9	61
10	0 (70)	0 (1:1,25)	0 (600)	18,5	36,5	61
11	0 (70)	0 (1:1,25)	0 (600)	17,3	34	63
12	-1,68 (61,6)	0 (1:1,25)	0 (600)	20,3	40	57
13	1,68 (78,4)	0 (1:1,25)	0 (600)	13,2	26	72
14	0 (70)	-1,68 (1:0,83)	0 (600)	21,7	42,8	30
15	0 (70)	1,68 (1:1,67)	0 (600)	13,3	26,2	72
16	0 (70)	0 (1:1,25)	-1,68 (250,8)	24,2	47,6	44
17	0 (70)	0 (1:1,25)	1,68 (889,2)	14,2	28	70

Após a realização do planejamento, também foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para que fosse possível encontrar os efeitos das combinações entre as variáveis na reação de esterificação. Na Figura 12 pode-se observar a superfície de resposta com o comportamento das variáveis: razão molar e agitação, a fim de se obter a conversão do éster graxo. Ao analisar a combinação das variáveis pode-

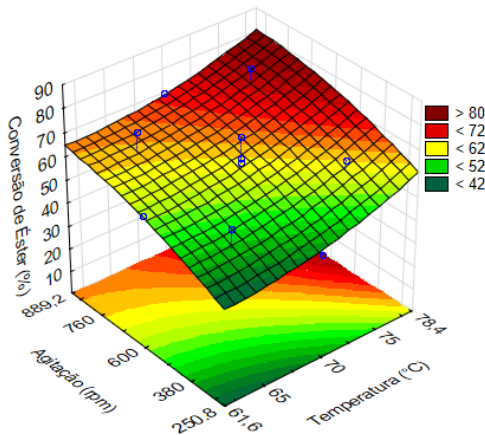
se observar que ambas influenciam de forma positiva a conversão do éster.

Figura 12: Superfície de resposta gerada a partir da combinação das variáveis, agitação e razão molar.



A Figura 13 mostra o comportamento da conversão de éster em função das variáveis agitação e temperatura. Como pode-se observar, neste caso as variáveis também apresentaram uma significância positiva, onde tem-se maiores valores de conversão quando ocorre aumento simultâneo da agitação e temperatura.

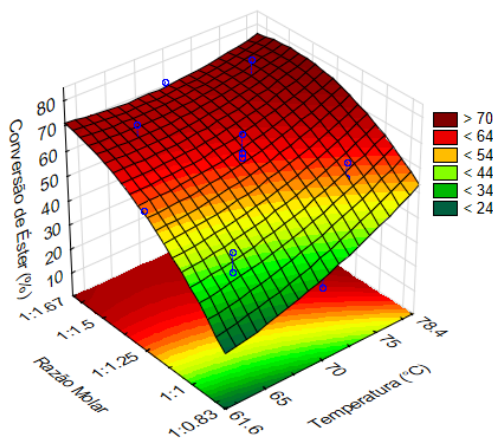
Figura 13: Superfície de resposta gerada a partir da combinação das variáveis, agitação e temperatura.



Na superfície de resposta gerada pela combinação das variáveis, razão molar e temperatura, Figura 14, é possível observar que os maiores valores de conversão ocorreram principalmente quando a variável razão molar estava com excesso de álcool.

A partir desta análise estatística foi gerada uma equação referente ao modelo. Esta equação, cujo seu R^2 foi de 0,9728, pode ser observada a seguir.

Figura 14: Superfície de resposta gerada a partir da combinação das variáveis, razão molar e temperatura.



A partir da Equação 7, foi realizado o cálculo da conversão de reagentes graxos em produtos.

$$\text{Conversão (\%)} = 61,54 + 5,21 * T + 10,44 * \text{RM} - 3,38 * \text{RM} * \text{RM} + 6,42 * \text{AG}$$

(Equação 7)

Onde:

T = Temperatura;

RM = Razão Molar;

AG = Agitação.

Após a análise dos resultados, o ensaio 8 do planejamento experimental (enzima NS 1% m/m, 2 horas de reação, temperatura 75 °C, razão molar ácido/álcool de 1:1,5, agitação de 760 rpm e vácuo de 600 mmHg) foi selecionado, pois o valor de conversão dos substratos

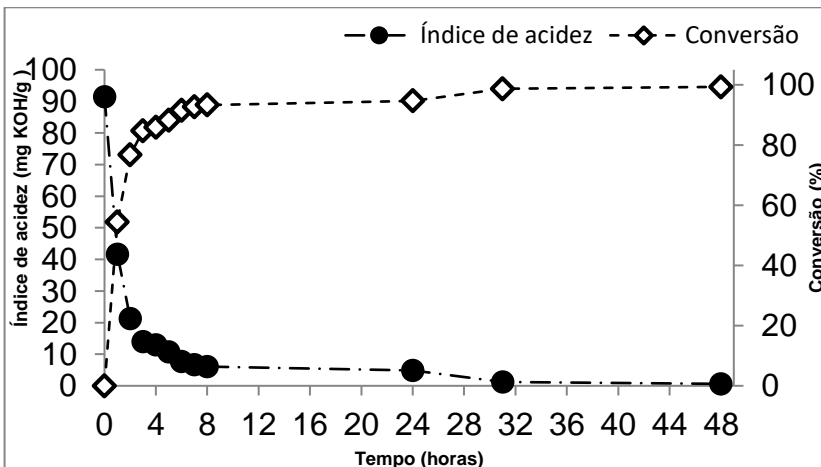
em produto foi de 79% (índice de acidez de 21,3 mg KOH. g⁻¹), sendo a conversão mais elevada entre todos os ensaios.

5.5. CINÉTICA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE ESTEARATO DE CETOESTEARILA NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

Após o término do planejamento experimental foi selecionado o ensaio oito (8), por este ter apresentado os resultados mais satisfatórios (maior valor de conversão de substratos em produto), para que fosse realizado um estudo cinético, a fim de conhecer o comportamento da esterificação nestas condições ao longo do tempo.

No estudo cinético foi avaliado o valor de índice de acidez (mg KOH g⁻¹) e o valor de conversão dos reagentes em produto, ambos os resultados foram avaliados em função do tempo de reação. O estudo cinético da Figura 15 foi realizado a partir das condições otimizadas do ensaio 8 (1% m/m de NS 88011, vácuo de 600 mmHg, 75 °C, 760 rpm e razão molar de 1:1,5).

Figura 15: Avaliação cinética de 48 horas da reação de esterificação em condições otimizadas. Condições: biocatalisador NS 88011 (1% m/m), vácuo (600 mmHg), temperatura de 75°C, agitação de 760 rpm, razão molar 1:1,5 (ácido/álcool) e tempo de 48 horas.



Os valores dos desvios padrões amostrais foram calculados, porém como o resultado encontrado foi relativamente baixo, valor menor que dois (2) este desvio não foi inserido no gráfico, pois a sua visualização ficaria imperceptível.

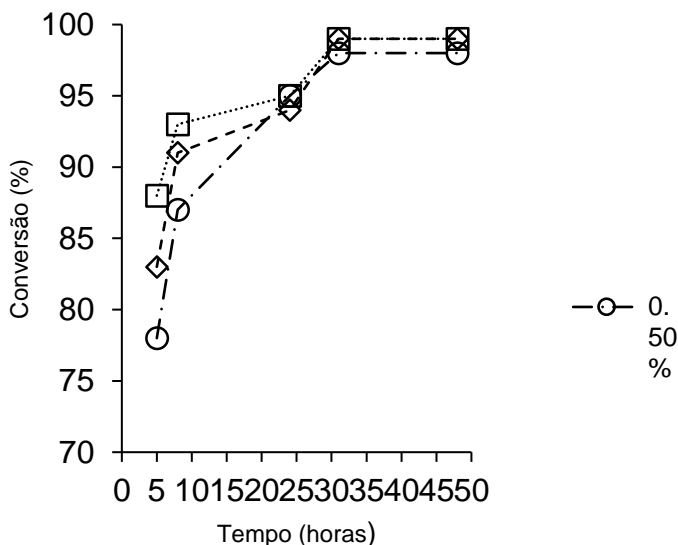
Após analisar a Figura 15, pode-se verificar o comportamento do índice de acidez e da conversão de substratos em produto. Em uma hora de reação, o valor de conversão encontrado foi de 54%, mostrando que em apenas uma hora, mais da metade dos substratos graxos foram convertidos em ésteres graxos. Na segunda hora de reação, o valor de conversão subiu para 77%, apresentando um valor de índice de acidez de 21,3 mg KOH/g. Após o tempo de 24 horas de reação, o valor de índice de acidez encontrado foi de 4,8 mg KOH/g, sendo que o valor de conversão dos substratos em produto para este tempo foi de 95%. Após 31 horas a conversão dos substratos em produto foi praticamente completa, apresentando 99% de conversão. Para este tempo reacional, o valor de índice de acidez encontrado foi de 1,2 mg KOH/g. Após as 48 horas de reação o valor de conversão se manteve em 99%, porém pode-se observar que o valor de índice de acidez reduziu para 0,6 mg KOH/g. Este valor de índice de acidez encontrado é 8 vezes menor que o valor encontrado na reação de 24 horas (4,8 mg KOH/g), e é metade do valor de índice de acidez encontrado nas 31 horas de reação (1,2 mg KOH/g).

Ao fim do estudo cinético, pode-se observar que após as 48 horas de reação o valor de conversão de 99% e o baixo índice de acidez 0,6 mg KOH/g, mostram que com estas condições otimizadas (1% m/m de NS 88011, vácuo de 600 mmHg, 75 °C, 760 rpm e razão molar de 1:1,5) e tempo de 48 horas a reação de esterificação apresentou uma grande eficiência para produção de éster derivado de materiais graxos.

5.6. INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ENZIMÁTICAS

Após o estudo cinético do experimento 8, foram feitos testes com diferentes concentrações enzimáticas (0,5; 0,7; e 1% m/m) utilizando a lipase NS 88011, nas mesmas condições experimentais definidas anteriormente, com o objetivo de verificar a influência desta variável no processo de esterificação de interesse nesse estudo. Podem-se observar, na Figura 16, os resultados obtidos nesta etapa do estudo.

Figura 16: Comparação das conversões em diferentes concentrações da lipase NS 88011. Condições experimentais: vácuo de 600 mmHg, temperatura de 75 °C, agitação de 760 rpm, razão molar 1:1,5 (ácido/álcool) e tempo de 48 horas.



A medida de dispersão dos resultados apresentou uma pequena variação. Sendo que o desvio padrão encontrado, em todos os casos, foi inferior a dois (2). Com isto, estes valores não foram inseridos no gráfico, pois a sua visualização ficaria imperceptível.

É possível observar que quanto maior a porcentagem de enzima utilizada na reação, menor foi o índice de acidez (mg KOH/g) encontrado. Após o término da reação (48 h) o valor de índice de acidez encontrado na concentração de 0,5% de enzima foi 2,1 mg KOH/g. Na concentração de 0,7% o valor de índice de acidez foi de 1 mg KOH/g. Já na maior concentração enzimática (1%) foi encontrado o menor índice de acidez (0,6 mg KOH/g).

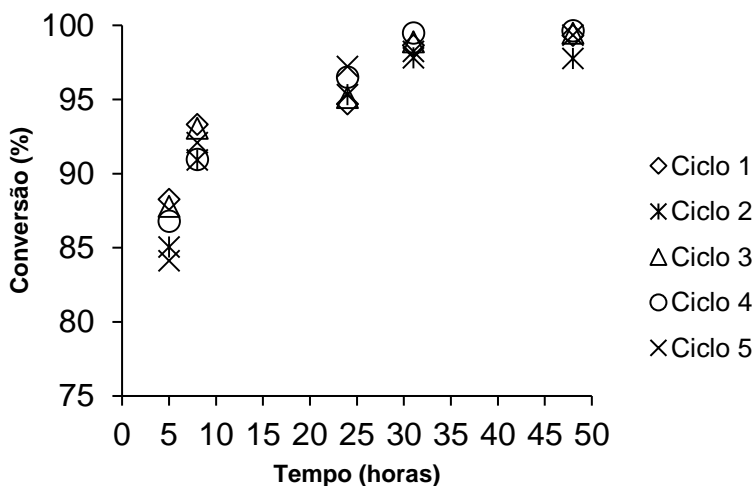
Já os valores de conversão encontrados foram extremamente próximos, para o experimento com concentração de 0,5% o valor de conversão em 31 h foi de 98%. Já para as reações com 0,7 e 1%, os valores encontrados foram de 99% de conversão em 31 h. Após a análise destes resultados, a concentração de 1% m/m da NS 88011 foi selecionada, para o estudo do reuso do biocatalisador. Este valor de 1%

m/m foi escolhido, pois conduziu ao menor índice de acidez (0,6 mg KOH/g).

5.7. REUSO DO CATALISADOR ENZIMÁTICO

Ao final da avaliação cinética, na condição otimizada do ensaio 8, foi realizado um estudo sobre a reutilização do catalisador enzimático, para que fosse possível avaliar quantos ciclos de reação o mesmo biocatalisador suporta, sem perder sua atividade. Na Figura 17 pode-se observar os cinco (5) ciclos de reuso que foram realizados a partir das condições do experimento 8 do planejamento experimental.

Figura 17: Reuso do catalisador enzimático (NS 88011) na reação de esterificação para produção do estearato de cetosteáril. Condições experimentais: biocatalisador NS 88011 (1% m/m), vácuo de 600 mmHg, temperatura de 75 °C, agitação de 760 rpm, razão molar 1:1,5 (ácido/álcool) e tempo de 48 horas.



No estudo do reuso do biocatalisador também foi calculado o padrão amostral. Mas devido ao pequeno desvio encontrado, valores

menores que dois (2), estes resultados não forem incorporados na Figura 17. Pois a visualização de tais valores ficaria imperceptível.

Na Figura 17 é possível observar que após os cinco (5) ciclos de reutilização do catalisador enzimático (NS 88011), têm-se conversões de 99% em todos os cinco ensaios, o que demonstra a viabilidade para a utilização da lipase imobilizada de baixo custo NS 88011 em reações de esterificação para produção de estearato de cetosteáril. Nestas cinco reações os valores de índice de acidez variaram de 0,3 a 0,7 mg KOH/g. Neste estudo de reuso enzimático foi possível, então, verificar uma grande estabilidade do biocatalisador nas condições avaliadas.

5.8. CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO OBTIDO

5.8.1. Determinação do índice de iodo

Este método é utilizado convencionalmente na indústria para caracterizar os ésteres graxos produzidos para a indústria de cosméticos. Com a determinação deste índice é possível medir o grau de insaturação do material graxo. Após a determinação do índice de iodo pelo método Wijs, foi possível verificar que o valor encontrado foi de zero (0) centigramas de iodo absorvido por grama da amostra (% iodo absorvido). Este valor já era esperado, pois o estearato de cetosteáril não apresenta ligações insaturadas.

5.8.2. Índice de hidroxila

Este valor indica a quantidade de hidroxilas que estão presentes na amostra analisada. Este índice é definido através da quantidade de miligramas de hidróxido de potássio equivalente ao conteúdo de hidroxila de 1 g da amostra. Após realizar este método, AOCS Cd 13-60, foi encontrado o valor de 17,06 mg KOH/g. Ressaltando que este resultado não possui um valor padrão definido, dependendo unicamente da exigência da empresa, que irá adicionar este material graxo na formulação de cosméticos e produtos de higiene pessoal.

5.8.3. Determinação do índice de saponificação

A partir da determinação do índice de saponificação, AOCS Cd 3-25, é possível determinar a quantidade de álcali que é necessário para saponificar uma quantidade definida de amostra. Este método expressa o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para saponificar um grama da amostra. Após a análise encontrou-se o valor de 133,68 mg KOH/g, ressaltando que não existe um valor específico para este produto, ele vai depender da função que o éster graxo irá desempenhar na formulação de cosméticos.

5.8.4. Determinação da cor

Os dados espectrofotométricos do estearato de cetosteáril foram obtidos através de medição direta pelo espectrofotômetro portátil CHROMA METER CR-400. As medições foram realizadas em três diferentes pontos da camada externa e em três diferentes pontos da camada interna do éster. Os resultados foram convertidos para o sistema CIE e os valores das coordenadas ΔL^* , Δa^* , Δb^* e ΔE estão representados na Tabela 4.

Tabela 4: Média das variações externas e internas das coordenadas das cores do éster.

Amostras	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE
Medida Externa	72,96	-0,59	-0,67	72,95
Medida Interna	68,89	-0,36	0,13	68,89

ΔL^* : diferença de luminosidade; Δa : diferença entre os tons de verde/vermelho; Δb^* : diferença entre os tons de laranja/azul; ΔE : variação da coloração.

Pequenas diferenças de cores podem ser encontradas por um instrumento de medição. Estas pequenas diferenças podem ser observadas na Tabela 4, onde a variação da coloração (ΔE) apresentou valores aproximados para a medida externa (72,95) e medida interna (68,89) do éster. Estes valores apresentados mostram que o produto da reação de esterificação apresenta uma coloração com tendência para cor branca, sem grandes interferências de outros tons de cores.

6. CONCLUSÕES

Como primeira etapa deste trabalho foram avaliados três fatores: a influência da presença e tipo de lipase na reação e a concentração deste biocatalisador (0,5; 1 e 2% da massa total de substratos). Como segunda etapa, foi realizado um estudo sobre a influência da presença de vácuo na reação de esterificação. Após este estudo, foi realizado um planejamento experimental visando à otimização das condições experimentais, onde foi possível selecionar uma condição otimizada (1% do catalisador NS 88011, vácuo de 600 mmHg, agitação de 760 rpm, temperatura de 75 °C e razão molar de 1:1,5).

Nestas condições, o valor de conversão de reagentes em produtos encontrado foi de 79%, para uma reação de 2 horas. A partir disto foi realizado um estudo cinético, nas mesmas condições anteriores, porém com o tempo reacional de 48 horas, onde a conversão encontrada foi de 99% e o do índice de acidez foi de 0,6 mg KOH/g. Após, foi feito um estudo sobre o reuso do biocatalisador, o qual foi realizado em cinco (5) reações distintas com as mesmas condições de operação otimizada, sendo que o biocatalisador não perdeu sua atividade, mantendo sua taxa de conversão em 99% nas 5 reações consecutivas.

De um modo geral, este trabalho atendeu ao objetivo proposto, sendo a avaliação da síntese enzimática de estearato de cetosteáril, utilizando lipases comerciais imobilizadas em sistema livre de solvente. Os resultados obtidos permitem concluir que é viável a utilização da lipase imobilizada NS 88011 como catalisador na reação de esterificação, pois ela propicia altas conversões de estearato de cetosteáril e também pode ser reutilizada diversas vezes, sem perder sua eficiência. Com isso é possível baixar o custo do processo, permitindo assim a aplicação do éster em formulações comerciais de cosméticos.

7. REFERÊNCIAS

AL SAADI, A. N.; JEFFREYS, G. V. Esterification of butanol in a two phase liquidliquid system. **Alche Journal**, v. 27, pp. 754-772, 1981.

Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos – ABIHPEC. Panorama do Setor de HPPC. São Paulo, 2016.

BERGER, R.G. Biotechnology of flavours – the next generation. **Biotechnology letters**, v.31, p.1751-1659, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. RDC N°211, de 14 de Julho de 2005, Definição e Classificação de Produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme anexos I E II. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de Julho de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. RDC N°4, de 30 de Janeiro de 2014, Dispõe sobre requisitos técnicos para regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 31 de Janeiro de 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA. Resolução CONAMA n° 001, de 23 de janeiro de 1986. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/index.cfm> > Acesso em 04 de maio de 2017.

CARTA, G.; GAINER, J. L.; ZAIDI, A. "Fatty acid esterification using nylon immobilized lipase". **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, pp. 601-605, 1995.

CASTRO, H. F. "Fine chemicals by biotransformation using lipase". **Química Nova**, v. 18, n. 6, pp. 544-554, 1995.

CHOW, C. K. Fatty acids in foods and their health implications. 3 rd. ed. CRC Press. 2008.

CORRÊA, M. A. Cosmetologia Ciência e Técnica. São Paulo, **Medfarma**. p. 492, 2012.

CORRÊA, M. A. Cosmetologia teórica e pratica. Araraquara, SP. Curso de Cosmetologia ministrado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2011.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. **Química Nova** 2004, 27, 623.

DIAS, M. O. S.; TSUKAMOTO, J.; FRANCO, T. T. Síntese de acrilatos de açúcares por biocatálise. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Campinas, SP. Campinas: COBEQ, p. 01-06, 2005.

FACCIO, C. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DA ALCOÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim. Erechim, f. 86, 2004.

FERREIRA, Andrea Filipa Perfeito. Suporte técnico à produção e comercialização de produtos cosméticos e detergentes. Dissertação -

Curso de Engenharia Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, f. 211, 2010.

FROST, G. M. e MOSS, D. A. “Production of enzymes by fermentation”. J. F. Kennedy (ed), **Biotechnology Enzyme Technology**, v. 7A , VCH Publishers, 1987.

GALEMBECK, F.; CSORDAS, Y. Cosméticos: a química da beleza. PUC RIO, 2010. Disponível em <http://web.ccead.pucrio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/cont_eudos/SL_cosmeticos.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2017.

GAMBARRA NETO, F. F. Classificação de óleos vegetais utilizando voltametria de onda quadrada e métodos quimiométricos. Dissertação de mestrado/UFPB, 2008.

GANDHI, N. N. Applications of Lipase. J. Am. **Journal of the American Oil Chemist Society**, v. 74, n. 27, p. 621-634, 1997.

GONÇALVES, J, S.; HENKES, J. A. PRODUÇÃO DE COSMÉTICOS DE FORMA MAIS SUSTENTÁVEL, Estudo de caso. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental.**, Florianópolis, v. 5, n. 1, p. 473-488, abr./set. 2016.

GUISAN, J. M. Em Immobilization of Enzymes and Cells; Guisan J. M., ed.; **Humana Press**: Totowa, 2006, cap. 1.

HAAG, M. C. R.; PASTORE Jr, F.; FARIA, A. B. Manual de Cosméticos. Organização Internacional de Madeiras Tropicais, Universidade de Brasília. “Produção não-madeireira e desenvolvimento Sustentável na Amazônia”. Brasília, 2005.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E.; **Chemical Society Reviews**. 2009, 38, 453.

HUNTERLAB, CIE Standard Observers and calculation of CIE X, Y, Z color values. 212. Disponível em: <www.hunterlab.com/an-1002b.pdf>, Acesso em: 16 nov. de 2015.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, in press, 2006.

ILLANES, A. “Biotecnología de enzimas”. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 1994.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; RANSACK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Letters**. Ver. V. 15, p. 29-63, 1994.

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

KHAN, M. A. I. et al. CIELAB color variables as indicators of compost stability. **Waste Management**, New York, v. 29, n. 12, p. 2969-2975, 2009.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman, 2008.

LEMAIRE, A.; WANGA, Q. Y.; WEI, Y.; LIU, Z.; SU, B. L. Hierarchically structured meso-macroporous aluminosilicates with high tetrahedral aluminium content in acid catalysed esterification of fatty

acids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, p. 511-520, 2011.

NEIVA, E. R.; TRÓCCOLI, B. T.; ABBAD, G. S. Roteiro para Análise de Variâncias. Instituto de Psicologia Programa de Pós-graduação em Psicologia Social, do Trabalho e das Organizações, Universidade de Brasília, 2012.

NOVO NORDISK. “Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions”. Relatório interno da Novo Nordisk, A-05948, 1992.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G.; AMUNDSON, C. H. “Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils - A review”, **Journal of the American Oil Chemist Society**, v.67, pp.890-910, 1990.

MARCHETTI, J. M.; ERRAZU, A. F. Biodiesel production from acid oils and ethanol using a solid basic resin as catalyst. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 272-277, 2010.

MARTINEZ, M.; TORRANO, E.; ARACIL, J. “An analogue of jojoba oil. A statistical approach”. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 27, pp. 2179-2182, 1988.

MELO, A. C. D. E. S.; SANTANA, C. M. B.; BRITO, M. E. G. B.. Imaginário feminino no consumo de cosméticos: um estudo sobre a significação das marcas de cremes faciais e o uso desses produtos para o público feminino. Monografia (Especialização) - Curso de Pesquisa de Mercado, Opinião e Mídia, Escola de Administração, Universidade Federal da Bahia, Bahia, f. 61, 2005.

MELO, M. S. INVESTIMENTO NA PRESERVAÇÃO DO MEIO AMBIENTE NO SETOR DE COSMÉTICOS: RELEVÂNCIA ATRIBUÍDA PELOS CLIENTES DE O BOTICÁRIO E SUA PERCEPÇÃO QUANTO À CONDUTA DA EMPRESA. Dissertação apresentada à escola brasileira de administração pública para obtenção do grau de mestre, Rio de Janeiro, 2002.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DA BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA. **Revista Processos Químicos: Aplicação industriais da Biotecnologia Enzimática**, Goiânia. v. 3, n. 5, jan/jun 2009.

MORAIS, I. B. S.; ANGELIS, L. H. Biotensoativos: uma alternativa mais limpa para as indústrias de cosméticos. **Revista do centro universitário Newton Paiva**, Edição 6, 2012.

MORSELLI, L. N. S. Estudos de pré-formulação e desenvolvimento de cosméticos Dimora Del Sole. Trabalho de conclusão de curso de graduação em Farmácia-Bioquímica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

OLIVEIRA, D. OLIVEIRA, J. V. FACCIO, C. MENONCIN, S. AMROGINSKI, C. INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO NA ALCOÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE MAMONA. **Ciência e tecnologia de alimentos. Campinas**. 24(2): 178-182. Abr-jun. 2004.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**., v. 29, p. 119-131, 1999.

RASMUSSEN, J. E. Transitioning to Green: implementing a comprehensive environmental sustainability initiative on a university campus. Dissertation (Doctorate of Education in Educational Leadership). California State University, Long Beach, f. 260, 2011.

RIBEIRO, C. Cosmetologia Aplicada a Dermocosmética. 2.ed. São Paulo: **Pharmabooks Editora**, p.43-52 e p.369-388, 2010.

SANTIN, C. M. T.; SCHERER, R. S.; NYARI, N. L. D.; DALLA ROSA, C.; DALLAGO, R. M. OLIVEIRA, D.; VLADIMIR OLIVEIRA, J. V. Batch esterificação de ácidos graxos encargos sob irradiação ultrassom usando *Candida antarctica B* imobilizada em espuma de poliuretano. **Biocatálise e Biotecnologia Agrícola**. Volume 3, Issue 3, julho de 2014, páginas 90-94.

SATYARTHI, J. K.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. Influence of surface hydrophobicity on the esterification of fatty acids over solid catalyts. **Energy Fuels**, v. 24, p. 2154-2161, 2010.

SERRA, T. M. DESENVOLVIMENTO DE CATALISADORES A BASE DE ESTANHO (IV) PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS, VIA TRANSESTERIFICAÇÃO E ESTERIFICAÇÃO. Dissertação - Curso de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, f. 71, 2010.

SHARMA, Chander K.; CHAUHAN, Ghanshyam S.; KANWAR, Shamsheer S. Synthesis of medically important ethyl cinnamate ester by porcine pancreatic lipase immobilized on poly(AAc-co-HPMA-clEGDMA) hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**, [S.I], v. 121, n. 5, p.2674-2679, 29 mar. 2011. Wiley-Blackwell.

SOARES, C. M.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M.; **Biotechnology and Applied Biochemistry**.. 1999, 77, 745.

TAMASHIDO, H. R. S. A Relação entre Conhecimento Ecológico, Preocupação Ecológica, Afeto Ecológico, Normas Subjetivas e o Comportamento de Compras Verdes no Setor de Cosméticos. Tese apresentada ao Departamento de Administração da Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

VEIGA, R. T.; SANTOS, D. O.; LACERDA, T. S. Antecedentes da Intenção de Consumo de Cosméticos Ecológicos. **Revista Eletrônica de Ciência Administrativa**, 2006.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester Synthesis in Lipase Catalyzed Reactions. **Enzyme and Microbial Technology**. n. 23, p. 438-450, 1998.

YANG, Z. e RUSSEL, A. J. “Fundamentals of non-aqueous enzymology”. In: Koskinen, A. M. D. e Klibanov, A. M. (eds), *Enzymatic Reactions in Organic Media*, 1ª ed., **London, Blackie Academic & Professional**, 1996.

ZHANG, Q.; SALEH, A. S. M.; CHEN, J.; SHEN, Q. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: A review. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 165, p. 662-681, 2012.