



# UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

MESTRADO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL

GICELIA ANTONIA FERREIRA

Identificação de líquidos iônicos práticos como solventes para  
aplicações em biocatálise



**SALVADOR**  
**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PEI - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM ENGENHARIA INDUSTRIAL**

**GICELIA ANTONIA FERREIRA**

**Identificação de líquidos iônicos práticos como solventes para aplicações em  
biocatálise**

**Salvador  
Bahia – Brasil  
Agosto de 2016**

**GICELIA ANTONIA FERREIRA**

**Identificação de líquidos iônicos práticos como solventes para aplicações em  
biocatálise**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial, para obtenção do título de Mestre.

**Salvador  
Bahia – Brasil  
Agosto de 2016**

Ferreira, Gicelia Antonia

Identificação de líquidos iônicos próticos como solventes para aplicações em biocatálise / Gicelia Antonia Ferreira. -- Salvador, 2016.

105 f. : il

Orientador: Miguel Angel Iglesias Duro.

Coorientadora: Sandra Cerqueira Pereira.

Dissertação (Mestrado - Engenharia Química) --  
Universidade Federal da Bahia, Escola Politécnica, 2016.

1. Líquidos Iônicos Próticos. 2. Caracterização Físico-Química. 3. Biocatálise. 4. Ésteres Graxos de Açúcares..

I. Duro, Miguel Angel Iglesias. II. Pereira, Sandra Cerqueira. III. Título.

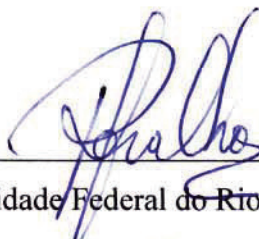
**“Identificação de Líquidos Iônicos Próticos como Solventes para Aplicações em Biocatálise”.**

**GICELIA ANTONIA FERREIRA**

Dissertação submetida ao corpo docente do programa de pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Industrial.


Examinada por:

Professora Rosana Lopes Lima Fialho



Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1998;

Professora Roberta da Silva Bussamara Rodrigues



Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2009;

Professora Ana Katerine de Carvalho Lima Lobato



Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, 2010.

Salvador, BA - BRASIL

Agosto/2016

## Agradecimentos

Ao Criador, por ser a razão da minha alegria;

Ao meu esposo, que tanto amo, obrigada pelo incentivo;

À Universidade Federal da Bahia e ao Departamento de Engenharia Química, pela oportunidade de realização deste Mestrado;

À CAPES, pela bolsa de Mestrado, e à FAPESB, pelo financiamento da pesquisa;

Ao querido professor Dr. Miguel Iglesias, pela orientação, dedicação e paciência;

À Dra. Sandra Cerqueira Pereira, pelo saber transmitido, apoio com as análises e pela disponibilidade em todo o tempo;

A minha estimável amiga e colega da pós-graduação Rebecca da Silva Andrade, pelo apoio e colaboração como um todo;

As minhas grandes amigas Soraya Sá e Ângela Azevêdo, por todo carinho e constante encorajamento;

Ao professor Dr. Ednildo Andrade Torres, pela colaboração através do laboratório e seus equipamentos emprestados para o desenvolvimento deste trabalho;

A todo o grupo de pesquisa de Líquidos Iônicos Próticos, pelo trabalho conjunto, em especial, Karine Lima e Danillo Camargo.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE NOMENCLATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. Introdução.....	14
2. Revisão bibliográfica.....	18
2.1. Líquidos iônicos.....	18
2.1.1. Líquidos iônicos e carboidratos.....	19
2.1.2. Líquidos iônicos e lipases.....	21
2.1.3. Coeficiente de partição dos líquidos iônicos .....	23
2.1.4. Viscosidade dos líquidos iônicos.....	23
2.2. Ésteres graxos de açúcares.....	24
2.2.1. Aplicações industriais .....	25
3. Objetivos.....	27
3.1. Objetivo geral .....	27
3.2. Objetivos específicos .....	27
3.2.1. Síntese de líquidos iônicos próticos .....	27
3.2.2. Estudo dos líquidos iônicos próticos como solventes potenciais para a síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares.....	27
4. Material e métodos.....	28
4.1. Procedimento experimental para a síntese de líquidos iônicos próticos.....	28
4.2. Caracterização dos líquidos iônicos próticos.....	31
4.2.1. Análise instrumental.....	31
4.2.1.1. Análise por Ressonância Magnética Nuclear ( <sup>1</sup> H-RMN) .....	31
4.2.1.2. Análise por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	32
4.2.2. Medição de propriedades físicas .....	32
4.2.2.1. Medidas de massa específica e velocidade de propagação do som.....	32
4.2.2.2. Correlação de dados .....	34
4.2.2.3. Predição de propriedades termodinâmicas.....	35
4.2.2.3.1. Predição de massa específica .....	35
4.2.2.3.2. Predição de velocidade de propagação do som.....	38

4.3. Planejamento experimental para o processo de síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares.....	39
4.3.1. Coeficiente de partição dos líquidos iônicos próticos .....	39
4.3.2. Viscosidade dos líquidos iônicos próticos.....	44
4.3.3. Solubilidade da galactose nos líquidos iônicos próticos.....	45
5. Resultados e discussão.....	48
5.1. Análise instrumental.....	48
5.2. Propriedades termodinâmicas.....	56
5.3. Modelos de predição das propriedades medidas.....	59
5.4. Estudo do coeficiente de partição dos líquidos iônicos próticos.....	63
5.5. Análise da viscosidade dos líquidos iônicos próticos.....	67
5.6. Testes de solubilidade da galactose em líquidos iônicos próticos.....	70
5.7. Análise de líquidos iônicos próticos como solventes para o processo enzimático.	76
6. Conclusões.....	78
7. Perspectivas para trabalhos futuros.....	80
Referências bibliográficas.....	81
APÊNDICES.....	89
Apêndice I: Espectros de $^1\text{H}$ – RMN.....	89
Apêndice II: Espectros de FTIR.....	94
Apêndice III: Tabela de dados experimentais das propriedades termodinâmicas.....	99
Apêndice IV: Produção científica.....	103



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Crescimento anual das publicações em líquidos iônicos (Fonte: <i>Scopus</i> , no período 2005-2015). .....	14
<b>Figura 2.</b> Número de artigos que descreveram as reações enzimáticas em LIs encontrados no <i>Scopus</i> , no período 2005-2015. ....	16
<b>Figura 3.</b> Estruturas da D-Galactose, monossacarídeo utilizado nesse trabalho. ....	20
<b>Figura 4.</b> Estrutura das moléculas das reações ácido-base que formam os LIPs. ....	30
<b>Figura 5.</b> LIPs sintetizados no presente estudo. ....	31
<b>Figura 6.</b> (a) Densímetro e analisador de som Anton Paar DSA-48; (b) Interior da célula de medida de massa específica e da célula de medida de velocidade de propagação do som. ....	33
<b>Figura 7.</b> Fluxograma para a determinação do coeficiente de partição. ....	40
<b>Figura 8.</b> Misturas octanol-água e LIP para cálculo do coeficiente de partição dos LIPs. ....	41
<b>Figura 9.</b> (a) Aliquota de 1 mL da solução aquosa. (b) Pesagens das alíquotas depois de secas na estufa. ....	42
<b>Figura 10.</b> Reômetro utilizado para medir a viscosidade - Brookfield Digital Rheometer Model DV – III. ....	44
<b>Figura 11.</b> Fluxograma do procedimento experimental do processo solubilidade da galactose nos LIPs. ....	46
<b>Figura 12.</b> Montagem experimental para processo de filtração a vácuo da mistura galactose + LIP. ....	47
<b>Figura 13.</b> Espectro de $^1\text{H}$ - RMN do 2-Hidróxi Etanolamina Lactato. ....	48
<b>Figura 14.</b> Espectro de FTIR para o 2-Hidróxi Etanolamina Lactato. ....	55
<b>Figura 15.</b> Massas específicas experimentais dos LIPs na faixa de temperatura de 20 a 50 °C. ....	56
<b>Figura 16.</b> Velocidades de propagação do som experimentais dos LIPs na faixa de temperatura de 20 a 50 °C. ....	57
<b>Figura 17.</b> Coeficiente de partição dos LIPs a 25 °C e 40 °C. ....	65
<b>Figura 18.</b> Viscosidade ( $\ln(\eta)$ ) em função da temperatura, para $\text{SR} = 10,2 \text{ s}^{-1}$ , sendo (▲) (2-HDEAF), (+) (2-HEAL), (▼) (2-HDEAL), (l) (2-HDEASa), (■) (2-HEAAd), (x) (2-HDEAOx), (★) (2-HDEAMa), (×) (2-HDEASu), (●) (2-HDEAAAd) e (◆) (2-HEACi). ....	68
<b>Figura 19.</b> Reação de Maillard. ....	73
<b>Figura 20.</b> Imagens das soluções que não apresentaram Reação de Maillard. ....	74
<b>Figura 21.</b> Imagens das soluções que apresentaram Reação de Maillard. ....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Algumas aplicações comerciais dos biossurfactantes.....	26
<b>Tabela 2.</b> Purezas dos ácidos e bases usados na síntese de LIPs.....	28
<b>Tabela 3.</b> Fórmulas estruturais dos reagentes para a síntese dos LIPs.....	29
<b>Tabela 4.</b> Nomenclatura dos LIPs sintetizados e utilizados nos testes de laboratório.....	40
<b>Tabela 5.</b> Solubilidade da galactose (g/L) em etanol a 22, 30 e 40 °C.....	47
<b>Tabela 6.</b> Dados dos espectros de <sup>1</sup> H-RMN para o LIP 2-HDEAF.....	49
<b>Tabela 7.</b> Dados dos espectros de <sup>1</sup> H-RMN para o LIP 2-HEAL.....	49
<b>Tabela 8.</b> Dados dos espectros de <sup>1</sup> H-RMN para o LIP 2-HDEAL.....	50
<b>Tabela 9.</b> Dados dos espectros de <sup>1</sup> H-RMN para o LIP 2-HDEASa.....	51
<b>Tabela 10.</b> Dados dos espectros de <sup>1</sup> H-RMN para o LIP 2-HDEAOx.....	51
<b>Tabela 11.</b> Dados dos espectros de <sup>1</sup> H-RMN para o LIP 2-HDEASu.....	52
<b>Tabela 12.</b> Dados dos espectros de <sup>1</sup> H-RMN para o LIP 2-HDEAMa.....	52
<b>Tabela 13.</b> Dados dos espectros de <sup>1</sup> H-RMN para o LIP 2-HEAAd.....	53
<b>Tabela 14.</b> Dados dos espectros de <sup>1</sup> H-RMN para o LIP 2-HDEAAd.....	54
<b>Tabela 15.</b> Dados dos espectros de <sup>1</sup> H-RMN para o LIP 2-HEACi.....	54
<b>Tabela 16.</b> Parâmetros de correlação para a massa específica e a velocidade de propagação do som (Equação 1) na faixa de temperatura de 20 a 50 °C, e raiz do desvio quadrático médio ( $\sigma$ ) (Equação 2), para os LIPs.....	58
<b>Tabela 17.</b> Valores críticos estimados para LIPs pelo método de Valderrama & Robles (2007).....	60
<b>Tabela 18.</b> Raiz dos desvios quadráticos médio ( $\sigma$ ) (Equação 2) dos dados experimentais e estimados para a massa específica, pelos métodos de Mchaweh-Nasrifar–Moshfeghian (MNM) (Equação 5), Rackett (R), Spencer-Danner-Rackett (RM) (Equação 9) e Índice de Conectividade Mássica (ICM) (Equação 12).....	61
<b>Tabela 19.</b> Raiz dos desvios quadráticos médios ( $\sigma$ ) (Equação 2) dos dados experimentais e estimados para velocidade de propagação do som dos LIPs estudados pela Collision Factor Theory (Equação 13).....	62
<b>Tabela 20.</b> Coeficientes de partição medidos dos LIPs.....	64
<b>Tabela 21.</b> Estruturas dos ácidos e bases dos LIPs.....	66
<b>Tabela 22.</b> Massa específica ( $\rho$ ) e viscosidades ( $\eta$ ) como função da temperatura para o estudo de LIPs. A viscosidade experimental foi medida com o SR = 10,2 s <sup>-1</sup> .....	69

<b>Tabela 23.</b> Solubilidade da galactose (% massa) em LIPs a 60 °C.....	71
<b>Tabela 24.</b> Medidas de pH dos LIPs. ....	76
<b>Tabela 25.</b> Tabela comparativa dos resultados de coeficiente de partição dos LIPs a 40 °C, viscosidade a 60 °C e solubilidade da galactose em LIPs a 60 °C.....	77

## LISTA DE NOMENCLATURAS

- 2-HDEAA<sub>d</sub>** - 2-Hidróxi Dietanolamina Adipato
- 2-HDEAF** - 2-Hidróxi Dietanolamina Formiato
- 2-HDEAL** - 2-Hidróxi Dietanolamina Lactato
- 2-HDEAM<sub>a</sub>** - 2-Hidróxi Dietanolamina Maleato
- 2-HDEAO<sub>x</sub>** - 2-Hidróxi Dietanolamina Oxalato
- 2-HDEAS<sub>a</sub>** - 2-Hidróxi Dietanolamina Salicilato
- 2-HDEAS<sub>u</sub>** - 2-Hidróxi Dietanolamina Succinato
- 2-HEAA<sub>d</sub>** - 2-Hidróxi Etanolamina Adipato
- 2-HEAC<sub>i</sub>** - 2-Hidróxi Etanolamina Citrato
- 2-HEAL** - 2-Hidróxi Etanolamina Lactato
- A<sub>i</sub>** - Parâmetros de correlação
- B** - Volume molecular por mol para cada composto
- CFT** - Collision Factor Theory
- FTIR** - Infravermelho por Transformada de Fourier
- ICM** - Índice de Conectividade Mássica (ICM)
- K<sub>ow</sub>** - Coeficiente de partição octanol/água
- LIPs** - Líquidos Iônicos Próticos
- LIs** - Líquidos Iônicos
- M** - Massa molar
- m*<sub>aliquota</sub>** - Massa total da alíquota
- m*<sub>H<sub>2</sub>O, mistura</sub>** - Massa de água na mistura
- m*<sub>LIP, mistura</sub>** - Massa de LIP na mistura
- m*<sub>LIP, mistura H<sub>2</sub>O</sub>** - Massa de LIP na fase aquosa da mistura
- m*<sub>LIP, mistura OCT</sub>** - Massa de LIP na fase orgânica da mistura
- m*<sub>LIP, alíquota</sub>** - Massa de LIP na alíquota
- MNM** - Mchaweh-Nasrifar-Moshfeghian
- m*<sub>OCT, mistura</sub>** - Massa de octanol na mistura
- P<sub>c</sub>** - Pressão crítica
- R** - Rackett
- RM** - Rackett Modificado
- SRK** - Soave–Redlich–Kwong

$T_c$  - Temperatura crítica

$T_R$  - Temperatura reduzida

$u$  - Velocidade de propagação do som na amostra

$V_m$  - Volume molar

$Z_c$  - Fator de compressibilidade crítica

$\rho_0$  - Massa específica de referência

$\rho_C$  - Massa específica crítica

$\omega$  - Fator acêntrico

$\rho$  - Massa específica

$\sigma$  - Raiz do desvio quadrático médio

$[LIP]_{aliquota}$  - Concentração de LIP na alíquota

$[LIP]_{mistura, H_2O}$  - Concentração de LIP na fase aquosa

$[LIP]_{mistura, OCT}$  - Concentração de LIP na fase orgânica

$^1H$ -RMN - Ressonância Magnética Nuclear de próton ( $^1H$ )

## RESUMO

Nos dias atuais, há um grande e crescente interesse em encontrar substâncias ambientalmente amigáveis para processos industriais. Os líquidos iônicos são candidatos a substituir os solventes orgânicos convencionais reduzindo a quantidade de resíduos e diminuindo o impacto ambiental; à temperatura ambiente, esses materiais praticamente não possuem pressão de vapor, são não inflamáveis, podendo ser sintetizados de modo específico, através da combinação diferencial entre cátions e ânions, para desempenhar o papel necessário, além de serem facilmente recicláveis. Os líquidos iônicos são novos meios promissores para muitos processos, tais como síntese química, reações enzimáticas e aplicações no setor de “engenharia verde”. O interesse pela classe dos líquidos iônicos próticos justifica-se em decorrência da sua síntese simples, do baixo custo produção, da baixa toxicidade e da biodegradabilidade, os quais são aspectos inerentes aos processos “verdes”. Nesse contexto, ressalta-se a aplicação dos líquidos iônicos próticos na síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares. Cumpre destacar que os mesmos podem ser sintetizados quimicamente ou enzimaticamente. A síntese química diverge da tendência atual, na qual o foco está voltado para a utilização de tecnologias sustentáveis e ambientalmente seguras. Por outro lado, a síntese enzimática é realizada em condições mais suaves de reação, apresenta elevada seletividade e especificidade, o que facilita a recuperação do produto. Porém, a síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares encontra um obstáculo, uma vez que os solventes orgânicos capazes de solubilizar adequadamente os carboidratos também agem de forma negativa sobre as enzimas, inativando-as. Portanto, no presente trabalho foi investigado um conjunto de líquidos iônicos próticos visando identificar um meio de reação apropriado para o processo enzimático de síntese do oleato de galactose, que atenda às condições de maximizar a solubilização do carboidrato. Para tanto, uma gama de líquidos iônicos próticos foram sintetizados e caracterizados em termos de coeficiente de partição, viscosidade e solubilidade da galactose, pois essas propriedades exercem influência direta sobre a ação enzimática. Até o melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo com foco no processo de produção enzimática de ésteres graxos de açúcares na presença de líquidos iônicos próticos.

*Palavras-chave:* Líquidos Iônicos Próticos; Caracterização Físico-Química; Biocatálise; Ésteres Graxos de Açúcares.

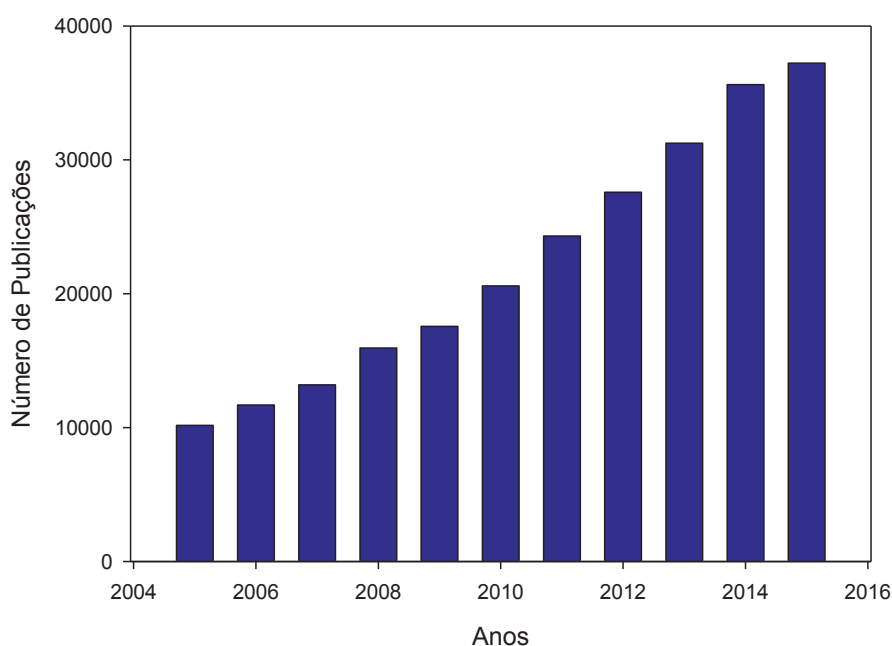
## ABSTRACT

Nowadays, there is a great and growing interest in environmentally friendly substances for industrial processes. Ionic liquids are candidates to replace the conventional organic solvents decreasing the amount of waste and reducing the environmental impact; at room temperature, ionic liquids have practically no vapor pressure, are not flammable and may be synthesized specifically through the differential combination of cations and anions, in order to perform the role needed, and are easily recyclable. Ionic liquids are new promising media for many processes, such as chemical synthesis, enzymatic reactions and applications in the “green engineering” sector. The interest for the class of protic ionic liquids is justified due to their simple synthesis, low cost of production, low toxicity and biodegradability potential, which are aspects inherent to the “green” processes. In this context, we highlight the application of protic ionic liquids in the enzymatic synthesis of fatty esters of sugars. It is worth noting that the same can be synthesized chemically or enzymatically. The chemical synthesis diverges from the current trend, in which the focus has turned to the use of sustainable and environmentally safe technologies. On the other hand, the enzymatic synthesis is performed under milder reaction conditions, presents high selectivity and high specificity, besides product recovery ease. Nevertheless, the enzymatic synthesis of fatty esters of sugars meets an obstacle, because the organic solvents able to adequately solubilize the carbohydrate also act negatively on the enzymes, inactivating them. Therefore, in the present study was proposed to investigate a class of protic ionic liquids in order to identify an appropriate reaction medium to the enzymatic process of synthesis of galactose oleate, which meets the conditions of maximizing the solubilization of the carbohydrate. For that, a range of protic ionic liquids were synthesized and characterized in terms of partition coefficient, viscosity and solubility of galactose, because these properties directly influence the enzymatic action. To the best of our knowledge, this is the first study focusing on the enzymatic production process of fatty esters of sugars in the presence of protic ionic liquids.

*Keywords:* Protic Ionic Liquids; Physical-Chemical Characterization; Biocatalysis, Sugar Fatty Acid Esters.

## 1. Introdução

Na atualidade, há um grande interesse em encontrar novas substâncias que sejam seguras ambientalmente para aplicações em larga escala. Nesse sentido, os líquidos iônicos têm sido considerados como potenciais substâncias para substituir os solventes orgânicos tradicionais, pois, os primeiros, além de apresentarem pressão de vapor desprezível, podem ser facilmente reciclados. Os líquidos iônicos têm sido utilizados como meios promissores para muitos processos industriais. Ademais, esses novos materiais têm sido extensivamente investigados em diversas reações enzimáticas, tornando-se uma forte tendência para aplicações em diversos tipos de bioprocessos. A Figura 1 mostra o crescimento do uso dos líquidos iônicos em diversas áreas do conhecimento.



**Figura 1.** Crescimento anual das publicações em líquidos iônicos (Fonte: *Scopus*, no período 2005-2015).

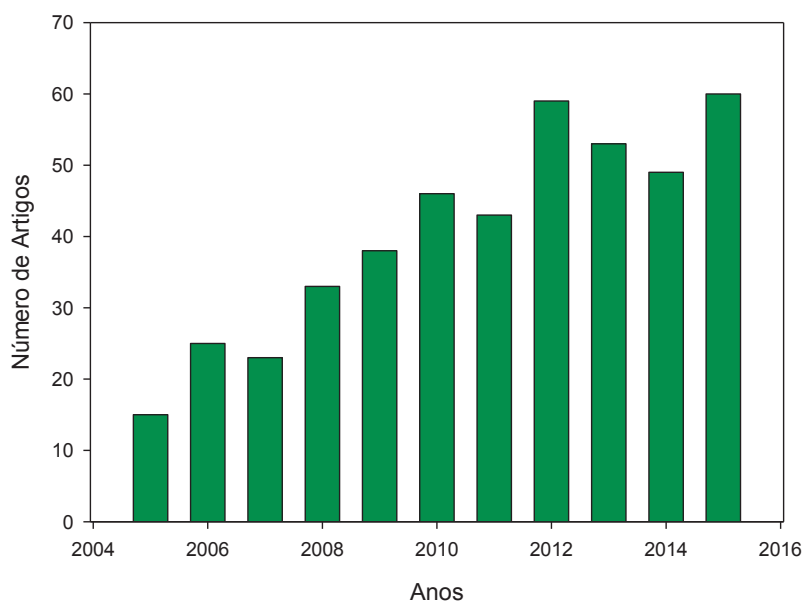
Em adição, a crescente preocupação com a proteção ambiental tem conduzido à busca pelo desenvolvimento de métodos bioquímicos, tendo em vista processos sustentáveis e ambientalmente seguros, os quais permitam o uso de fontes de matérias-primas renováveis e condições de reação mais brandas (Ruela *et al.*, 2013). Nesse seguimento, os ésteres graxos de açúcares são uma categoria de biossurfactantes não iônicos obtidos a partir de matérias-primas naturalmente abundantes, de baixo custo e renováveis, os carboidratos e os ácidos



graxos (Yang & Huang, 2012), e têm sido amplamente utilizados em diversos setores industriais, especialmente no ramo de alimentos, detergentes, cosméticos e farmacêuticos (Sabeder *et al.*, 2006), uma vez que são insípidos, inodoros, não tóxicos, não irritantes e biodegradáveis (Galonde *et al.*, 2012). Eles podem ser obtidos a partir de duas rotas, a síntese química ou enzimática. A tendência é seguir em direção à síntese enzimática desses bioprodutos, pois, a mesma apresenta grandes vantagens, tais como operar em condições mais brandas de temperatura, pH e pressão (Vitisant *et al.*, 2012), o que resulta em ganhos em termos de economicidade do processo.

Os solventes orgânicos são comumente utilizados para a síntese de ésteres graxos de açúcares (Walsh *et al.*, 2009; Gumel *et al.*, 2011). Por exemplo, Adnani *et al.* (2011) obtiveram conversões de 88 a 96% de ácidos graxos de açúcares usando hexano como solvente e tendo como biocatalisador a lipase de *Candida antarctica* B imobilizada em resina acrílica macroporosa. Apesar da extensa literatura para a síntese de ésteres graxos de açúcares em solventes orgânicos tradicionais, há um fator impeditivo para o desenvolvimento de processos enzimáticos eficientes de síntese destes ésteres graxos de açúcares, uma vez que para alcançar uma boa solubilidade dos carboidratos em solventes orgânicos convencionais, incorre-se no elevado risco de comprometimento do poder catalítico das enzimas, o que inviabiliza a reação.

Neste cenário, surgiu a necessidade de recorrer a novos solventes que pudessem aliar o compromisso de uma alta solubilidade dos carboidratos sem comprometer a atividade enzimática. Como alternativa, passou-se a empregar os líquidos iônicos (LIs), os quais têm sido reconhecidos atualmente como solventes potenciais "verdes" que apresentam propriedades únicas para aplicação não só na síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares como também em diversos processos enzimáticos, como pode ser visto pela Figura 2.



**Figura 2.** Número de artigos que descreveram as reações enzimáticas em LIIs encontrados no *Scopus*, no período 2005-2015.

A baixa solubilidade dos carboidratos em solventes orgânicos convencionais é um grande obstáculo para a implementação do processo de síntese enzimática dos ésteres graxos de açúcares (Ganske & Bornscheuer, 2005). Os carboidratos são solúveis em solventes orgânicos altamente polares, os quais geralmente são tóxicos, voláteis, inflamáveis, de difícil manejo e recuperação, além de atuar negativamente sobre a estrutura das enzimas através da desestabilização da conformação tridimensional cataliticamente ativa destes biocatalisadores, inativando-os. Existem estudos com líquidos iônicos apróticos (LIAs) sendo utilizados como solventes na síntese de ésteres graxos de açúcares (Lee *et al.*, 2008; Yang & Huang, 2012; Lin *et al.*, 2015). Entretanto, LIAs apresentam desvantagens em relação aos líquidos iônicos próticos (LIPs), uma vez que são menos econômicos e potencialmente tóxicos. Até o presente momento, não há na literatura estudos investigando a síntese enzimática destes ésteres graxos de açúcares usando os LIPs. O interesse pelos LIPs fundamenta-se no baixo custo de sua produção, baixa toxicidade e potencial biodegradabilidade, aspectos estes que são inerentes aos processos “verdes” (Zhu *et al.*, 2009; Zhao, 2010; Peric *et al.*, 2011, Peric *et al.*, 2013; Peric *et al.*, 2014; Peric *et al.*, 2015).

Nesse contexto, é válido ressaltar que os ésteres graxos de açúcares surgem como biossurfactantes de expressiva importância tecnológica devido, especialmente, à sua potencial aplicação em diversos setores industriais de consumo humano, exibindo características únicas que os elevam a um patamar superior em relação aos surfactantes convencionais (detergentes

aniônicos sulfatados). Somado a isso, as questões atuais de proteção ambiental fazem emergir um interesse para concentrar os esforços na busca pelo desenvolvimento da síntese enzimática desses produtos biotecnológicos. Apesar da ampla literatura para a síntese de ésteres graxos de açúcares em solventes orgânicos tradicionais e em alguns LIs, catalisada pela lipase, não existem relatos até o presente momento sobre a realização dessa reação em LIPs. Com essa motivação, o objetivo desse trabalho é investigar meios de reação inovadores baseados em LIPs para realizar a produção enzimática de oleato de galactose que possam solubilizar adequadamente o substrato sem depreciar o poder catalítico das enzimas.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Líquidos iônicos

Os líquidos iônicos (LIs) são materiais formados por cátions e ânions, constituindo-se em sais que fundem a temperaturas relativamente baixas (aproximadamente 100 °C) (Greaves & Drummond, 2008). Estes possuem uma excelente estabilidade química e térmica assim como pressão de vapor desprezível. Além disso, muitos são descritos como ambientalmente amigáveis. Com isso, eles tornaram-se uma alternativa atrativa aos solventes orgânicos tradicionais. Nos últimos anos, LIs têm sido amplamente estudados e reconhecidos como alternativas promissoras em muitas aplicações com alto potencial industrial (Plechkova & Seddon, 2008). Nesse cenário, esses novos solventes têm sido aplicados, por exemplo, em catálise (Olivier-Bourbigou *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011) e biocatálise (van Rantwijk & Sheldon, 2007; Chen *et al.*, 2010) e em muitos processos de extração (Freire *et al.*, 2010; Sintra *et al.*, 2014).

É importante destacar que os LIs podem ser classificados em duas grandes categorias: os líquidos iônicos apróticos (LIAs) e os líquidos iônicos próticos (LIPs). Estes últimos são produzidos por meio de transferência de prótons a partir de ácidos de Bronsted com bases de Bronsted (Anouti *et al.*, 2008; Mirjafari *et al.*, 2013). Nos últimos anos tem havido crescente interesse em LIPs e na sua vasta aplicação industrial (Greaves *et al.*, 2006; Walker, 2007; Greaves & Drummond, 2008; Greaves & Drummond, 2015). LIs podem ser de natureza hidrofóbica ou hidrofílica dependendo das estruturas de seus íons. Por causa do seu baixo ponto de fusão e da sua estrutura iônica podem ser usados como solventes, apresentando uma melhor seletividade comparada com os outros solventes orgânicos convencionais. Ademais, LIs não têm pressão de vapor significativa e, portanto, não geram poluição volátil durante sua manipulação.

Recentemente, essa nova classe de LIs, os próticos - LIPs, tem sido explorada, os quais têm apresentado vantagens adicionais, principalmente em termos econômicos e ambientais, em relação aos líquidos iônicos apróticos, LIAs, já amplamente estudados e aplicados como foco principal em diversos estudos (Chen *et al.*, 2014; Kusano *et al.*, 2014). O interesse nessa classe de LIs decorre da sua síntese simples, baixo custo de preparação e purificação e também pelo seu caráter biodegradável. Esses novos materiais têm despertado

grande interesse para a aplicação industrial pelo seu bom desempenho em diversos campos do conhecimento (Achinivu *et al.*, 2014).

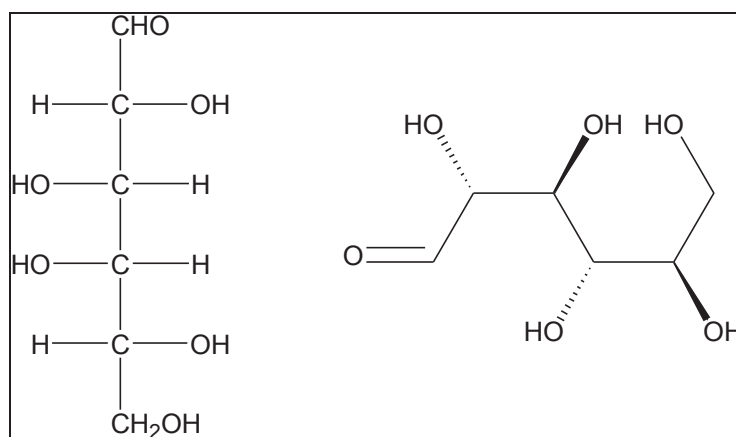
### 2.1.1. Líquidos iônicos e carboidratos

O uso de LIs como solventes “verdes” é uma tecnologia emergente e inovadora, que está rapidamente se expandindo na química de carboidratos (Zakrzewska *et al.*, 2010). Os carboidratos são importantes produtos naturais que desempenham não só papéis biológicos vitais para os seres vivos como também comerciais muito importantes, sendo aplicados nos diversos setores industriais, tais como o de papel e celulose, o de alimentos e a farmacêutica, entre muitos outros. Por outro lado, os carboidratos apresentam uma baixa solubilidade na maior parte dos solventes comumente utilizados, o que dificulta a sua utilização no desenvolvimento de processos tecnológicos (Murugesan & Linhardt, 2005).

Um bom resultado da síntese de ésteres graxos de açúcares depende em grande parte da avaliação da solubilidade dos carboidratos no meio reacional (Galonde *et al.*, 2012). O mais determinante impedimento para a realização da síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares é a baixa solubilidade dos carboidratos em solventes orgânicos tradicionais. O aspecto significativo é que os solventes orgânicos capazes de solubilizar os carboidratos são altamente polares e prejudiciais à ação das enzimas. Portanto, uma alternativa a esses, é a utilização de LIs, os quais têm sido utilizados para diversas rotas de catálise enzimática com bons resultados (Pereira *et al.*, 2012). Em especial, o interesse é pela classe de LIPs, objetivo principal desta proposta de trabalho, uma vez que, estes materiais têm sido muito pouco explorados em processos biotecnológicos.

A galactose é um açúcar simples ou monossacarídeo. Pode também ser classificada como uma hexose por ser um monossacarídeo constituído por seis átomos de carbono. Adicionalmente, a galactose pode existir em duas conformações espaciais que são imagens especulares uma da outra, tal como acontece com outros açúcares: a D-galactose (forma mais comum) e a L-galactose. Estes são denominados isômeros óticos ou enantiômeros e classificados de acordo com a direção do desvio da luz polarizada. A D-galactose e a D-glicose são considerados epímeros, pois diferem entre si em apenas um centro quiral. Os papéis biológicos vitais da galactose são essencialmente o energético e o estrutural, sendo encontrada como componente do dissacarídeo lactose, que existe no leite, e é um constituinte importante dos glicolípídeos, dos proteoglicanos e das glicoproteínas (Lehninger, 1984). A

galactose é o substrato base para a biossíntese de um éster graxo de açúcar (oleato de galactose), sendo o carboidrato modelo utilizado neste trabalho, uma vez que este substrato possui fontes abundantes, de baixo custo e renováveis. A Figura 3 apresenta a fórmula estrutural da galactose.



**Figura 3.** Estruturas da D-Galactose, monossacarídeo utilizado nesse trabalho.

Os açúcares são solúveis somente em poucos solventes de alta polaridade, tais como piridina, dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilformamida (DMF) (Galonde *et al.*, 2012). Porém, estes solventes hidrofílicos têm sido considerados fortes desativadores de enzimas e são incompatíveis com aplicações para produtos de consumo, uma vez que são tóxicos (Yang & Huang, 2012). Uma das explicações para o fato de que solventes orgânicos altamente polares atuam desativando as enzimas reside na interação destes com a camada de água ligada à molécula proteica, que é essencial para a manutenção da conformação cataliticamente ativa das enzimas (Lehninger, 1984). Assim, a utilização de solventes orgânicos mais apolares seria a alternativa mais eficaz. Os diversos fenômenos envolvidos nas interações enzima-solvente-substratos-água são tão complexos e mutuamente ligados que a seleção do solvente mais adequado não pode ser baseada apenas no caráter polar ou apolar dos solventes orgânicos (mais estritamente no caráter hidrofílico ou hidrofóbico). Nesse contexto, os pesquisadores têm manifestado um interesse crescente em LIs como uma alternativa para contornar o problema da solubilidade de carboidratos e permitir a ação enzimática de uma maneira eficiente. É válido citar que a galactose tem apresentado bom desempenho no que diz respeito à solubilidade da mesma em LIs. Como exemplo, a solubilidade da galactose em 1-etil-3-metilimidazólio etilsulfato ([EMIM][EtSO<sub>4</sub>]) foi de 14% em massa a 55 °C (temperatura próxima do interesse para o presente trabalho), segundo Carneiro *et al.* (2012). De acordo com Mohan *et al.* (2015), a solubilidade da galactose nos LIs, 1-etil-3-metilimidazólio

tiocianato ([EMIM][SCN]) e o Tris (2-hidroxi-etil) metilamônio metilsulfato ([TMA][MeSO<sub>4</sub>]), a 60 °C, são em percentual mássico, 11,94 e 2,20, respectivamente. Por outro lado, a galactose apresenta a solubilidade em água de 32,45 %, também a 55 °C (Jonsdottir *et al.*, 2002). A solubilidade da galactose em alguns solventes orgânicos convencionais tem sido da ordem de aproximadamente 0,05 % de isopropanol, por exemplo, a 40 °C (Montañés *et al.*, 2007). Espera-se no presente trabalho encontrar um sistema adequado de solubilização da galactose para garantir a máxima solubilização possível, baseado na utilização de uma classe de LIPs.

### 2.1.2. Líquidos iônicos e lipases

A necessidade do uso de tecnologias sustentáveis e a crescente exigência pela proteção ambiental têm conduzido à procura por meios alternativos para a obtenção de diversos produtos, e a indústria segue rumo ao crescimento de processos realizados por catálise enzimática. Nesse sentido, as enzimas podem ser obtidas a partir de células animais ou de plantas, assim como de micro-organismos. A aplicação desses biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, devido à sua alta atividade catalítica comparada com os catalisadores convencionais e também ao fato de atuarem com alta eficiência em condições suaves de reação (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). As enzimas são biocatalisadores versáteis, capazes de catalisar diferentes tipos de reações (Faber, 1997).

Especial atenção tem sido dedicada a enzimas lipolíticas (lipases), devido a sua alta atividade catalítica em diversos bioprocessos (Kazlauskas & Bornscheuer 1998). As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases E.C. 3.1.1.3) são reconhecidas como um importante grupo de biocatalisadores (Castro & Anderson, 1995). Por este motivo, as lipases têm sido amplamente utilizadas em múltiplos segmentos biotecnológicos (Kazlauskas & Bornscheuer 1998). As lipases podem ser obtidas a partir de diferentes fontes, dentre elas fungos, bactérias, plantas e animais (Saxena *et al.*, 2003). Entre os possíveis processos catalisados pelas lipases, destaque para a síntese de ésteres graxos de açúcares, uma vez que estes apresentam expressiva importância para a vida cotidiana, são compostos inodoros e insípidos, podendo ser utilizados como tensoativos em produtos alimentares, cosméticos e indústria farmacêutica (Findrik *et al.*, 2016).

Os avanços biotecnológicos na produção industrial de lipases têm conduzido a uma grande variedade de aplicações em diversos setores, como na produção farmacêutica, cosméticos, detergentes, alimentos, produtos de perfumaria dentre outros materiais (Gandhi,

1997; Hasan *et al.*, 2006). O interesse pelas lipases se deve à capacidade dessas enzimas catalisarem algumas reações, dentre elas a esterificação, a qual é reversível e resulta em altos rendimentos a partir da otimização de parâmetros experimentais, tais como, temperatura, concentração do catalisador, relação molar (carboidrato/ácido graxo) a ser utilizada, entre outros.

Reações de esterificações catalisadas por lipases em solventes orgânicos têm sido amplamente relatadas (Walsh *et al.*, 2009; Gumel *et al.*, 2011). Alguns destes solventes, como exemplo, o terc-butanol, a acetona e a acetonitrila são frequentemente utilizados, por permitir que as lipases mantenham sua conformação tridimensional cataliticamente ativa (Abdulmalek *et al.*, 2012). Porém, há limitações quanto à solubilidade dos carboidratos nestes meios (Yang & Huang, 2012). Com essa problemática, os pesquisadores têm revelado grande interesse pelos LIs como potencial alternativa para aplicação no desenvolvimento de processos biotecnológicos baseados nas reações catalisadas por lipases, como atestam algumas das inúmeras publicações disponíveis (Ha *et al.*, 2010; Abdulmalek *et al.*, 2012; Galonde *et al.*, 2012; Yang & Huang, 2012; Fischer *et al.*, 2013). Os LIs têm emergido como solventes que podem ser capazes de substituir os solventes orgânicos tradicionais em vários tipos de bioprocessos. No trabalho de Galonde *et al.* (2012) é citada a atividade residual da lipase para o sistema de LIs 1-butil-3-metilimidazólio de trifluormetanossulfonato ([BMIM][TFO]) e 1-metil-3-octilimidazólio de bis [(trifluormetil)-sulfonil] amida ([OMIM][Tf2N]) de cerca de 78% no sistema [BMIM][TFO]/[OMIM][Tf2N] (1/1, v/v, 50 °C, 24 h) e 85% para os LIs no sistema [BMIM][TFO]/[BMIM][Tf2N] (1/1, v/v, 40 °C, 11 h), após a enzima ser reutilizada cinco vezes.

A atividade catalítica das enzimas, assim como sua estabilidade podem ser influenciadas pela natureza dos LIs, estrutura e concentração dos substratos, pH, entre outros fatores (Moniruzzaman *et al.*, 2010). Um ponto importante que merece ser destacado é a miscibilidade em água que exerce grande influência sobre a catálise enzimática, uma vez que afeta a atividade termodinâmica da água ( $a_w$ ) no sistema (Bell *et al.*, 1995; Ventura *et al.*, 2012). Alguns solventes apresentam tendência a remover água do microambiente que cerca a enzima e a magnitude deste efeito pode levar a uma hidratação insuficiente e perda da atividade catalítica do biocatalisador. Na presença de LIs, a ativação ou inibição de enzimas podem decorrer de algumas interações entre os elementos do meio reacional. Os principais fatores que mais influenciam no comportamento das enzimas na presença de LIs são suas propriedades físico-químicas, por exemplo, polaridade, viscosidade e hidrofobicidade (Galonde *et al.*, 2012).



### 2.1.3. Coeficiente de partição dos líquidos iônicos

A crescente produção e utilização dos LIs aumenta a probabilidade da sua emissão para o ambiente, logo a importância em avaliar a capacidade destes compostos de se espalhar no ambiente. Um dos parâmetros mais importantes que permitem avaliar a mobilidade ambiental dos LIs é o coeficiente de partição octanol/água ( $K_{ow}$ ) (Rybinska *et al.*, 2016).

O  $K_{ow}$  é uma medida da lipofilicidade de um composto e é definido como a razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, água e octanol. O coeficiente de partição octanol/água, fornece informações sobre as propriedades físico-químicas das substâncias estudadas, também descrevendo relações quantitativas ambientalmente relevantes (Sangster, 1996; Poole & Poole, 2003; Berthod & Carda-Broch, 2004; Hermens *et al.*, 2013).

A determinação de  $K_{ow}$  tem sido recomendada pelo programa de evolução de compostos perigosos (OECD) (Watari *et al.*, 1982). Nos últimos anos,  $K_{ow}$  vem sendo muito utilizado em várias áreas, com um número elevado de publicações divulgando a sua correlação com outras propriedades físicas, químicas e biológicas dos compostos (Mailhot & Peters, 1988; Ferreira, 2001). Isto se deve ao fato do  $K_{ow}$  estar relacionado com a interação da substância em estudo com o meio, no que diz respeito à absorção e transporte.

Ao longo das últimas décadas, numerosos métodos para a determinação experimental ou a estimativa de valores de  $K_{ow}$  têm sido desenvolvidos, o mais clássico é o Método *shake-flask* (frasco agitado), no qual um analito é simplesmente repartido entre o octanol e a água num tubo de ensaio (Sangster, 1996; Morikawa *et al.*, 2016). Esta técnica experimental foi utilizada neste trabalho.

Aliado a isso, a determinação do  $K_{ow}$  dos LIPs tem um papel fundamental na reação enzimática, uma vez que o mesmo avalia a hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, tendo o compromisso com a manutenção da estabilidade da enzima, pois, o LIP pode inativá-las se for muito hidrossolúvel e retirar a camada essencial de água que protege a enzima de se inativar, ou seja, a camada de água que mantém a estrutura tridimensional da enzima.

### 2.1.4. Viscosidade dos líquidos iônicos

As propriedades reológicas de LIs são de grande interesse principalmente devido ao crescente número de aplicações industriais desses novos materiais. Essas propriedades

fornece informações essenciais na base molecular destes fluidos, bem como, os valores necessários para a concepção de engenharia. A viscosidade, como uma propriedade de transporte, tem um grande efeito sobre a taxa de transferência de massa e, assim, a viscosidade do solvente é um fator importante em nos projetos de todos os processos químicos (Moosavi & Daneshvar, 2014; Camargo *et al.*, 2016).

A viscosidade é um parâmetro importante na análise dos índices de desempenho das reações enzimáticas. Os LIs são fluidos mais viscosos do que os solventes orgânicos convencionalmente aplicados em bioprocessos (Galonde *et al.*, 2012). A alta viscosidade do meio reacional pode impactar a limitação de transferência de massa. Ainda assim, a viscosidade mais elevada dos LIs pode ser favorável ao desacelerar as mudanças conformacionais das proteínas, permitindo que as enzimas mantenham suas estruturas nativas e, portanto, sua atividade (van Rantwijk *et al.*, 2003).

Industrialmente há uma tendência na utilização de enzimas imobilizadas. A imobilização da enzima em um determinado suporte sólido insolúvel permite a mesma ser recuperada e reutilizada. As limitações de transferência de massa são maximizadas em meios muito viscosos, dessa forma, a análise da viscosidade dos LIPs tem como finalidade prever essas limitações de transferência de massa intrapartículas, uma vez que a preparação enzimática que será utilizada em etapas posteriores ao presente estudo será uma lipase imobilizada.

## 2.2. Ésteres graxos de açúcares

Os ésteres graxos de açúcares são biossurfactantes normalmente sintetizados a partir das reações de esterificação de açúcar com ácidos graxos por meio de catálise química ou biológica (Kosaric, 1993) com uma vasta aplicação industrial. Em adição, os ésteres graxos de açúcares são moléculas anfipáticas que apresentam uma porção apolar (hidrofóbica) e uma porção polar (hidrofílica), com isso, tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade formando um filme molecular capaz de reduzir as tensões interfacial e superficial, o que lhes confere propriedades únicas, tais como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade molhante e espumante, solubilização e dispersão de fases (Nitschke & Pastore, 2002).

Atualmente, os biossurfactantes utilizados na indústria estão sendo fabricados por meio de rotas químicas (Kobayashi, 2011), as quais usualmente exigem a utilização de

reagentes e catalisadores que podem causar problemas de segurança sendo incompatíveis com aplicações para produtos de consumo humano, já que deixam vestígios residuais nos mesmos. A síntese química de ésteres graxos de açúcares é composta por múltiplas etapas de proteção e desproteção de grupos reativos que são realizadas em condições severas de reação, causando baixa seletividade (Abdulmalek *et al.*, 2012). A combinação de catalisadores alcalinos e elevadas temperaturas nestes processos químicos ocasiona a formação de subprodutos tóxicos, que podem ser alergênicos ou até mesmo carcinogênicos (Cauglia & Canepa, 2008).

O interesse pelo desenvolvimento de métodos enzimáticos para a síntese destes ésteres graxos de açúcares tem ganhado destaque nos últimos anos, visto que, a síntese enzimática dos mesmos apresenta mais vantagens do que a síntese química por empregar condições reacionais brandas de temperatura e pressão, que acarretam uma economia de energia (Vitisant *et al.*, 2012) e uma redução ou até mesmo eliminação da possibilidade de degradação de substratos e produtos (Abdulmalek *et al.*, 2012). Além disso, os procedimentos enzimáticos são simples, capazes de alcançar uma alta produtividade, apresentam excelente regioseletividade com consequente elevada seletividade e fácil separação do produto (Gumel *et al.*, 2011). Esses aspectos fazem da rota enzimática uma alternativa atrativa do ponto de vista industrial em termos de viabilidade econômica e em relação ao desenvolvimento de processos ambientalmente seguros.

### 2.2.1. Aplicações industriais

A princípio, o maior mercado para os biossurfactantes era a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou vinculados em formulações de óleos lubrificantes (Vandyke *et al.*, 1991).

Outras aplicações compreendem a biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, a remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo.

Atualmente, as aplicações estão distribuídas entre os mais variados setores industriais (Nitschke & Pastore, 2002), conforme pode ser observado pela Tabela 1 que mostra resumidamente outros campos de utilização dos biossurfactantes.

**Tabela 1.** Algumas aplicações comerciais dos biossurfactantes.

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação de petróleo (MEOR - <i>Microbial Enhanced Oil Recovery</i> )

Fonte: Adaptado de Nitschke & Pastore, 2002.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo geral

O propósito principal da presente pesquisa é identificar líquidos iônicos próticos para serem aplicados em biocatálise, com foco na síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares, de interesse econômico e industrial.

#### 3.2. Objetivos específicos

##### 3.2.1. Síntese de líquidos iônicos próticos

- Síntese de LIPs mono e polieletrólíticos, por uma reação de Bronsted, procurando estruturas funcionais que promovam uma melhor solubilização do carboidrato;
- Análise espectrométrica (infravermelho por transformada de Fourier – FTIR, ressonância magnética nuclear –  $^1\text{H}$ -RMN) dos novos LIPs para fins de identificação das estruturas químicas desses materiais;
- Análise das propriedades termodinâmicas (massa específica e velocidade de propagação do som) com o intuito de obter uma caracterização mais completa dos LIPs sintetizados.

##### 3.2.2. Estudo dos líquidos iônicos próticos como solventes potenciais para a síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares

- Determinação do coeficiente de partição dos LIPs no sistema octanol/água para avaliar a hidrofobicidade e hidrofiliabilidade dos mesmos, tendo em mente o compromisso com a manutenção da estabilidade enzimática;
- Análise da viscosidade dos LIPs para fins de previsão quanto às possíveis limitações de transferência de massa, uma vez que a preparação enzimática que será utilizada em etapas posteriores ao presente estudo será com lipase imobilizada em suporte sólido insolúvel;
- Investigação da solubilidade da galactose nos LIPs buscando um sistema configurado para maximizar a solubilização deste carboidrato, o que possibilitará incrementos nas taxas de conversão posteriormente.

## 4. Material e métodos

### 4.1. Procedimento experimental para a síntese de líquidos iônicos próticos

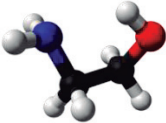
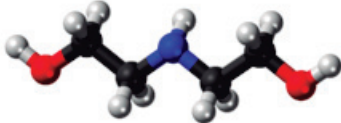
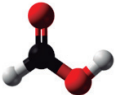
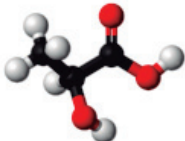
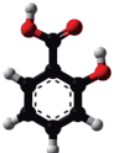
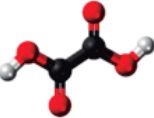
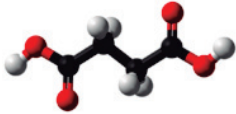
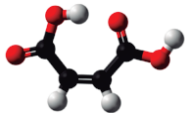
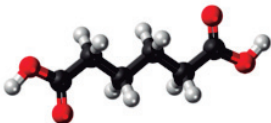
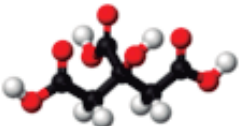
Os reagentes utilizados na preparação dos LIPs foram fornecidos por Synth<sup>®</sup> e Vetec<sup>®</sup>, com qualidade de alta pureza e armazenados em condições de baixa umidade e temperatura constante (Tabela 2).

**Tabela 2.** Purezas dos ácidos e bases usados na síntese de LIPs.

Componente	Pureza (% peso seco)	Marca
Monoetanolamina	99,0	Vetec
Dietanolamina	98,0	Synth
Ácido fórmico	85,0	Synth
Ácido láctico	85,0-90,0	Synth
Ácido salicílico	99,0	Vetec
Ácido oxálico	99,5	Synth
Ácido succínico	99,0	Synth
Ácido maleico	99,0	Synth
Ácido adípico	99,8	Vetec
Ácido cítrico	99,5	Synth

Todos os demais reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico P.A. e a água empregada foi destilada. A síntese dos LIPs se baseia na reação de Bronsted entre ácidos e bases que estão indicados na Tabela 3, de acordo com a metodologia descrita por Alvarez *et al.* (2010).

Tabela 3. Fórmulas estruturais dos reagentes para a síntese dos LIPs.

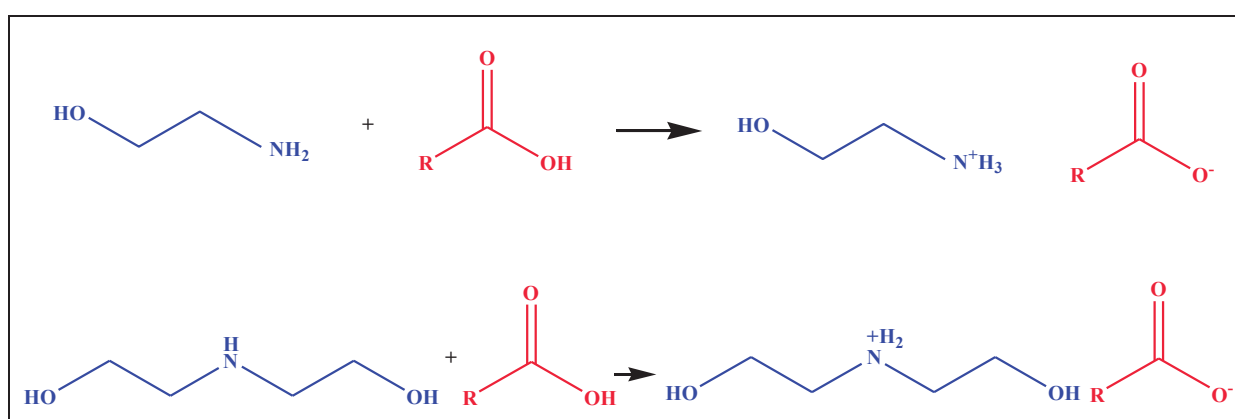
REAGENTES		Monoetanolamina	Dietanolamina
			
Ácido fórmico		NS*	2-Hidróxi Dietanolamina Formiato
Ácido láctico		2-Hidróxi Etanolamina Lactato	2-Hidróxi Dietanolamina Lactato
Ácido salicílico		NS*	2-Hidróxi Dietanolamina Salicilato
Ácido oxálico		NS*	2-Hidróxi Dietanolamina Oxalato
Ácido succínico		NS*	2-Hidróxi Dietanolamina Succinato
Ácido maleico		NS*	2-Hidróxi Dietanolamina Maleato
Ácido adípico		2-Hidróxi Etanolamina Adipato	2-Hidróxi Dietanolamina Adipato
Ácido cítrico		2-Hidróxi Etanolamina Citrato	NS*

\*NS – Não Sintetizado

Como indicados na Tabela 3 os LIPs sintetizados para o presente trabalho foram: 2-HDEAF - 2-Hidróxi Dietanolamina Formiato; 2-HEAL - 2-Hidróxi Etanolamina Lactato; 2-HDEAL - 2-Hidróxi Dietanolamina Lactato; 2-HDEASa - 2-Hidróxi Dietanolamina Salicilato; 2-HEAAd - 2-Hidróxi Etanolamina Adipato; 2-HDEAOx - 2-Hidróxi Dietanolamina Oxalato; 2-HDEAMa - 2-Hidróxi Dietanolamina Maleato; 2-HDEASu - 2-Hidróxi Dietanolamina Succinato; 2-HDEAAd - 2-Hidróxi Dietanolamina Adipato e o 2-HEACi - 2-Hidróxi Etanolamina Citrato.

Na síntese de LIPs é preciso haver certo cuidado com o controle da temperatura, uma vez que o aquecimento pode levar a degradação dos reagentes ou produtos. Geralmente as reações de síntese dos LIPs são extremamente exotérmicas, logo, fez-se necessário a preparação de um banho de gelo. A amina foi totalmente depositada no reator e o ácido acrescentado gota a gota sob agitação mecânica por um período de 24 horas à temperatura ambiente, cerca de 28 °C. O reagente limitante é o menos volátil. As massas de ácido e base foram calculadas por estequiometria com base nas suas estruturas químicas e massas moleculares. Em seguida, prosseguiu-se a etapa de purificação, onde o LIP sintetizado foi submetido ao aquecimento de aproximadamente 50 °C para retirada do composto volátil e de toda a umidade adquirida, uma vez que os LIPs são altamente higroscópicos. Após essa etapa de purificação esses LIPs foram devidamente envasados e armazenados no laboratório.

As Figuras 4 e 5 mostram, respectivamente, as estruturas das reações que formam os LIPs e a aparência geral destes sintetizados.



**Figura 4.** Estrutura das moléculas das reações ácido-base que formam os LIPs.





**Figura 5.** LIPs sintetizados no presente estudo.

Fonte: Arquivo do grupo de pesquisa em LIPs.

## 4.2. Caracterização dos líquidos iônicos próticos

### 4.2.1. Análise instrumental

#### 4.2.1.1. Análise por Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN)

Com o intuito de identificar os grupos químicos presentes nos LIPs estudados, foi feita a análise de  $^1\text{H}$ -RMN (importante técnica de pesquisa que explora as propriedades magnéticas de grupos atômicos para determinação de estruturas de espécies químicas), (Paiva *et al.*, 2000; Silverstein & Webster, 2000). Os espectros RMN dos LIPs foram obtidos com o Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Ascend Ultrashield<sup>TM</sup> Plus-EDS 600 MHz, utilizando água deuterada como solvente para a preparação das amostras. Os espectros foram processados com o software Mestre-C (*Mestrelab Research Inc.*). A preparação da amostra envolve a dissolução de 100  $\mu\text{L}$  desta em 500  $\mu\text{L}$  de água deuterada. Um capilar padrão (espessura de 5 mm) para referência externa foi introduzido co-axialmente no tubo contendo 0,1 M de ácido 3-(Trimetilsilil)-Propiônico-D<sub>4</sub> deuterado (TSP) em DMSO. O sinal do TSP a 0 ppm foi usado para determinar a concentração absoluta do espectro de próton 1D e o DMSO foi utilizado para travamento do deutério. A integral do sinal do  $^1\text{H}$ -RMN de TSP no capilar foi calibrado com uma amostra de 0,2 M de sacarose dissolvida em D<sub>2</sub>O e transferida para um tubo de RMN. O próton anomérico de glicose que aparece a 5,2 ppm foi escolhido para calibração. O tempo de aquisição foi de 2,7 segundos, e a temperatura da sonda de 25 °C. Aquisição com 32 scans, sem giro de amostra (*spin off*). Os espectros correspondentes aos LIPs estudados encontram-se no Apêndice I.

#### 4.2.1.2. Análise por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

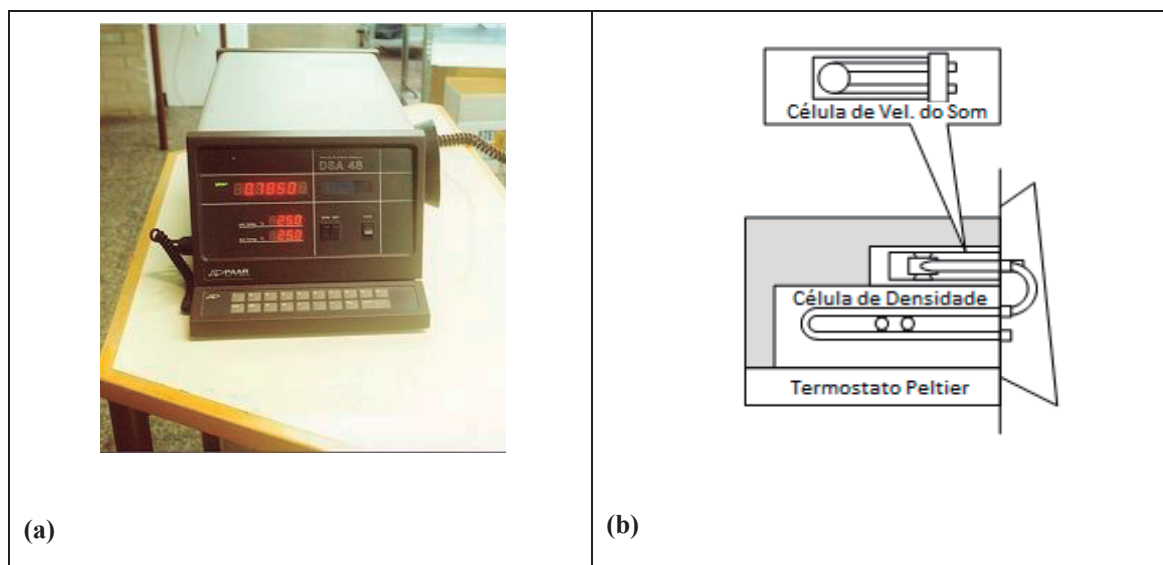
Através da espectroscopia FTIR (método de espectroscopia infravermelho amplamente utilizado para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra especialmente para a diferenciação e observação de grupos funcionais, o qual se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas), foram obtidos os espectros através do equipamento Bruker Vertex 70 RAM II, configurado para trabalho a média e a alta frequência ( $900\text{-}20\text{ cm}^{-1}$ ), utilizando o método por Reflexão Total Atenuada ATR. O dispositivo tem uma resolução de  $0,10\text{ cm}^{-1}$  e uma relação sinal-ruído de 5s de  $12.000:1$ , com 75% de atenuação da luz. Com as análises por FTIR foi possível realizar a confirmação dos grupos químicos presentes nas substâncias de interesse. Esses espectros correspondentes aos LIPs estudados são encontrados no Apêndice II.

#### 4.2.2. Medição de propriedades físicas

Os LIPs analisados neste trabalho são substâncias inovadoras, conseqüentemente, não há na literatura medidas de propriedades físicas em número significativo, até o melhor de nosso conhecimento, salvo alguns dados isolados para alguns dos LIPs (2-Hidróxi Etanolamina Acetato e o 2-Hidróxi Etanolamina Proprionato) (Kurnia & Mutalib, 2011a; Kurnia *et al.*, 2011b, 2011c; Taib *et al.*, 2013) e algumas medições do próprio grupo de pesquisa. Portanto, as medições aqui apresentadas são as primeiras feitas até o momento.

##### 4.2.2.1. Medidas de massa específica e velocidade de propagação do som

As medidas de massa específica e velocidade de propagação do som dos LIPs foram realizadas utilizando o equipamento ilustrado na Figura 6 (Densímetro e Analisador de Som Anton Paar DSA-48), com uma precisão de  $\pm 5.10^{-5}\text{ g.cm}^{-3}$  para massa específica e de  $\pm 10^{-2}\text{ m.s}^{-1}$ , para velocidade de propagação do som.



**Figura 6.** (a) Densímetro e analisador de som Anton Paar DSA-48; (b) Interior da célula de medida de massa específica e da célula de medida de velocidade de propagação do som.

Fonte: Arquivo do grupo de pesquisa em LIPs.

As células de massa específica e velocidade de propagação do som estão interligadas, Figura 6, onde são preenchidas sucessivamente. Para uma correta medida de massa específica e de velocidade de propagação do som, a amostra deve ser introduzida lentamente evitando a formação de pequenas bolhas. A quantidade de amostra utilizada para cada medida foi de 2 mL e a incerteza na medida dessas propriedades foi de  $\pm 10^{-4}$  g.cm<sup>-3</sup> para massa específica e  $\pm 5 \cdot 10^{-1}$  m.s<sup>-1</sup>, para velocidade de propagação do som. Abaixo segue uma melhor descrição da medição dessas propriedades:

A determinação da massa específica consiste na medida da frequência de ressonância de um oscilador mecânico a uma temperatura fixa. O oscilador é excitado eletronicamente e sua frequência de vibração é modificada com a inserção da massa específica do líquido na célula. A célula é um tubo de vidro com formato de U situada em uma caixa de vidro.

Para a termostatização da amostra, é utilizado um termostato para a medida de temperatura e um elemento semiconductor Peltier (o princípio de Peltier se baseia na produção de um gradiente de temperatura na junção de dois condutores de materiais diferentes submetidos a uma tensão elétrica em um circuito fechado, visando manter condições isotérmicas durante as medições), no qual a polaridade da corrente elétrica dependerá se a diferença entre a temperatura da célula e a nominal é positiva ou negativa, alcançando uma precisão de  $\pm 10^{-2}$  K.

O sistema mecânico é excitado no interior da célula, levando-o a uma condição de ressonância. Através de um leitor de quartzo incorporado à célula, mede-se o período de oscilação a cada 2 segundos (aproximadamente), transmitindo o valor ao processador. O princípio de medida destes equipamentos é fundamentado na mudança do período natural de oscilação de um oscilador de massa  $m$  e volume interior  $V_0$ , ao ser preenchido com o líquido do qual se quer determinar a massa específica  $\rho$ , com relação ao período de oscilação quando está vazio.

Para a medição de velocidade de propagação do som o processo é exatamente igual à de massa específica, resume-se em uma cavidade, a qual está rodeada lateralmente por um receptor e um transmissor de pulsos de ultrassom. A medida da velocidade de propagação do som é baseada na ressonância de uma cavidade de comprimento conhecido, preenchida com a amostra, submetida a pulsos ultrassônicos na direção do eixo da cavidade.

A massa específica foi medida na unidade  $\text{g.cm}^{-3}$ , e a velocidade de propagação do som em  $\text{m.s}^{-1}$ .

#### 4.2.2.2. Correlação de dados

As propriedades físicas medidas dos LIPs foram correlacionadas como função da temperatura de acordo com a Equação 1:

$$P = \sum_{i=0}^N A_i T^i \quad (1)$$

Sendo  $P$  a propriedade, massa específica ( $\text{g.cm}^{-3}$ ) ou velocidade de propagação do som ( $\text{m.s}^{-1}$ ),  $A_i$  representa os parâmetros de correlação,  $T$  representa a temperatura absoluta e  $N$  representa a extensão da série matemática.

Os parâmetros de correlação foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados aplicando o algoritmo de Marquardt, dando o mesmo peso a todos os pontos. A raiz dos desvios quadráticos médios ( $\sigma$ ) foi calculada utilizando a Equação 2, na qual  $Z$  é o valor da propriedade física (experimental e predita) e  $n_{\text{DAT}}$  o número de dados experimentais.

$$\sigma = \left( \frac{\sum_{i=1}^{n_{DAT}} (z_{exp} - z_{pred})^2}{n_{DAT}} \right)^{1/2} \quad (2)$$

Os dados experimentais das massas específicas e velocidades do som dos LIPs estudados nesse trabalho estão no Apêndice III. Os parâmetros de correlação e a raiz dos desvios quadráticos médios são encontrados na Seção de Resultados e discussão.

#### 4.2.2.3. Predição de propriedades termodinâmicas

Para a predição de massa específica e velocidade de propagação do som dos LIPs foram utilizados os seguintes modelos:

O modelo pelo Índice de Conectividade Mássica (ICM) (Valderrama & Rojas, 2010), o modelo de Mchaweh-Nasrifar–Moshfeghian (MNM) (Mchaweh *et al.*, 2004), e as equações de estado de Rackett e Spencer-Danner-Rackett (R e RM) (Rackett, 1970; Spencer & Danner, 1972) para massa específica. Para a predição da velocidade de propagação do som destes novos materiais, foi aplicado o modelo da Teoria do Fator de Colisão, sigla em inglês - CFT - Collision Factor Theory (Schaaffs, 1975), embora existam muitos modelos de estimativa de propriedades, a maioria deles não é desenhada para substâncias de comportamento não ideal ou alto peso molecular. Para a predição dessas propriedades, por exemplo, foi preciso entender a complexidade da substância em estudo, sua configuração molecular, tipos e quantidades de grupos moleculares, além da expressiva influência da temperatura nas propriedades medidas.

A seguir é encontrada uma descrição mais detalhada de alguns modelos aplicados para predição dessas propriedades.

##### 4.2.2.3.1. Predição de massa específica

###### *Modelo de Mchaweh-Nasrifar-Moshfeghian (MNM)*

No presente trabalho, foi aplicada uma simplificação da equação de Nasrifar-Moshfeghian para a predição de massa específica de líquidos (Mchaweh *et al.*, 2004), substituindo o termo de Mathias & Copeman por outro termo encontrado na equação de estado de Soave-Redlich-Kwong (SRK). Essa substituição tem superado as limitações no uso

do modelo original, que são devidas aos parâmetros dependentes da pressão de vapor (Saha & Das, 1997).

O modelo de Nasrifar-Moshfeghian (NM) requer três parâmetros para cada composto, que nem sempre estão disponíveis. Na ausência destes parâmetros, a correlação de NM falha em prever a massa específica de compostos puros e de suas misturas. A modificação deste modelo, Mchaweh-Nasrifar-Moshfeghian (MNM), supera essa barreira através da substituição do parâmetro de  $\alpha$  da equação de estado preditiva de Soave-Redlich-Kwong (PSRK) pelo termo original  $\alpha_{SRK}$  de SRK, equação de estado de Soave-Redlich-Kwong (SRK). O termo,  $\alpha_{SRK}$  é definido em relação a temperatura reduzida ( $T_R$ ), de acordo com a Equação 3:

$$\alpha_{SRK} = [1 + m(1 - \sqrt{T_R})]^2 \quad (3)$$

Onde  $m$  é dado através da relação abaixo (Equação 4) como função do fator acêntrico ( $\omega$ ):

$$m = 0,480 + 1,574\omega - 0,176\omega^2 \quad (4)$$

Com a revisão do modelo após a substituição tem-se a Equação 5:

$$\rho_s = \rho_c \rho_o [1 + \delta_{SRK}(\alpha_{SRK} - 1)^{1/3}] \quad (5)$$

Sendo  $\rho_c$  a massa específica crítica e o parâmetro  $\delta_{SRK}$  é o novo valor característico para cada composto.

Onde  $\rho_o$  é a massa específica de referência, calculada pela Equação 6:

$$\rho_o = 1 + 1,169\tau^{1/3} + 1,818\tau^{2/3} - 2,658\tau^{3/3} + 2,161\tau^{4/3} \quad (6)$$

E  $\tau$ , a variável dependente da temperatura, definida pela Equação 7:

$$\tau = 1 - \left( \frac{T_R}{\alpha_{SRK}} \right) \quad (7)$$

As propriedades críticas ( $T_c$  e  $P_c$ ) dos LIPs assim como os fatores acêntricos requeridos foram estimados por um método de contribuição de grupo de acordo com os conceitos de Lydersen & Joback-Reid, proposto por Valderrama & Robles (2007). Nos casos em que  $\delta_{SRK}$  não está disponível, Mchaweh *et al.* (2004) propôs a seguinte equação como função do fator acêntrico (Equação 8):

$$\delta_{SRK} = 0,1596\omega - 0,0319 \quad (8)$$

Os desvios dos valores de massa específica preditos por este método em relação aos valores experimentais são encontrados na Seção de Resultados e Discussão.

*Equações de Estado de Rackett (R) e Spencer-Danner-Rackett (RM)*

Na Equação 9 está explícita a equação de estado de Rackett (Rackett, 1970):

$$\rho = \left( \frac{MP_c}{RT_c} \right) \cdot \beta^{[1+(1-T_R)^{2/7}]} \quad (9)$$

Sendo  $T_R$  a temperatura reduzida,  $T_c$  e  $P_c$  são as propriedades críticas dos compostos,  $M$  é a massa molar e  $\beta$  é o fator de compressibilidade crítico ( $Z_c$ ) ou o parâmetro de estrutura molecular de Rackett ( $Z_{RA}$ ), (Rackett, 1970; Spencer & Danner, 1972), (Equação 10), o qual varia de acordo com o fator acêntrico conforme a equação:

$$Z_{RA} = 0,04\omega^2 - 0,099\omega + 0,2908 \quad (10)$$

*Modelo pelo Índice de Conectividade Mássica (ICM)*

O índice de conectividade mássica (ICM), baseado no fator de conectividade molecular foi utilizado para identificar as contribuições de grupos funcionais e quantificar a extensão da ramificação de uma molécula (Valderrama & Rojas, 2010). Os dados necessários são: grupos moleculares que formam a molécula e a massa molecular dos grupos funcionais. O índice pode ser utilizado como uma variável em correlações generalizadas para estimar a massa específica dos LIPs. Designado por  $\lambda$ , leva em consideração o tipo de ligações entre os grupos e a massa de tais grupos.

Seguindo os conceitos desenvolvidos por Randic (1975), o índice de conectividade mássica é definido como descrito na Equação 11:

$$\lambda = \sum \left( \frac{1}{\sqrt{m_i m_j}} \right)_{ij} \quad (11)$$

Onde,  $m_i$  e  $m_j$  são as massas de grupos funcionais vizinhos  $i$  e  $j$  em uma molécula, e a conexão  $m_i m_j$  é diferente de  $m_j m_i$ .

A relação entre a massa específica ( $\rho$ ) e o índice de conectividade mássica ( $\lambda$ ) é linear (Valderrama & Rojas, 2010) e está descrita na Equação 12:

$$\rho = \rho_0 - 3,119 \cdot 10^{-3} \lambda \cdot (T - T_0) \quad (12)$$

Sendo  $\rho_0$  um valor de massa específica medido em uma temperatura de referência  $T_0$ .

#### 4.2.2.3.2. Predição de velocidade de propagação do som

##### *Teoria do Fator de Colisão (CFT)*

O emprego de técnicas ultrassônicas em aplicações termodinâmicas tem despertado um crescente interesse nos últimos anos, pois, a partir do conhecimento desta propriedade, é possível estimar, por exemplo, a capacidade calorífica em misturas e de compostos puros também, realizar estudos de compressibilidade ou de simples medidas de concentração. A velocidade de propagação do som ainda é escassa para muitos compostos, mesmo sendo continuamente avaliada nos últimos anos. Esse método, embora projetado para misturas apresentou resultados qualitativos na aplicação em compostos iônicos puros. Os dados experimentais de velocidade de propagação do som desse trabalho de pesquisa foram comparados com valores determinados pela Collision Factor Theory (CFT) (Gonzalez *et al.*, 2001), o qual é dependente dos fatores de colisão entre as moléculas, de acordo com a Equação 13:

$$u = \frac{u_\infty \sum x_i S_i \sum x_i B_i}{V_m} \quad (13)$$

Onde  $u_\infty$  é  $1600 \text{ m.s}^{-1}$ ,  $S_i$  é o fator de colisão para cada composto,  $B_i$  é o volume molecular por mol para cada composto, e  $V_m$  é o volume molar.



Os fatores de colisão (S) para os solventes puros usados no cálculo de CFT foram calculados a partir dos valores experimentais de velocidade de propagação do som e dos volumes molares. O volume molar característico para cada composto foi calculado pelo método de contribuição de grupo de Bondi (1964).

Para a realização dos cálculos acima, referentes ao item 4.2 foram utilizados os softwares Excel<sup>®</sup> e SigmaPlot.

Os desvios dos valores de velocidade de propagação do som preditos por este método em relação aos valores experimentais são encontrados na Seção de Resultados e Discussão.

#### 4.3. Planejamento experimental para o processo de síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares

##### 4.3.1. Coeficiente de partição dos líquidos iônicos próticos

O coeficiente de partição é o parâmetro mais usado para descrever quantitativamente os efeitos dos solventes nas reações enzimáticas. No presente trabalho, foi utilizado o sistema bifásico octanol/água para a determinação da concentração de cada LIP em ambas as fases. Em um experimento típico, uma massa conhecida do LIP foi adicionada a um sistema de massas definidas de octanol/água em tubos de ensaio. Após agitação vigorosa, o sistema foi mantido em repouso por um período de 9 horas isotermicamente para a completa partição do LIP nessas duas fases (aquosa e orgânica). De posse da concentração do LIP na fase aquosa (calculada de forma gravimetricamente), a concentração do LIP na fase orgânica foi obtida por balanço de massa. Os resultados possibilitaram a construção de uma escala com os resultados dessa propriedade para uma gama de LIPs que foram investigados como potenciais meios de reação para a síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares (uma importante classe de biossurfactantes).

Nesse trabalho, foi relatado o  $K_{ow}$  dos LIPs nas temperaturas 25 °C e 40 °C, podendo ser encontrados na Seção de Resultados e Discussão. Segue uma descrição detalhada do procedimento de determinação do coeficiente de partição ( $K_{ow}$ ) no sistema octanol/água para os diferentes LIPs.

##### *Determinação do coeficiente de partição*

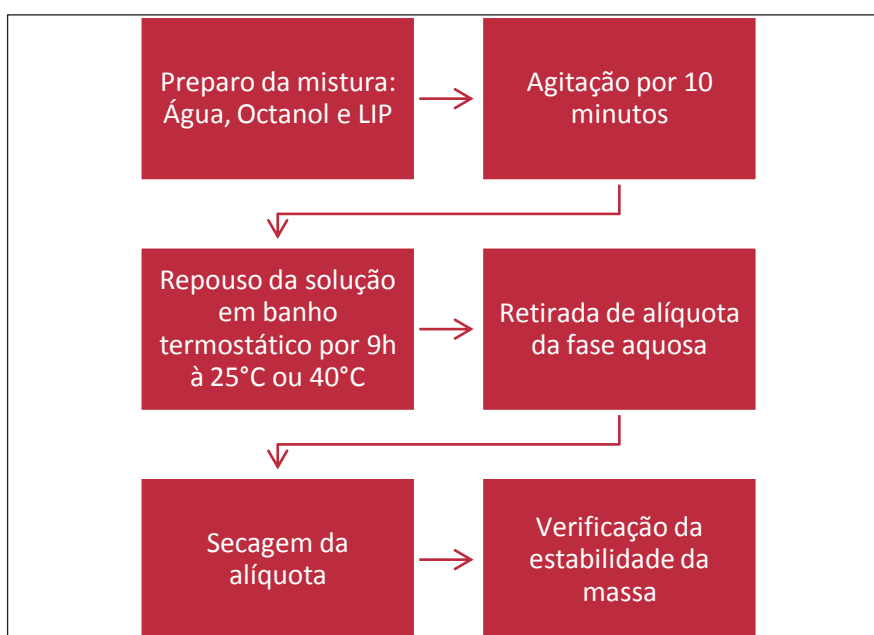
O processo de medição do coeficiente de partição foi realizado com octanol fornecido pela empresa Synth<sup>®</sup> e água destilada.

Um total de dez LIPs foi testado nos experimentos, com o objetivo de identificar quais desses LIPs são candidatos promissores à síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares, a Tabela 4 contém os LIPs testados nesse trabalho.

**Tabela 4.** Nomenclatura dos LIPs sintetizados e utilizados nos testes de laboratório.

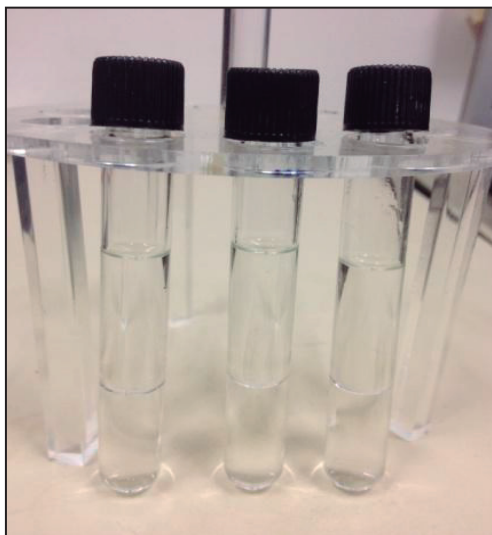
LIP	Nomenclatura
2-HDEAF	2-Hidróxi Dietanolamina Formiato
2-HEAL	2-Hidróxi Etanolamina Lactato
2-HDEAL	2-Hidróxi Dietanolamina Lactato
2-HDEASa	2-Hidróxi Dietanolamina Salicilato
2-HEAAd	2-Hidróxi Etanolamina Adipato
2-HDEAOx	2-Hidróxi Dietanolamina Oxalato
2-HDEAMa	2-Hidróxi Dietanolamina Maleato
2-HDEASu	2-Hidróxi Dietanolamina Succinato
2-HDEAAAd	2-Hidróxi Dietanolamina Adipato
2-HEACi	2-Hidróxi Etanolamina Citrato

Um esquema geral resumido do procedimento experimental realizado para a determinação do coeficiente de partição ( $K_{ow}$ ) pode ser visto na Figura 7.



**Figura 7.** Fluxograma para a determinação do coeficiente de partição.

Inicialmente foi preparada uma mistura contendo água, octanol e LIP com quantidades mássicas de 2,5 g, 2,5 g e 0,03 g, respectivamente (Figura 8).



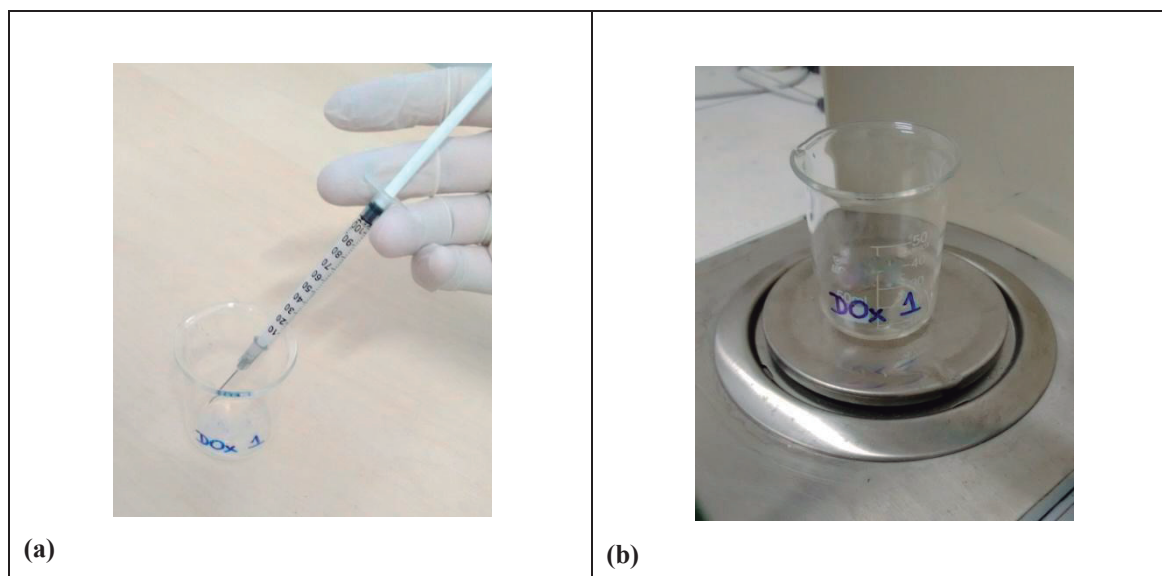
**Figura 8.** Misturas octanol-água e LIP para cálculo do coeficiente de partição dos LIPs.

A mistura preparada foi agitada manualmente de forma vigorosa por cerca de 10 minutos e posta para repousar em um banho termostático à temperatura constante de 25 °C e outra a 40 °C por um período de 9 horas, cada. As misturas foram preparadas em duplicata com as mesmas quantidades de reagentes, em massa, para ambas as temperaturas.

Após o período de repouso, pode-se observar a formação de duas fases na mistura: uma aquosa e outra orgânica. Uma alíquota de 1 mL da fase aquosa foi retirada com o auxílio de uma seringa e colocada para secar na estufa a uma temperatura média de 60 °C. Essa temperatura foi escolhida com o objetivo de evaporar a água sem degradar o LIP. O processo de secagem consistiu em verificar a massa da amostra após intervalos de 1 hora na estufa. Após estabilização da massa, supôs-se que toda a água contida na amostra foi evaporada, e então a secagem foi interrompida. Os valores das massas estabilizados foram utilizados nos cálculos para o coeficiente de partição (por balanço de massa).

Para o cálculo do coeficiente de partição têm-se como dados: massa de LIP ( $m_{LIP,mistura}$ ), massa de octanol ( $m_{OCT,mistura}$ ) e massa de água ( $m_{H_2O,mistura}$ ), utilizados na preparação da mistura.

Após a secagem da alíquota retirada da mistura (Figura 9), compreende-se que tem apenas LIP no recipiente utilizado.



**Figura 9.** (a) Aliquota de 1 mL da solução aquosa. (b) Pesagens das alíquotas depois de secas na estufa.

A massa do líquido iônico prótico ( $m_{LIP,aliquota}$ ) foi então medida e os cálculos do coeficiente de partição foram realizados seguindo a descrição abaixo.

Cálculo da concentração mássica de líquido iônico na alíquota retirada da fase aquosa da mistura:

Para tal cálculo, utilizou-se o valor da massa da alíquota retirada e da massa de LIP após a secagem, obtendo assim, o valor de concentração em massa de LIP por massa de água na alíquota, Equação 14.

$$[LIP]_{aliquota} = \frac{m_{LIP,aliquota}}{m_{aliquota} - m_{LIP,aliquota}} \quad (14)$$

Para encontrar a massa de líquido iônico na fase aquosa na mistura, multiplicou-se o valor da concentração mássica obtida (Equação 14) pela massa total de água utilizada na mistura através da Equação 15.

$$\begin{aligned} m_{LIP,misturaH_2O} &= [LIP]_{aliquota} \times m_{H_2O,mistura} \\ &= \frac{m_{LIP,aliquota}}{m_{aliquota} - m_{LIP,aliquota}} \times m_{H_2O,mistura} \end{aligned} \quad (15)$$

A concentração de LIP na fase aquosa foi então calculada pela Equação 16:

$$[LIP]_{mistura,H_2O} = \frac{m_{LIP,misturaH_2O}}{m_{H_2O,mistura} + m_{LIP,misturaH_2O}} \quad (16)$$

A massa de LIP que não está na fase aquosa, encontra-se na fase orgânica (Equação 17), logo:

$$m_{LIP,misturaOCT} = m_{LIP,mistura} - m_{LIP,misturaH_2O} \quad (17)$$

A concentração de LIP na fase orgânica pode então ser encontrada através da Equação 18:

$$[LIP]_{mistura,OCT} = \frac{m_{LIP,misturaOCT}}{m_{OCT,mistura} + m_{LIP,misturaOCT}} \quad (18)$$

Com os valores de concentração de LIP na fase aquosa e orgânica, é possível calcular o coeficiente de partição utilizando a Equação 19:

$$K_{OW} = \frac{[LIP]_{mistura,OCT}}{[LIP]_{mistura,H_2O}} \quad (19)$$

Apesar dos avanços obtidos em termos de minimização de erros experimentais para o processo experimental do coeficiente de partição, são muitas as causas que podem conduzir a uma não uniformidade. É preciso observar todas as fontes de erros, pois, em qualquer medida há certo grau de incerteza. Erros sistemáticos no que se refere, por exemplo, as pesagens oriundas de uma falta de calibração como também erros de manipulação são responsáveis pelos problemas desencadeados no processo em questão.

#### 4.3.2. Viscosidade dos líquidos iônicos próticos

Neste trabalho foram estudadas as viscosidades dos LIPs a diferentes temperaturas, (50, 60 e 70 °C). Em todas estas medições, a viscosidade tem sido considerada como uma função apenas da temperatura.

O procedimento experimental para a determinação da viscosidade em cada uma das temperaturas é descrito a seguir.

##### *Determinação da viscosidade*

As viscosidades dinâmicas das amostras puras de LIPs foram medidas usando um Reômetro Brookfield Digital Modelo DV-III a diferentes temperaturas, com *spindle* apropriado segundo recomendações do fornecedor para a reologia em estudo (Figura 10).



**Figura 10.** Reômetro utilizado para medir a viscosidade - Brookfield Digital Rheometer Model DV – III.

O instrumento é equipado com cilindros de diâmetros diferentes (*spindles*), onde é utilizado o cilindro adequado conforme a viscosidade do fluido. Para os LIPs estudados neste trabalho foi utilizado um *Spindle* de referência S-27. O viscosímetro foi acoplado a um banho termostático, permitindo assim mensurar a viscosidade dos LIPs no intervalo de 50 a 70 °C, com precisão na temperatura de 0,5 °C. É importante ressaltar que nesse viscosímetro foram efetuadas leituras de viscosidade automaticamente a cada temperatura.

Com os resultados obtidos foi possível a construção de uma escala de viscosidade para os LIPs avaliados, permitindo avançar na caracterização destes solventes e identificação dos possíveis meios mais promissores para a realização das reações enzimáticas, inclusive para a interpretação dos resultados obtidos a partir da catálise enzimática.

#### 4.3.3. Solubilidade da galactose nos líquidos iônicos próticos

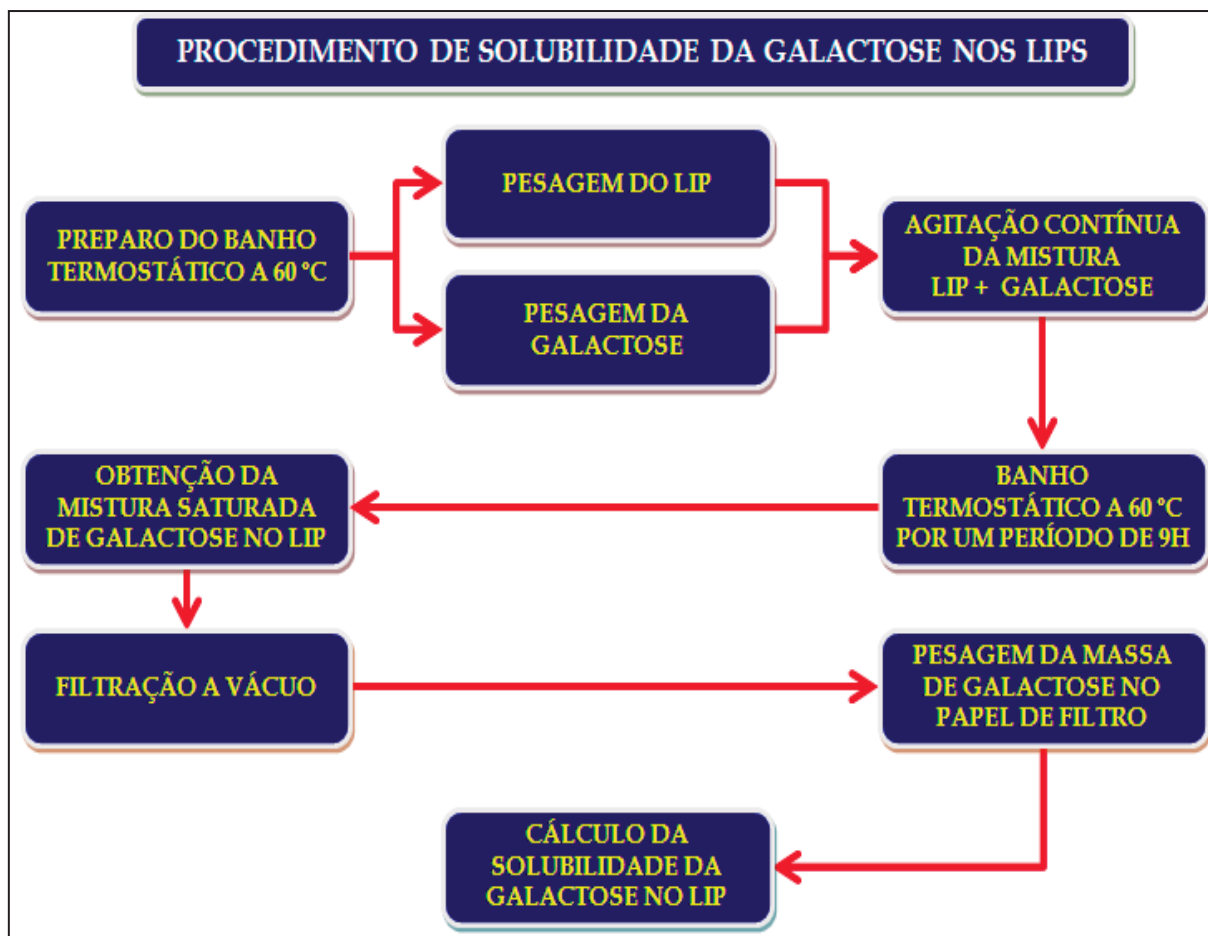
Um dos mais importantes impedimentos para a realização da síntese enzimática de ésteres graxos de açúcares é a baixa solubilidade dos carboidratos em solventes orgânicos tradicionais. Uma alternativa a estes, é a utilização de LIPs, objetivo principal desta proposta de trabalho. Sendo assim, a solubilidade da galactose, carboidrato modelo desta pesquisa foi avaliada em cada um dos LIPs na temperatura de 60 °C, sendo esta a temperatura de interesse para atuação da preparação enzimática que será utilizada nas etapas seguintes deste trabalho.

Em um ensaio típico de determinação de solubilidade, soluções saturadas dos LIPs contendo galactose foram preparadas a 60 °C, conhecendo-se a massa de carboidrato adicionada e a massa de LIP contido no reator encamisado acoplado a um banho-maria termostaticado. Após agitação vigorosa, a solução foi mantida em repouso por um período de 9 horas para a completa separação da fase sólida e líquida, possibilitando determinar a concentração de galactose na fase líquida por meio do método gravimétrico. Os resultados são de grande valor decisivo para a escolha dos LIPs que serão empregados nas reações sintéticas catalisadas pela lipase, possibilitando a construção de uma escala de solubilidade da galactose a 60 °C em função do tipo de LIP.

A combinação dos resultados de coeficiente de partição dos LIPs, viscosidade dos LIPs e solubilidade da galactose nos LIPs são as ferramentas chave para a definição das próximas etapas, com base no conhecimento de como estes fatores podem interferir na atividade catalítica da lipase.

##### *Determinação da solubilidade da galactose*

O processo de investigação da solubilidade da galactose em LIPs foi realizado com a galactose com qualidade de alta pureza fornecida pela empresa Dinâmica<sup>®</sup>. A Figura 11 descreve o esquema desse procedimento experimental.



**Figura 11.** Fluxograma do procedimento experimental do processo solubilidade da galactose nos LIPs.

Inicialmente foi pesada uma massa de aproximadamente 2,0 g de cada LIP em tubos de ensaio e posteriormente foi adicionada massas de galactose, inicialmente cerca de 10% do valor da massa de LIP foi agregada até a obtenção de uma mistura saturada de LIP + carboidrato. As misturas preparadas foram agitadas manualmente por alguns minutos e colocadas em um banho termostático previamente aquecido a 60 °C por um período de 9 horas (as massas do carboidrato foram adicionadas a mistura à medida que a mesma solubilizava). Após o período de nove horas de agitação e solubilização obteve-se uma mistura saturada de galactose em cada LIP.



Posteriormente essas misturas foram levadas para uma filtração a vácuo (Figura 12) fazendo uso do etanol para arrastar o LIP e filtrar a galactose, uma vez que esta é pouco miscível em etanol, segundo dados apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Solubilidade da galactose (g/L) em etanol a 22, 30 e 40 °C.

Temperatura	Solubilidade (g/L)
22	0,43
30	0,63
40	1,07

Fonte: Adaptado de Montañés *et al.*, 2007.



**Figura 12.** Montagem experimental para processo de filtração a vácuo da mistura galactose + LIP.

Após a realização da filtração, a massa da galactose (soluto) na mistura saturada foi pesada sendo possível o cálculo da solubilidade da mesma em cada LIP (solvente) Equação 20.

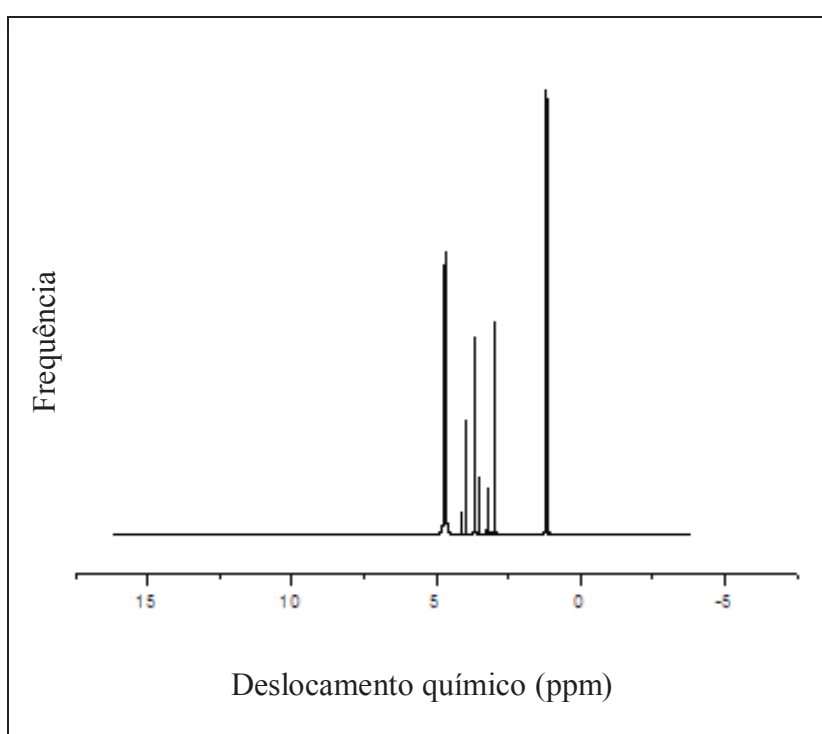
$$\text{Solubilidade} \left( \% \frac{m}{m} \right) = \frac{\text{massa soluto (g)}}{\text{massa do solvente (g)}} \times 100 \quad (20)$$

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Análise instrumental

#### 5.1.1. Análise por Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN)

Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN foram realizados visando comprovar a estrutura química de cada LIP sintetizado. A Figura 13 exemplifica um desses espectros. Os demais espectros encontram-se no Apêndice I.



**Figura 13.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do 2-Hidróxi Etanolamina Lactato.

As Tabelas 6-15 apresentam as informações espectrais retiradas dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN registrados para os LIPs sintetizados no presente estudo.

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o 2-HDEAF (Apêndice I) apresentou um singlete, em  $\delta$  8,20, evidenciando a presença de um hidrogênio na estrutura, desblindado, ligada ao grupo éster proveniente do ácido fórmico. Os tripletos observados em  $\delta$  4,68 e  $\delta$  3,58 foram atribuídos a grupos metilênicos. A presença de hidrogênios de um grupo amina foi indicada pelo singlete com deslocamento em  $\delta$  4,68.

Dessa forma, através dos dados espectrais da substância 2-HDEAF (Tabela 6), pode-se confirmar que se trata do 2-Hidróxi Dietanolamina Formiato.

**Tabela 6.** Dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN para o LIP 2-HDEAF.

2-HDEAF	
Multiplicidade	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
(s)	8,20
(s)	4,68
(t)	3,58
(t)	2,85

\*(s): singleto (t): tripleto

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o 2-HEAL (Apêndice I) apresentou um multiplete em  $\delta$  3,99 ppm, evidenciando a presença de um hidrogênio blindado por uma metila, uma hidroxila e um grupo éster, provenientes do ácido láctico. Um dublete observado em  $\delta$  1,20 ppm foi atribuído a este grupo metila citado. Os tripletos observados em  $\delta$  3,65 ppm e  $\delta$  3,03 ppm foram atribuídos aos grupos metilênicos. A presença de hidrogênios de um grupo amina foi indicada pelo singleto com deslocamento químico em  $\delta$  4,71 ppm. Dessa forma, através dos dados espectrais da análise de 2-HEAL (Tabela 7), pode-se confirmar que se trata do 2-Hidróxi Etanolamina Lactato.

**Tabela 7.** Dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN para o LIP 2-HEAL.

2-HEAL	
Multiplicidade	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
(s)	4,71
(m)	3,99
(t)	3,65
(t)	3,03
(d)	1,20

\*(s): singleto (d): dublete (t): tripleto (m): multiplete

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o 2-HDEAL (Apêndice I) apresentou um multipletto, em  $\delta$  4,03 ppm, evidenciando a presença de um hidrogênio blindado por uma metila, uma hidroxila e um grupo éster, provenientes do ácido láctico. Um dubleto observado em  $\delta$  1,20 foi atribuído a este grupo metila citado. Os tripletos observados em  $\delta$  3,07 e  $\delta$  3,70 foram atribuídos a grupos metilênicos. A presença de hidrogênios de um grupo amina foi indicada pelo singlete com deslocamento em  $\delta$  4,71 ppm. Dessa forma, através dos dados espectrais da análise de 2-HDEAL (Tabela 8), pode-se confirmar que se trata do 2-Hidróxi Dietanolamina Lactato.

**Tabela 8.** Dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN para o LIP 2-HDEAL.

2-HDEAL	
Multiplicidade	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
(s)	4,71
(m)	4,03
(t)	3,70
(t)	3,07
(d)	1,20

\*(s): singlete (d): dubleto (t): triplete (m): multiplete

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o 2-HDEASa (Apêndice I) apresentou dois tripletos, em  $\delta$  2,98 ppm e  $\delta$  3,61 ppm, atribuídos aos grupos metilênicos. A parte aromática da molécula foi definida como sendo de um anel benzênico 1,2-dissubstituído, com base no padrão de acoplamento dos hidrogênios ( $\delta$  7,63 ppm,  $\delta$  7,20 ppm e  $\delta$  6,73 ppm). A presença de hidrogênios de um grupo amina foi indicada pelo singlete com deslocamento em  $\delta$  4,71 ppm.

Dessa forma, através dos dados espectrais da análise de 2-HDEASa (Tabela 9), pode-se confirmar que se trata do 2-Hidróxi Dietanolamina Salicilato.

**Tabela 9.** Dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN para o LIP 2-HDEASa.

2-HDEASa	
Multiplicidade	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
(d)	7,63
(t)	7,20
(m)	6,73
(s)	4,71
(t)	3,61
(t)	2,98

\*(s): singleto (d): dubleto (t): tripleto (m): multipleto

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o 2-HDEAOx (Apêndice I) apresentou dois tripletos, em  $\delta$  3,01 ppm e  $\delta$  3,70 ppm, que foram atribuídos a grupos metilênicos. A presença de hidrogênios de um grupo amina foi indicada pelo singleto com deslocamento em  $\delta$  4,71 ppm. Dessa forma, através dos dados espectrais da análise de 2-HDEAOx (Tabela 10), pode-se confirmar que se trata do 2-Hidróxi Dietanolamina Oxalato.

**Tabela 10.** Dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN para o LIP 2-HDEAOx.

2-HDEAOx	
Multiplicidade	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
(s)	4,71
(t)	3,70
(t)	3,01

\*(s): singleto (t): tripleto

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o 2-HDEASu (Apêndice I) apresentou um singleto, em  $\delta$  2,21 ppm, evidenciando a presença de um grupo  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , proveniente do ácido succínico.

Os tripletos observados em  $\delta$  3,03 ppm e  $\delta$  3,65 ppm foram atribuídos a grupos metilênicos. A presença de hidrogênios de um grupo amina foi indicada pelo singlete com deslocamento em  $\delta$  4,71 ppm. Dessa forma, através dos dados espectrais da análise de 2-HDEASu (Tabela 11), pode-se confirmar que se trata do 2-Hidróxi Dietanolamina Succinato.

**Tabela 11.** Dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN para o LIP 2-HDEASu.

2-HDEASu	
Multiplicidade	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
(s)	4,71
(t)	3,65
(t)	3,03
(s)	2,21

\*(s): singlete (t): tripleto

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o 2-HDEAMa (Apêndice I) apresentou um singlete, em  $\delta$  6,40 ppm, evidenciando a presença de um grupo  $-\text{CH}=\text{CH}-$ , proveniente do ácido maléico. Os tripletos observados em  $\delta$  3,12 ppm e  $\delta$  3,75 ppm foram atribuídos a grupos metilênicos. A presença de hidrogênios de um grupo amina foi indicada pelo singlete com deslocamento em  $\delta$  4,71 ppm. Dessa forma, através dos dados espectrais da análise de 2-HDEAMa (Tabela 12), pode-se confirmar que se trata do 2-Hidróxi Dietanolamina Maleato.

**Tabela 12.** Dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN para o LIP 2-HDEAMa.

2-HDEAMa	
Multiplicidade	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
(s)	6,40
(s)	4,71
(t)	3,75
(t)	3,12

\*(s): singlete (t): tripleto

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o 2-HEAAd (Apêndice I) apresentou dois singletos próximos e de intensidade semelhante, em  $\delta$  1,30 ppm e  $\delta$  1,97 ppm, evidenciando a presença de dois grupamentos  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , provenientes do ácido adípico. Dois tripletos observados em  $\delta$  2,88 ppm e  $\delta$  3,55 ppm são atribuídos aos grupos metilênicos esperados na estrutura. A presença de hidrogênios de um grupo amina foi indicada pelo singlete com deslocamento em  $\delta$  4,71 ppm. Dessa forma, através dos dados espectrais da análise de 2-HEAAd (Tabela 13), pode-se confirmar que se trata do 2-Hidróxi Etanolamina Adipato.

**Tabela 13.** Dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN para o LIP 2-HEAAd.

2-HEAAd	
Multiplicidade	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
(s)	4,71
(t)	3,55
(t)	2,88
(s)	1,97
(s)	1,30

\*(s): singlete (t): tripleto

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o 2-HDEAAd (Apêndice I) apresentou dois singletos próximos e de intensidade semelhante, em  $\delta$  1,39 ppm e  $\delta$  2,02 ppm, evidenciando a presença de dois grupamentos  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ , provenientes do ácido adípico. Dois tripletos observados em  $\delta$  3,07 ppm e  $\delta$  3,69 ppm são atribuídos aos grupos metilênicos esperados na estrutura. A presença de hidrogênios de um grupo amina foi indicada pelo singlete com deslocamento em  $\delta$  4,71 ppm.

Dessa forma, através dos dados espectrais da análise de 2-HDEAAd (Tabela 14), pode-se confirmar que se trata do 2-Hidróxi Dietanolamina Adipato.

**Tabela 14.** Dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN para o LIP 2-HDEAAd.

2-HDEAAd	
Multiplicidade	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
(s)	4,71
(t)	3,69
(t)	3,07
(s)	2,02
(s)	1,39

\*(s): singleto (t): tripleto

O espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o 2-HEACi (Apêndice I) apresentou dois dubletos muito próximos e de intensidade semelhante, em  $\delta$  2,38 ppm e em  $\delta$  2,48 ppm, evidenciando a presença dos dois grupos metilênicos presentes na estrutura do ácido cítrico, blindados por grupamentos éster e por uma hidroxila. Os tripletos observados em  $\delta$  3,65 ppm e  $\delta$  2,93 ppm foram atribuídos aos grupos metilênicos. A presença de hidrogênios de um grupo amina foi indicada pelo singleto com deslocamento em  $\delta$  4,71 ppm. Dessa forma, através dos dados espectrais da análise de 2-HEACi (Tabela 15), pode-se confirmar que se trata do 2-Hidróxi Etanolamina Citrato.

**Tabela 15.** Dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN para o LIP 2-HEACi.

2-HEACi	
Multiplicidade	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
(s)	4,71
(t)	3,65
(t)	2,93
(d)	2,48
(d)	2,38

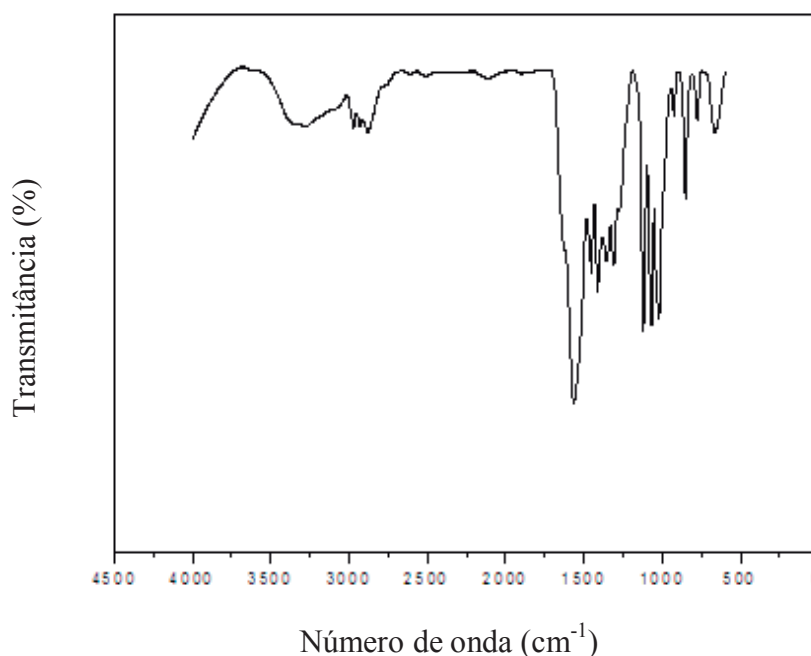
\*(s): singleto (d): dubleto (t): tripleto



### 5.1.2. Análise por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Semelhantemente as análises de  $^1\text{H}$ -RMN descritas no item 5.1.1, a aplicação de técnicas de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada com o mesmo objetivo, ou seja, de confirmar a presença das estruturas químicas esperadas para os LIPs que foram sintetizados neste trabalho. Para garantir a não existência de água nas amostras analisadas, os LIPs foram purificados com rigoroso controle de temperatura.

A Figura 14 exemplifica um resultado da técnica FTIR para o líquido iônico 2-Hidróxi Etanolamina Lactato.



**Figura 14.** Espectro de FTIR para o 2-Hidróxi Etanolamina Lactato.

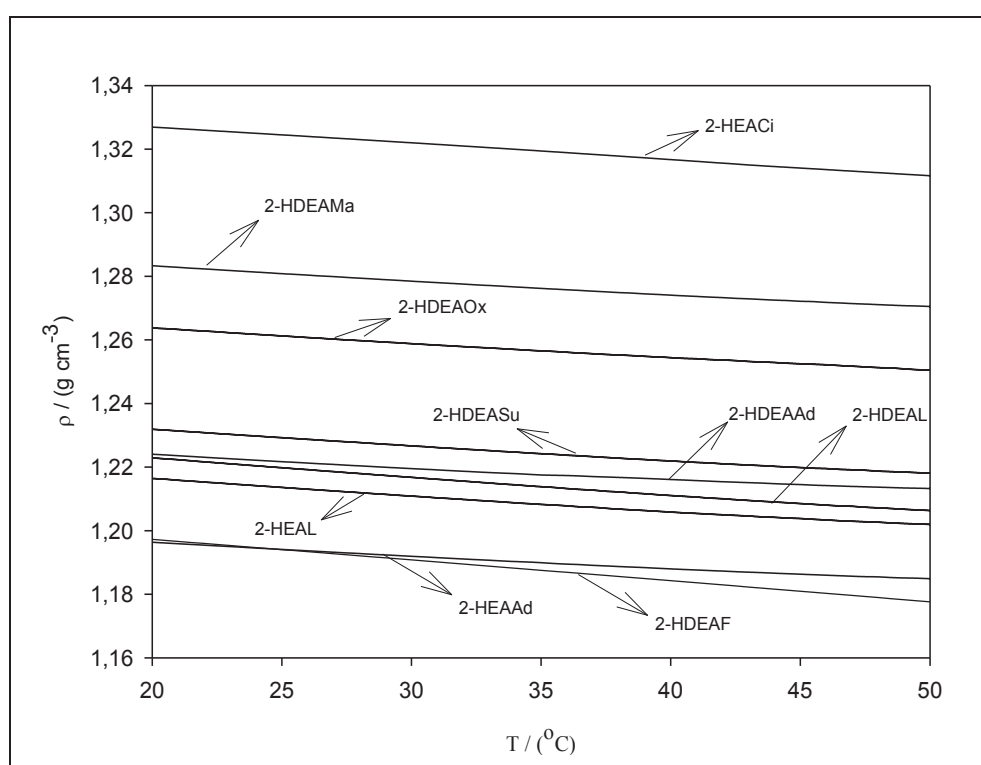
A banda larga observada na faixa de  $3500$  a  $2400\text{ cm}^{-1}$ , de uma forma geral, comprova a existência de compostos de amônio e também de grupamentos OH. A banda centrada em  $1500\text{ cm}^{-1}$  comprova a existência dos grupamentos carbonila e N-H próprios dos produtos esperados.

Em resumo, essas análises (FTIR) serviram para confirmar, com sucesso, a síntese dos LIPs de interesse.

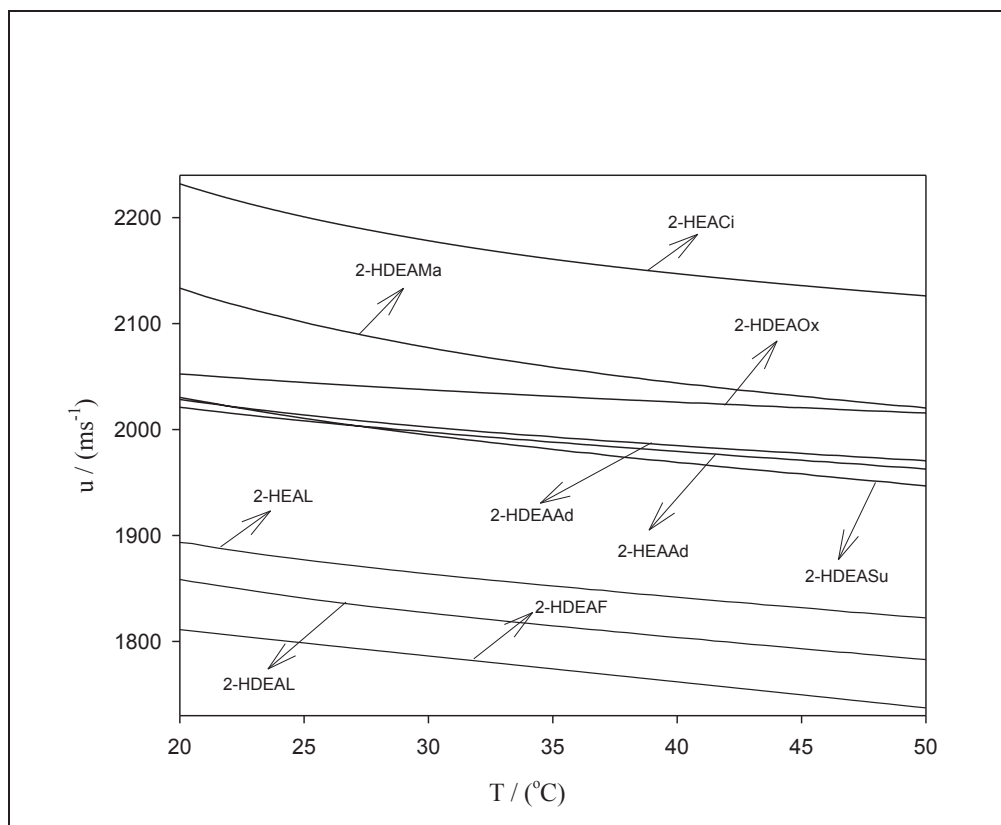
Os demais espectros estão apresentados no Apêndice II.

## 5.2. Propriedades termodinâmicas

O conhecimento de dados físico-químicos dos LIPs é muito importante tanto para o desenho de futuras tecnologias limpas, quanto para o entendimento dos tipos de interações entre estes potenciais solventes e os substratos e/ou outros cosolventes presentes nos meios de reação nos quais vão ser aplicados. As medidas de massa específica e velocidade de propagação do som para a gama de LIPs investigada estão indicadas nas Figuras 15 e 16, respectivamente.



**Figura 15.** Massas específicas experimentais dos LIPs na faixa de temperatura de 20 a 50 °C.



**Figura 16.** Velocidades de propagação do som experimentais dos LIPs na faixa de temperatura de 20 a 50 °C.

Os gráficos acima mostram que as propriedades, massa específica e velocidade de propagação do som, para todos os LIPs sintetizados, diminuem com o aumento da temperatura, como era esperado, devido ao aumento da cinética dos íons. As propriedades físico-químicas dos LIPs são fortemente influenciadas pelas cadeias orgânicas dos íons que os formam. As cadeias orgânicas em ambos os íons que formam os LIPs tem fortes efeitos nas propriedades físico-químicas, onde o impedimento estérico e as interações covalentes são fatores importantes para a acomodação iônica dentro do entrelaçado líquido. Nos LIPs estudados é importante analisar o comprimento da cadeia aniônica e a substituição do cátion, pois, o grau de influência destes fatores depende da natureza destes íons, onde o ânion contribui mais significativamente devido a sua longa estrutura, acarretando algumas perturbações na acomodação de toda estrutura iônica. Esses sais apresentaram altos valores de massa específica e velocidade de propagação do som quando na sua composição tem-se ânion de menor massa molecular com cátion de maior massa molecular com o mesmo ânion. Exemplo, o 2-HEAL e 2-HDEAL; o 2-HEAAd e 2-HDEAAd.

Estes dados de massa específica são similares aos dados de alguns LIAs, nas mesmas condições de temperatura e pressão, reportado por Gacino *et al* (2016). Outros dados experimentais de massa específica e velocidade de propagação do som também são reportados

por Chhotaray & Gardas (2014), estes mostram gráficos semelhantes aos indicados nas Figuras 15 e 16.

Na Tabela 16 estão descritos os parâmetros de correlação para massa específica e velocidade de propagação do som para a gama de LIPs estudada no presente trabalho.

**Tabela 16.** Parâmetros de correlação para a massa específica e a velocidade de propagação do som (Equação 1) na faixa de temperatura de 20 a 50 °C, e raiz do desvio quadrático médio ( $\sigma$ ) (Equação 2), para os LIPs.

LIP	Propriedade	$A_0$	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$\sigma$
2-HDEAF	$\rho$	1,2099E+00	-6,2570E-04	-3,47799E-07	-1,1295E-09	2,9199E-05
	u	1,8651E+03	-2,9226E+00	1,3500E-02	-1,2454E-04	3,0166E-02
2-HEAL	$\rho$	1,2274E+00	-4,9883E-04	-4,1427E-06	7,8466E-08	2,1622E-05
	u	1,9982E+03	-7,3274E+00	1,2310E-01	-9,4255E-04	2,0610E-01
2-HDEAL	$\rho$	1,2344E+00	-5,0096E-04	-5,4783E-06	8,5105E-08	2,0150E-05
	u	1,9736E+03	-8,1770E+00	1,4290E-01	-1,1153E-03	1,7542E-01
2-HEAAAd	$\rho$	1,2050E+00	-3,8985E-04	-3,4268E-06	6,3484E-08	1,7064E-05
	u	2,1261E+03	-6,9764E+00	1,2170E-01	-8,8940E-04	1,2680E-01
2-HDEAOx	$\rho$	1,2764E+00	-7,2771E-04	5,5308E-06	-2,6014E-08	3,5956E-05
	u	2,1011E+03	-3,2598E+00	4,8500E-02	-3,5138E-04	8,4590E-02
2-HDEAMa	$\rho$	1,2930E+00	-4,5271E-04	-2,7213E-06	5,5181E-08	1,6899E-05
	u	2,3612E+03	-1,6627E+01	3,0290E-01	-2,1373E-03	2,2637E-01
2-HDEASu	$\rho$	1,2418E+00	-4,2698E-04	-4,9264E-06	8,0052E-08	1,9967E-05
	u	2,0970E+03	-5,1607E+00	7,9500E-02	-6,0044E-04	1,3685E-01
2-HDEAAAd	$\rho$	1,2380E+00	-8,8676E-04	1,0974E-05	-6,3142E-08	5,7577E-05
	u	2,1572E+03	-8,9002E+00	1,4950E-01	-1,1151E-03	1,6815E-01
2-HEACi	$\rho$	1,3327E+00	-9,5858E-05	-1,1869E-05	1,0715E-05	4,8333E-05
	u	2,4539E+03	-16,2752E+00	0,2987E+00	-2,0885E-03	1,9878E-01

Foram feitas correlações para os dados experimentais de massa específica e velocidade de propagação do som com o objetivo de encontrar equações que permitam uma estimativa dessas propriedades em outras temperaturas não estudadas, uma vez que estas análises limitaram-se a uma faixa de temperatura de 20 a 50 °C. Essas correlações foram feitas utilizando a Equação 1. Através da Equação 2, calculou-se a raiz dos desvios quadráticos médios ( $\sigma$ ).

Os parâmetros de correlação são encontrados na Tabela 16, e sugerem modelos que se ajustam bem aos valores experimentais, com desvios menores que 0,005% para massa específica e cerca de 20% velocidade de propagação do som.

O fato também de o modelo de estimação de ponto crítico (Valderrama & Robles, 2007) ter como base de dados para cálculo dos parâmetros internos do modelo unicamente valores estruturais de LIs da classe dos apróticos justifica que os resultados obtidos só mostrem uma concordância qualitativa, em termos gerais.

### 5.3. Modelos de predição das propriedades medidas

O cálculo de propriedades críticas assim como outros parâmetros físicos de LIPs faz-se necessário para o desenvolvimento de modelos termodinâmicos. Os métodos de contribuição de grupo têm sido comumente empregados para estimar as propriedades críticas de muitas substâncias cujas propriedades não estão disponíveis na bibliografia científica. O método requer apenas o conhecimento da estrutura da molécula e o seu peso molecular (Valderrama & Robles, 2007).

O conhecimento dessas propriedades críticas é importante para a predição de massa específica através dos modelos sugeridos neste trabalho de pesquisa. Os dados para os LIPs estudados não são encontrados na literatura científica. Logo, a importância de estimar essas propriedades através de modelos de contribuição de grupo, os quais já foram desenvolvidos para compostos iônicos semelhantes aos LIPs. Foi aplicado o modelo proposto por Valderrama & Robles (2007).

A Tabela 17 mostra as propriedades críticas estimadas para esse trabalho.

**Tabela 17.** Valores críticos estimados para LIPs pelo método de Valderrama & Robles (2007).

LIP	$P_c$ / (bar)	$T_c$ / (K)	$Z_c$	$\omega$
2-HDEAF	130,12	811,27	0,8292	2,162
2-HEAL	45,40	728,63	0,2981	0,985
2-HDEAL	34,12	856,82	0,2597	1,453
2-HEAAAd	22,88	1069,21	0,2039	1,648
2-HDEAOx	22,02	1289,76	0,1751	1,684
2-HDEAMa	21,23	1342,67	0,1796	1,650
2-HDEASu	19,29	1353,15	0,1658	1,485
2-HDEAAAd	17,15	1420,81	0,1570	1,280
2-HEACi	20,02	1516,19	0,1602	1,443

Foram obtidos valores elevados de temperatura crítica para os LIPs, os quais estão relacionados à sua alta massa molecular.

Os modelos aplicados na estimativa de massa específica (Rackett (R) (Equação 9), Rackett-Spencer-Danner (RM) (Equações 9 e 10), Mchaweh-Nasrifar-Moshfeghian (MNM) (Equação 5) e Índice de Conectividade Mássica (ICM) (Equação 12)) representam bem o comportamento da massa específica para compostos moleculares, não havendo, ainda, na bibliografia científica modelos próprios para compostos iônicos de alto peso molecular como os LIPs estudados neste trabalho.

A raiz do desvio quadrático médio ( $\sigma$ ) (Equação 2) para as predições de massa específica para cada LIP estudado pode ser encontrada na Tabela 18.

**Tabela 18.** Raiz dos desvios quadráticos médio ( $\sigma$ ) (Equação 2) dos dados experimentais e estimados para a massa específica, pelos métodos de Mchaweh-Nasrifar–Moshfeghian (MNM) (Equação 5), Rackett (R), Spencer-Danner-Rackett (RM) (Equação 9) e Índice de Conectividade Mássica (ICM) (Equação 12).

LIP	R	RM	MNM	ICM
2-HDEAF	0,7680	2,3965	0,5571	0,0064
2-HEAL	0,0081	0,1897	0,2472	0,0064
2-HDEAL	0,1085	0,0678	0,3666	0,0041
2-HEAAd	0,2624	0,0934	0,3687	0,0013
2-HDEAOx	0,5301	0,2623	0,4117	0,0018
2-HDEAMa	0,4470	0,2615	0,3539	0,0018
2-HDEASu	0,6007	0,2693	0,1515	0,0027
2-HDEAAd	0,6592	0,3175	0,2043	0,0060
2-HEACi	0,7785	0,2886	0,3635	0,0006

Os menores desvios são percebidos para os LIPs de menor peso molecular, em sua maioria, sendo o modelo de Índice de Conectividade Mássica (ICM) o mais adequado na predição de massa específica, apresentando os menores desvios em todos os compostos, conforme pode ser visto na Tabela 18.

Para os valores experimentais de velocidade de propagação do som, as predições foram realizadas através da aplicação da Teoria do Fator de Colisão (Collision Factor Theory, Equação 13).

A Tabela 19 apresenta os desvios calculados para esse modelo.

**Tabela 19.** Raiz dos desvios quadráticos médios ( $\sigma$ ) (Equação 2) dos dados experimentais e estimados para velocidade de propagação do som dos LIPs estudados pela Collision Factor Theory (Equação 13).

LIP	CFT
2-HDEAF	70,85
2-HEAL	71,12
2-HDEAL	63,11
2-HEAAd	79,19
2-HDEAOx	83,89
2-HDEAMa	60,06
2-HDEASu	59,67
2-HDEAAd	68,63
2-HEACi	84,36

Os LIPs com massas moleculares muito análogas (2-HDEAF com 2-HEAL e 2-HDEAMa com o 2-HDEASu), por exemplo, apresentaram desvios de predição muito próximos. Decerto, devido ao fato de o modelo ter sido desenhado para moléculas covalentes, os desvios apresentaram-se relativamente altos, porém, em termos gerais, os resultados apresentam uma concordância qualitativa.

LIPs de alto peso molecular e natureza polieletrólítica (aqueles cuja síntese é feita com ânions oxalato, succinato, maleato, adipato e citrato) apresentaram os maiores resultados para as propriedades estudadas. Os valores medidos de massa específica e velocidade de propagação do som expressam a natureza de alta interação entre os íons, apresentando valores elevados para ambas as propriedades. A massa específica e a velocidade de propagação do som também apontaram uma tendência decrescente com o aumento da temperatura, em virtude de uma maior cinética iônica.

Na bibliografia científica só existem medições pontuais dos LIPs: 2-Hidróxi Etanolamina Formiato (2-HEAF), 2-Hidróxi Etanolamina Acetato (2-HEAA) e 2-Hidróxi Etanolamina Propionato (2-HEAPr) (Cota *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2010; Kurnia & Mutalib, 2011a; Kurnia *et al.*, 2011b, 2011c; Taib *et al.*, 2013). Para a maioria dos LIPs aqui



estudados, as medições apresentadas neste trabalho, são as primeiras realizadas experimentalmente.

#### 5.4. Estudo do coeficiente de partição dos líquidos iônicos próticos

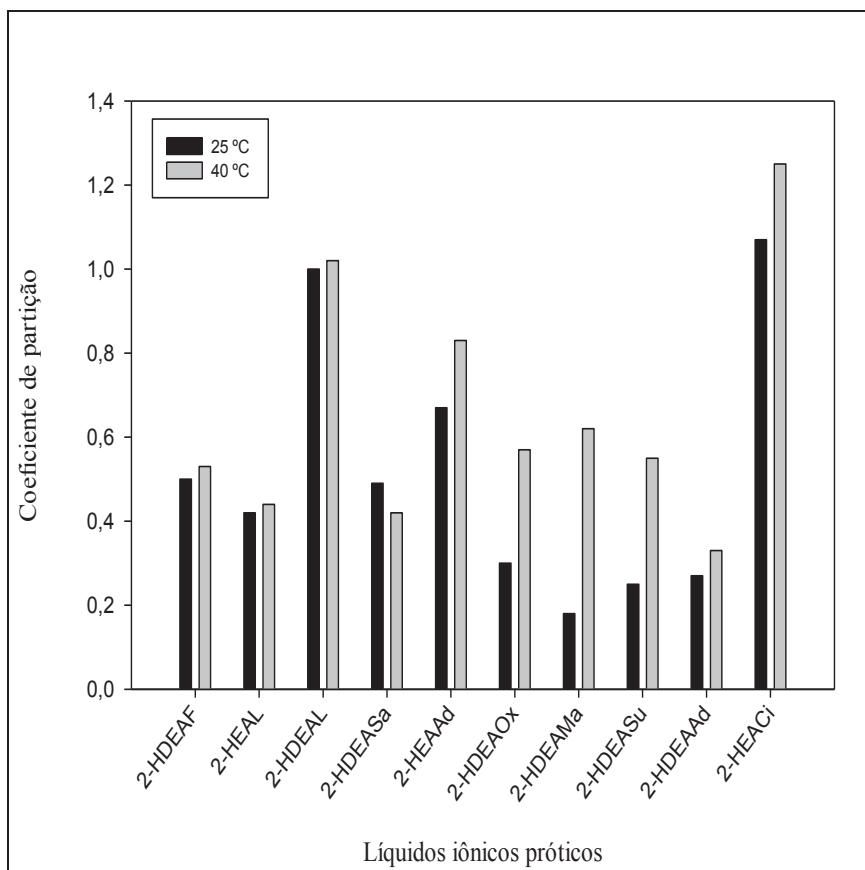
Um dos mais importantes parâmetros estudados neste trabalho foi o coeficiente de partição dos LIPs ( $K_{ow}$ ), o qual descreve quantitativamente os efeitos dos solventes nas reações enzimáticas, pois, muitos solventes tem tendência a remover água do microambiente da enzima e isso pode levar a desidratação e a perda da atividade catalítica da mesma, uma vez que uma camada de água é essencial para manter a conformação tridimensional cataliticamente ativa destes biocatalisadores (Zaks & Klibanov, 1988; Halling, 1994). Por esse motivo, os solventes hidrofóbicos, usualmente, apresentam melhores resultados em reações enzimáticas (Bell *et al.*, 1995; Lozano *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2015). Contudo, o sistema de reação enzimática na presença de solventes não aquosos envolve múltiplas interações complexas entre todos os componentes reacionais. Portanto, a relação entre eficiência catalítica das enzimas e hidrofobicidade/hidrofilicidade dos solventes que compõem o meio de reação não é direta e simples. O que é necessário entender é que independente do tipo de solvente empregado na reação catalisada por uma enzima é crucial garantir a manutenção da camada de água que sustenta a conformação tridimensional ativa do biocatalisador.

A Tabela 20 e a Figura 17 mostram os resultados dessa propriedade determinada a duas temperaturas distintas (25 °C e 40 °C).

**Tabela 20.** Coeficientes de partição medidos dos LIPs.

LIPs	$K_{OW}$	
	Temperaturas	
	25 °C	40 °C
2-HDEAF	0,50	0,53
2-HEAL	0,42	0,44
2-HDEAL	1,00	1,02
2-HDEASa	0,49	0,42
2-HEAAd	0,67	0,83
2-HDEAOx	0,30	0,57
2-HDEAMa	0,18	0,62
2-HDEASu	0,25	0,55
2-HDEAAd	0,27	0,33
2-HEACi	1,07	1,25

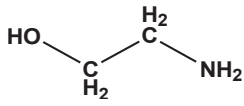
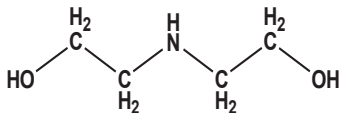
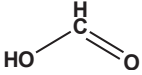
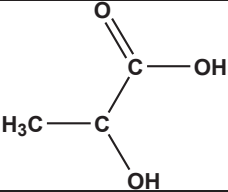
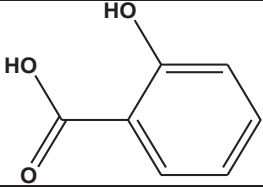
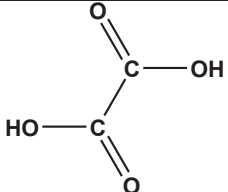
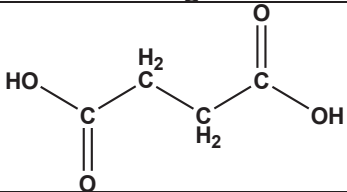
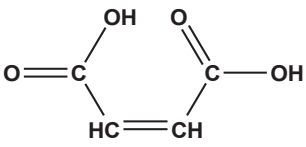
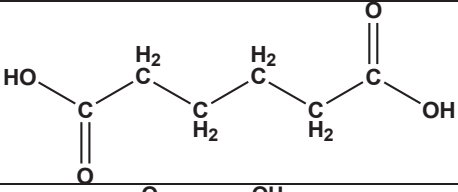
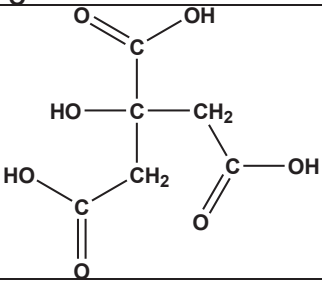
Como mostra a Tabela 20, a temperatura tem efeitos substanciais sobre o coeficiente de partição, na qual se observa uma tendência do aumento dos valores do coeficiente de partição com o aumento da temperatura.



**Figura 17.** Coeficiente de partição dos LIPs a 25 °C e 40 °C.

Analisando o gráfico da Figura 17, é possível constatar que os LIPs monoelétrólitos (2-HDEAF, 2-HEAL, 2-HDEAL e 2-HDEASa) estão mais inertes a elevação da temperatura, enquanto que os polieletrólitos (2-HEAAd, 2-HDEAOx, 2-HDEAMa, 2-HDEASu e 2-HEACi) apresentaram-se mais sensíveis a temperatura, elevando seu coeficiente de partição, consequentemente são mais lipofílicos, com exceção do 2-HDEAAd, o qual não apresentou grande variação dessa propriedade com a temperatura certamente devido ao impedimento estérico que o mesmo apresenta em relação ao 2-HEAAd. As estruturas dos LIPs em questão podem ser melhor compreendidas através da análise dos ácidos e bases que os compõem (Tabela 21).

Tabela 21. Estruturas dos ácidos e bases dos LIPs.

REAGENTES		Monoetanolamina	Dietanolamina
			
Ácido fórmico		NS*	2-Hidróxi Dietanolamina Formiato
Ácido láctico		2-Hidróxi Etanolamina Lactato	2-Hidróxi Dietanolamina Lactato
Ácido salicílico		NS*	2-Hidróxi Dietanolamina Salicilato
Ácido oxálico		NS*	2-Hidróxi Dietanolamina Oxalato
Ácido succínico		NS*	2-Hidróxi Dietanolamina Succinato
Ácido maleico		NS*	2-Hidróxi Dietanolamina Maleato
Ácido adípico		2-Hidróxi Etanolamina Adipato	2-Hidróxi Dietanolamina Adipato
Ácido cítrico		2-Hidróxi Etanolamina Citrato	NS*

Dentre os LIPs analisados pela determinação do coeficiente de partição ( $K_{ow}$ ), o 2-Hidróxi Etanolamina Citrato (2-HEACi) e o 2-Hidróxi Dietanolamina Lactato (2-HDEAL) apresentam-se como os mais hidrofóbicos, enquanto que o 2-Hidróxi Dietanolamina Adipato (2-HDEAAd) é o mais hidrofílico.

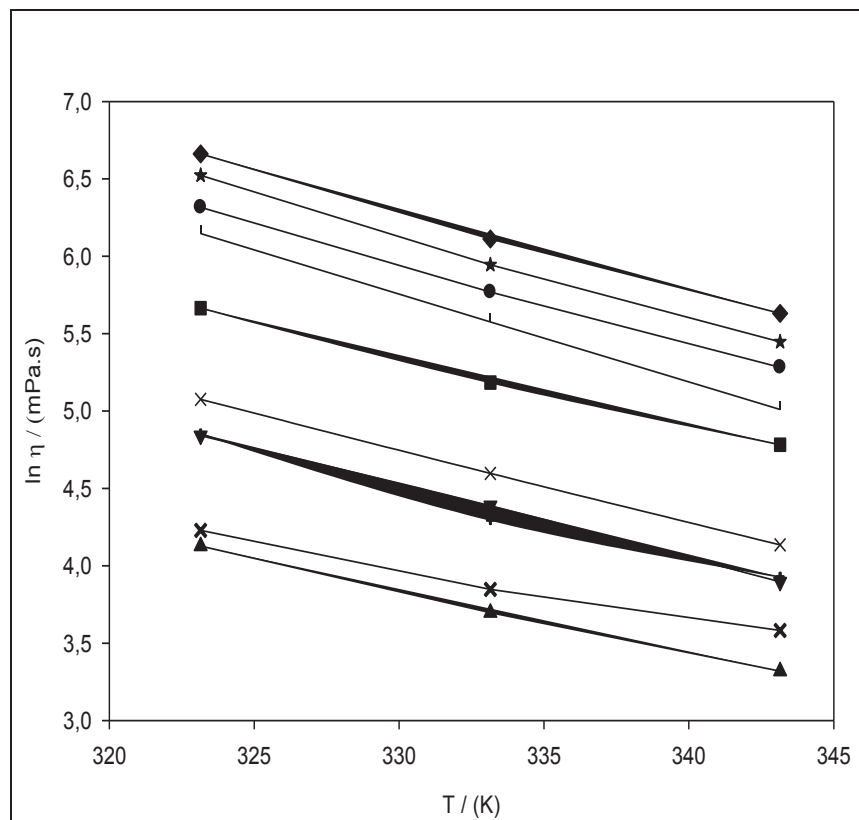
É importante fazer a distinção entre os conceitos de hidrofobicidade e polaridade, porque o primeiro é muitas vezes relacionado com a miscibilidade em água, então, hidrofobicidade pode ser considerada como um conceito mais restrito de polaridade (Zhao, 2010). Contudo, é válido reforçar que apresentar polaridade similar não significa ter miscibilidade similar, solventes com polaridades próximas podem ter miscibilidade em água distinta, por exemplo.

A polaridade do solvente tem um impacto importante na biocatálise. Os solventes apolares são incapazes de dissolver substratos polares, mas por outro lado, solventes polares, tais como DMSO ou DMF tendem a desativar as enzimas. A polaridade influencia a estabilidade e a atividade da enzima (Park & Kazlauskas, 2003). Assim, através das medidas de coeficiente de partição, tem-se uma boa ideia sobre o comportamento dos LIPs em contato com a água, ou seja, quais LIPs vão ter as maiores tendências em retirar a camada de água essencial que mantém o poder catalítico das enzimas. Com isso, os LIPs mais indicados para a aplicação proposta, de acordo com o coeficiente de partição, são o 2-HEACi e o 2-HDEAL.

### 5.5. Análise da viscosidade dos líquidos iônicos próticos

A viscosidade é dependente das interações íon-íon, principalmente interações de van der Waals entre extremidades alifáticas e ligações de hidrogênio (Yu *et al.*, 2012). Interações maiores (cadeias ramificadas, estruturas maiores, diferentes grupos hidroxílicos) conduzem aos altos valores de viscosidade.

A Figura 18 apresenta o comportamento da viscosidade dos LIPs em função da temperatura. A viscosidade de todos os LIPs decresce com o aumento da temperatura, o que já era esperado nos líquidos. Além da temperatura, outras características têm influência sobre a viscosidade dos LIPs, como a sua geometria (tamanho molecular) (Mukherjee *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2013), como pode ser observado na Figura 18, os LIPs cuja síntese é feita com ânions menores, como: formiatos, oxalatos e lactatos apresentam menor viscosidade.



**Figura 18.** Viscosidade ( $\ln(\eta)$ ) em função da temperatura, para  $SR = 10,2 \text{ s}^{-1}$ , sendo (▲) (2-HDEAF), (+) (2-HEAL), (▼) (2-HDEAL), (|) (2-HDEASa), (■) (2-HEAAd), (x) (2-HDEAOx), (★) (2-HDEAMa), (x) (2-HDEASu), (●) (2-HDEAAAd) e (◆) (2-HEACi).

Alguns LIPs são bem mais viscosos do que outros, o que influencia de forma direta e determinante na prospecção de qualquer processo. Nesse estudo foi possível comprovar que o 2-Hidróxi Dietanolamina Formiato (2-HDEAF) possui menores valores de viscosidade, enquanto que o 2-Hidróxi Etanolamina Citrato (2-HEACi) é o mais viscoso dos LIPs estudados nesse trabalho.

Em regra, LIs são muito mais viscosos do que os solventes orgânicos convencionais (Wilkes, 2004). Isto pode ser uma desvantagem para biocatálise, pois pode levar a uma limitação da transferência de massa. No entanto, a viscosidade pode ser minimizada através do aumento da temperatura (Tabela 22). Além disso, a escolha do ânion influencia fortemente a viscosidade dos LIs, por exemplo, ânions menores resultam em LIs menos viscosos (Park & Kazlauskas, 2003). Todos os LIs são fluidos não newtonianos em que a viscosidade depende da taxa de cisalhamento bem como da temperatura (Moosavi & Daneshvar, 2014), o que não é diferente para os nossos LIPs.

**Tabela 22.** Massa específica ( $\rho$ ) e viscosidades ( $\eta$ ) como função da temperatura para o estudo de LIPs. A viscosidade experimental foi medida com o SR = 10,2 s<sup>-1</sup>.

T (K)	$\rho$ (g.cm <sup>-3</sup> )		$\eta$ (mPa.s)	
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.
<b>2- HDEAF</b>				
323,15	1,1815	NA	62,008	NA
333,15	1,1758	NA	40,346	NA
343,15	1,1704	NA	27,646	NA
<b>2-HEAL</b>				
323,15	1,2019	NA	128,098	NA
333,15	1,1993	NA	73,422	NA
343,15	1,1991	NA	50,770	NA
<b>2-HDEAL</b>				
323,15	1,2063	NA	126,536	NA
333,15	1,2030	NA	80,452	NA
343,15	1,1979	NA	49,208	NA
<b>2- HDEASa</b>				
323,15	1,1995	NA	124,980	NA
333,15	1,1932	NA	73,116	NA
343,15	1,1869	NA	45,981	NA
<b>2-HEAAd</b>				
323,15	1,1849	NA	288,670	NA
333,15	1,1818	NA	178,422	NA
343,15	1,1787	NA	119,362	NA
<b>2-HDEAOx</b>				
323,15	1,2505	NA	68,620	NA
333,15	1,2466	NA	46,865	NA
343,15	1,1427	NA	35,930	NA
<b>2-HDEAMa</b>				
323,15	1,2705	NA	680,324	NA
333,15	1,2670	NA	381,950	NA
343,15	1,2633	NA	231,982	NA
<b>2-HDEASu</b>				
323,15	1,2181	NA	160,122	NA
333,15	1,2143	NA	99,198	NA
343,15	1,2104	NA	62,487	NA
<b>2-HDEAAd</b>				
323,15	1,2133	NA	553,788	NA
333,15	1,2104	NA	320,244	NA
343,15	1,2076	NA	196,833	NA
<b>2-HEACi</b>				
323,15	1,3116	NA	782,365	NA
333,15	1,3066	NA	451,566	NA
343,15	1,3015	NA	278,845	NA

NA = Não Avaliado

Foi observado que a estrutura aniônica dos LIPs estudados tem um efeito muito mais forte sobre as propriedades reológicas do que as alterações análogas às do cátion; segundo Park & Kazlauskas (2003) a escolha do ânion influencia significativamente a viscosidade dos LIs, ou seja, quanto menor for o ânion menor será a viscosidade do LI.

#### 5.6. Testes de solubilidade da galactose em líquidos iônicos próticos

A solubilidade da galactose, carboidrato modelo deste trabalho, foi avaliada em cada um dos LIPs na temperatura de 60 °C, pois, esta é a temperatura de interesse para atuação da preparação enzimática.

O estudo realizado com os seguintes LIPs: 2-Hidróxi Dietanolamina Formiato (2-HDEAF), 2-Hidróxi Dietanolamina Lactato (2-HDEAL), 2-Hidróxi Dietanolamina Salicilato (2-HDEASa), 2-Hidróxi Dietanolamina Oxalato (2-HDEAOx) e o 2-Hidróxi Dietanolamina Maleato (2-HDEAMa) apresentou bons resultados comparado com dados de solubilidade da galactose em LIAs no trabalho de Mohan *et al.* (2015). Os demais LIPs não citados nesta lista foram testados, mas apresentaram um comportamento que inviabiliza seu potencial uso nas etapas seguintes de síntese enzimática do biossurfactante: é muito provável que tenha ocorrido a Reação de Maillard (descrita em detalhes adiante) e, com isso, os LIPs envolvidos nesse processo foram descartados uma vez que há uma reação inespecífica ocorrendo paralelamente ocasionando o consumo indesejado de um dos substratos da reação biocatalítica de interesse. Quando se trata da implementação de novos meios de reação não aquosos, um pré-requisito para a viabilidade de uso de determinado solvente é que apresente um caráter inerte aos substratos do processo visando alcançar maiores conversões no bioproduto alvo.

Na sequência (Tabela 23), têm-se os resultados desses testes com a galactose nos LIPs citados acima e que não apresentaram reação inespecífica aparente. Destaque para o líquido iônico 2-Hidróxi Dietanolamina Formiato (2-HDEAF), o qual foi o LIP que mais solubilizou a galactose, alcançando um percentual de massa de 20,44. Verificou-se na literatura que a solubilidade da galactose no LIA, 1-etil-3-metilimidazólio etilsulfato – [EMIM][EtSO<sub>4</sub>], apresentou um percentual de massa de 14% (a 55 °C, temperatura encontrada mais próxima da nossa de interesse) de acordo com o trabalho de Carneiro *et al.*, (2012). Segundo Mohan *et al* (2015), em seu trabalho, a solubilidade da galactose nos LIs, 1-etil-3-metilimidazólio tiocianato [EMIM][SCN] e o Tris (2-hidroxietil) metilamônio metilsulfato [TMA] [MeSO<sub>4</sub>], a



60 °C, são em % massa, 11,94 e 2,20 respectivamente. Com isso, é possível classificar nossos resultados de solubilidade da galactose nos LIPs, a 60 °C, como bons relatados, na Tabela 23.

**Tabela 23.** Solubilidade da galactose (% massa) em LIPs a 60 °C.

LIP	Solubilidade (% massa)
2-HDEAF	20,44
2-HDEAL	14,58
2-HDEASa	8,36
2-HDEAOx	14,18
2-HDEAMa	18,84

A Reação de Maillard é uma reação do tipo carbonila-amina de escurecimento não enzimático que pode ocorrer em alguns alimentos. As reações químicas que resultam do fenômeno de escurecimento dos alimentos à medida que são aquecidos foram primeiramente descritas em 1912 pelo bioquímico francês Louis-Camille Maillard, que publicou o primeiro estudo sistemático mostrando que aminoácidos e açúcares redutores iniciam uma complexa cascata de reações durante o aquecimento, resultando na formação final de substâncias marrons que são chamadas de melanoidinas (Friedman, 1996; Finot, 2005).

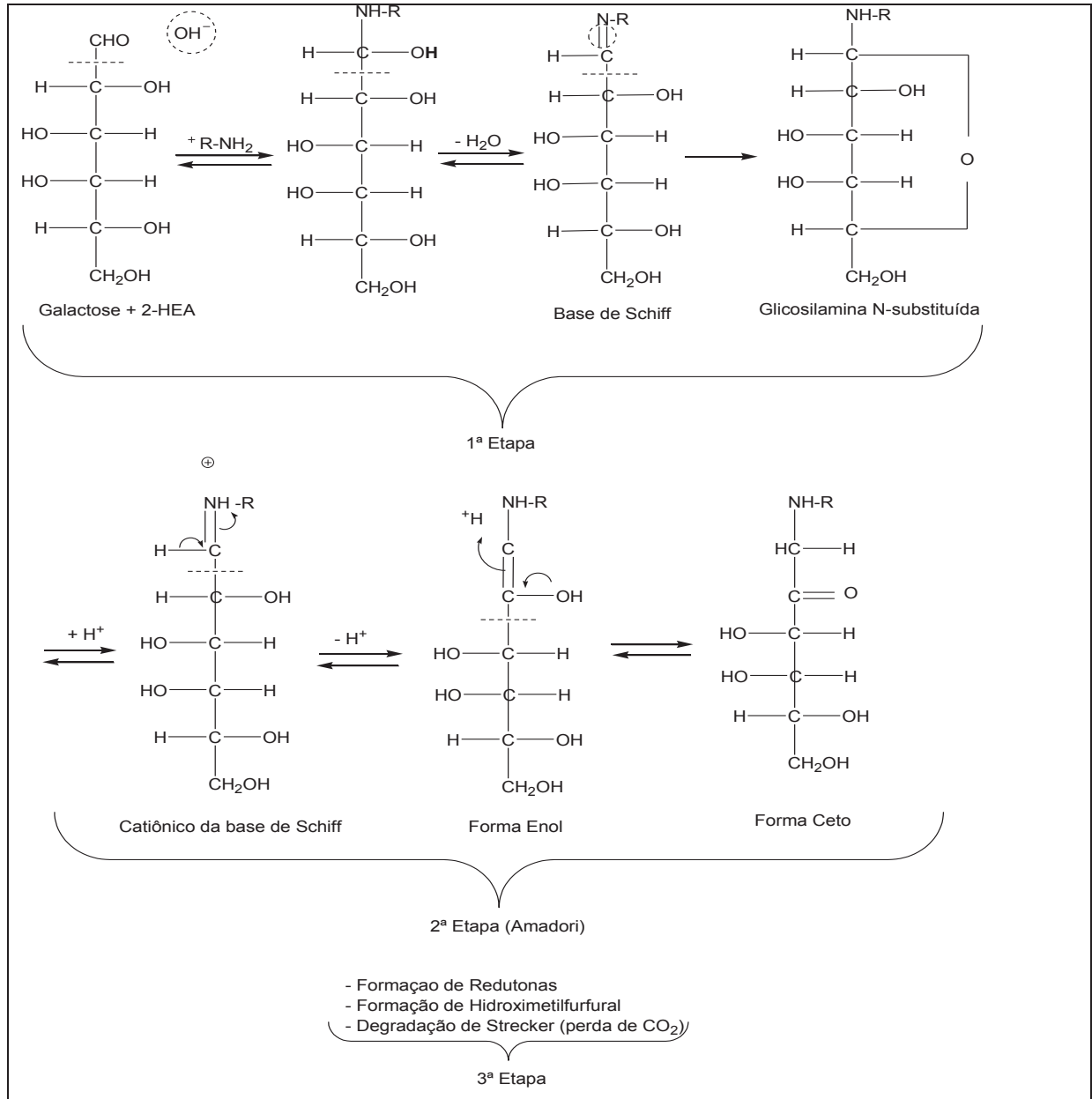
A Reação de Maillard inicia-se com o ataque nucleofílico do grupo carbonílico de um açúcar redutor, por exemplo, ao grupamento amina de proteínas (Nunes, 2001). A ocorrência dessas reações depende de alguns fatores como: temperaturas elevadas (acima de 40 °C), atividade termodinâmica de água ( $a_w$ ) na faixa de 0,4 a 0,7, pH na faixa de 6 a 8 (preferencialmente alcalino), umidade relativa de 30 a 70% e presença de íons metálicos de transição (como  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ), que podem catalisar a reação (Kwak, 2004). Além disso, o tipo de açúcar redutor interfere na velocidade de reação com os grupamentos amina, sendo o açúcar redutor mais reativo a xilose, seguida de arabinose, glicose, maltose e frutose, indicando que as pentoses são mais reativas do que as hexoses. Ainda, os açúcares redutores diferem na via de escurecimento, sendo que as aldoses são mais reativas para a formação de produtos de Amadori, enquanto que as cetoses são para a formação de produtos de Heyns (Shibao & Bastos, 2011).

A Reação de Maillard é dividida em três etapas: inicial, intermediária e final, segundo o esquema inicialmente proposto por Hodge em 1953 e citado por Nursten (Hodge, 1953;

Martins *et al.*, 2000; Nursten, 2005;). Alguns dos compostos formados são identificados como característicos de cada uma dessas etapas, as quais não ocorrem de uma simples forma sequencial, mas em cascata. Inicialmente ocorre a condensação da carbonila de um açúcar redutor, por exemplo, com um grupamento amina proveniente de aminoácidos livres ou de proteínas, levando à formação de glicosilaminas N-substituídas. Esse é o primeiro produto estável formado da Reação de Maillard. Em alimentos que contenham proteína, o grupamento amino do resíduo de lisina é o alvo principal para o ataque de açúcares redutores. Os produtos formados nessa etapa não possuem cor, fluorescência ou absorção característica na região do ultravioleta (Nursten, 2005). Na etapa seguinte, prolongando-se o aquecimento ou armazenamento, os produtos de Amadori dão origem a uma série de reações como a desidratação, enolização e retroaldolização, resultando em compostos dicarbonílicos, redetonas e derivados do furfural, ou ainda em produtos da degradação de Strecker (produtos de degradação de aminoácidos). É observado nessa etapa o aumento da geração produtos fluorescentes e de substâncias capazes de absorver radiação na região do ultravioleta (Delgado-Andrade *et al.*, 2009). Na última fase da Reação de Maillard, os produtos intermediários (dicarbonílicos), muito reativos, podem reagir com, por exemplo, resíduos de lisina em proteínas, formando compostos estáveis. Nessa etapa ocorrem reações de fragmentação e polimerização, com a geração de melanoidinas, compostos de coloração marrom. Durante o processo são formados compostos voláteis, tais como cetonas e aldeídos, que conferem o aroma característico aos produtos (Hodge, 1953; Martins, 2000; Nursten, 2005; Delgado-Andrade *et al.*, 2009; Rufián-Renares *et al.*, 2009).

No caso do presente estudo, temos o carboidrato galactose (hexose) em contato com diferentes tipos de LIPs baseados nos cátions monoetanolamina (aqui representado por 2-HEA) e dietanolamina (aqui representado por 2-HDEA) a temperaturas acima da ambiente e faixa de pH variável. Por se tratar de meios naturalmente higroscópicos, certamente há um teor de água considerável nos meios de incubação configurados para solubilizar o carboidrato. Portanto, os fatores críticos favoráveis para desencadear a Reação de Maillard estão presentes neste processo de solubilização da galactose em LIPs, ou seja, há a disponibilidade para a interação do tipo carbonila-amina de escurecimento não enzimático. Especificamente para os substratos em questão, a provável Reação de Maillard está proposta a seguir. Apenas algumas etapas do processo estão sugeridas no esquema abaixo para mostrar a real possibilidade de ocorrência neste estudo, uma vez que por se tratar de uma cascata de reações paralelas ocorrendo de modo complexo, um trabalho investigativo mais completo precisa ser feito para identificar todos os possíveis intermediários deste processo.

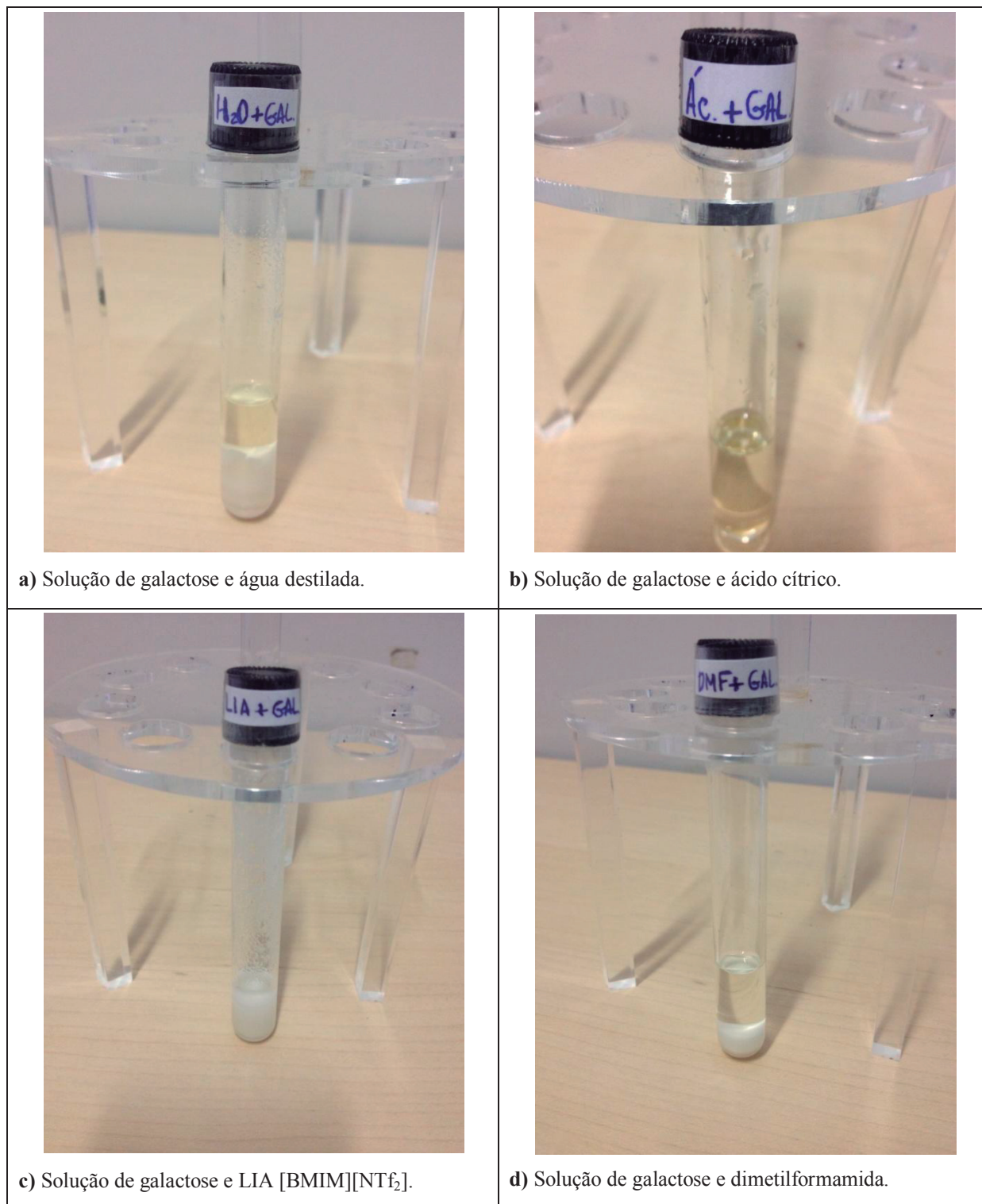
Abaixo (Figura 19), detalhes da Reação de Maillard entre a galactose (carbonila) e a parte catiônica 2-HEA (amina) que compõe o LIP:



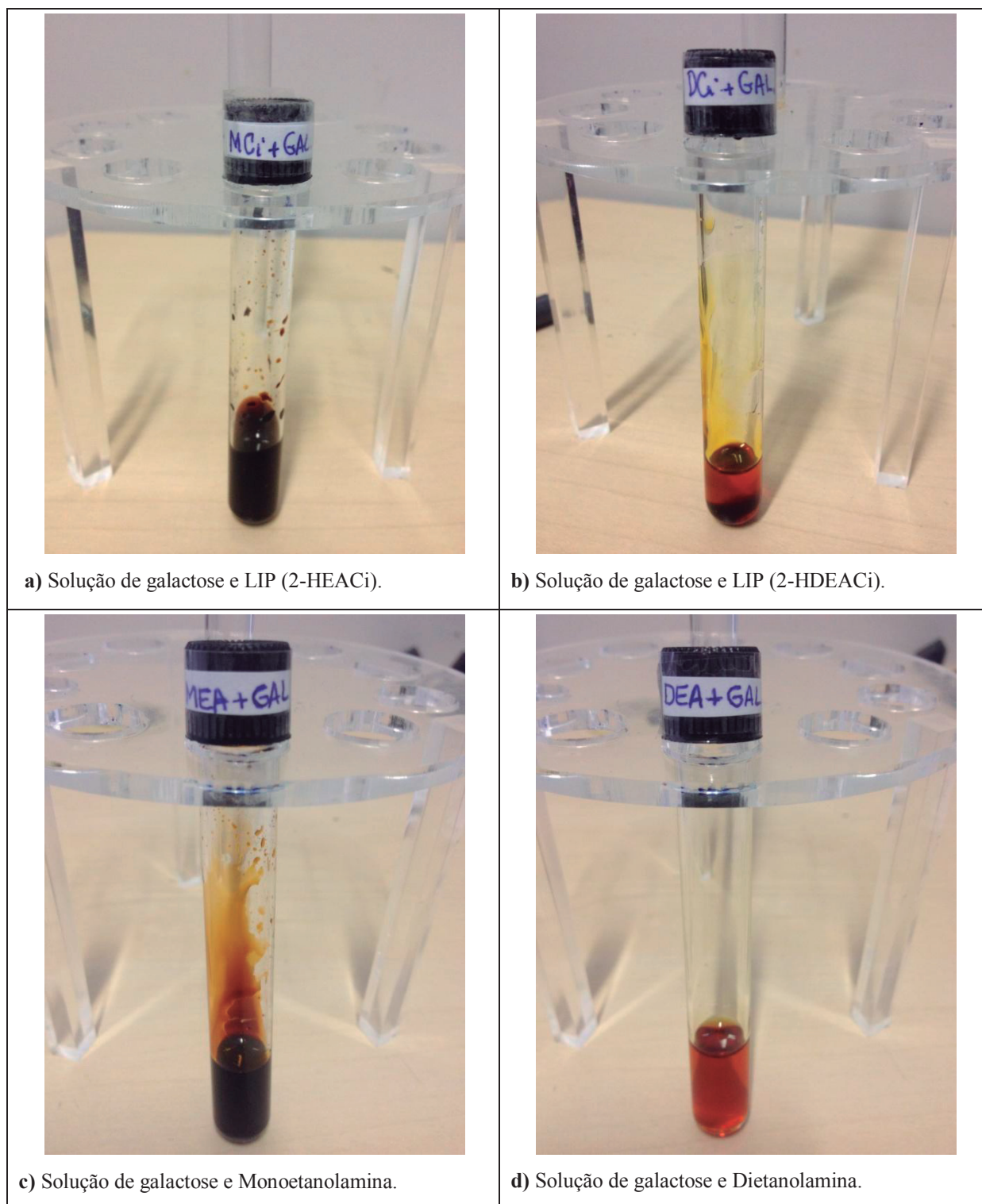
**Figura 19.** Reação de Maillard.

A seguir apresentamos alguns dos testes que indicam fortemente a ocorrência da Reação de Maillard. As montagens (Figuras 20 e 21) mostram os testes feitos com a galactose. A Figura 20 apresenta soluções da galactose em água, ácido cítrico, LIA 1-butil-3-metilimidazólio de bis (trifluormetilsulfonyl) imida [BMIM][NTf<sub>2</sub>] e dimetilformamida

(DMF), separadamente, estes não caracterizaram a Reação de Maillard como ocorreu em soluções de alguns LIPs e com as aminas (Figura 21).



**Figura 20.** Imagens das soluções que não apresentaram Reação de Maillard.



**Figura 21.** Imagens das soluções que apresentaram Reação de Maillard.

É interessante notar que os testes apresentados nas Figuras 20 e 21 foram todos realizados nas mesmas condições experimentais à temperatura de 60 °C. Como era de se esperar, não houve reação de escurecimento não enzimático característica do tipo carbonila-amina ou Reação de Maillard quando a galactose foi incubada em contato com água, ácido



cítrico, DMF ou [BMIM][NTf<sub>2</sub>] (Figura 20). Ao contrário, a incubação da galactose em LIP formado pela porção aniônica citrato (2-HEACi ou 2-HDEACi), independentemente se com a porção catiônica 2-HEA ou 2-HDEA, apresentou a reação indesejada de escurecimento não enzimático, conforme pode ser claramente observado na Figura 21. O contato da galactose somente com as aminas (2-HEA ou 2-HDEA) que dão origem aos LIPs igualmente ocasionou a degradação indesejada da galactose. Uma possível explicação para o fato de que todos os LIPs serem baseados nestes cátions (2-HEA e 2-HDEA) e em alguns casos ocorrer a Reação de Maillard, enquanto em outros casos não ocorrer a Reação de Maillard fundamenta-se muito provavelmente nos outros fatores que são favoráveis ao processo, quais sejam: pH alcalino e umidade. A Tabela 24 a seguir apresenta os valores de pH dos LIPs.

**Tabela 24.** Medidas de pH dos LIPs.

LIP	pH
2-HDEAF	6,19
2-HEAL	6,95
2-HDEAL	5,07
2-HDEASa	7,00
2-HEAAd	9,09
2-HDEAOx	4,96
2-HDEAMa	7,25
2-HDEASu	7,49
2-HDEAAd	8,07
2-HEACi	9,30

Conforme a Tabela 24, de um modo geral os LIPs que mediram pH básico foram os que apresentaram a degradação indesejada da galactose, corroborando com a descrição da Reação de Maillard, a qual ocorre preferencialmente em meio alcalino.

### 5.7. Análise de líquidos iônicos próticos como solventes para o processo enzimático

A Tabela 25 mostra, concomitantemente, os resultados das principais propriedades físico-químicas que influenciam a biocatálise. É válido ressaltar que para implementar novos meios de reação não aquosos, ou seja, não convencionais, em bioprocessos, há que se ter em mente a necessidade de realizar uma varredura prévia de propriedades que podem influenciar diretamente na efetividade da reação biocatalítica em questão. E este é o foco principal do presente estudo, isto é, identificar LIPs potenciais para o processo de síntese enzimática de um biossurfactante de interesse industrial, o oleato de galactose. Dentre os LIPs estudados, os

que apresentaram as melhores respostas para seguir adiante com a síntese enzimática do éster graxo de açúcar de interesse para este trabalho são: 2-Hidróxi Dietanolamina Formiato (2-HDEAF) e o 2-Hidróxi Dietanolamina Lactato (2-HDEAL), com destaque para o 2-HDEAF, o qual foi o meio de incubação que apresentou uma melhor solubilidade do carboidrato (20,44%) aliada a uma menor viscosidade (40,346 mPa.s), seguido pelo 2-HDEAL (solubilidade do carboidrato: 14,58%; viscosidade: 80,452 mPa.s), esses dados comparativos podem ser vistos na Tabela 25. De modo interessante, o valor de  $K_{ow}$  para estes dois LIPs são bem distintos, o que certamente terá interferência distinta sobre o poder catalítico da lipase, uma vez que o 2-HDEAF apresentou um menor valor de  $K_{ow}$  indica que este LIP tem a maior miscibilidade em água do que o 2-HDEAL, o qual apresentou maior  $K_{ow}$ . Essa interferência diferencial destes dois LIPs será avaliada posteriormente através de ensaios de estabilidade enzimática. Por outro lado, é interessante destacar que o 2-Hidróxi Dietanolamina Oxalato (2-HDEAOx), apesar de apresentar uma baixa viscosidade também apresentou uma baixa solubilidade do carboidrato, enquanto que o 2-Hidróxi Dietanolamina Maleato (2-HDEAMa) apresentou uma alta viscosidade e, surpreendentemente, uma alta solubilidade do carboidrato.

**Tabela 25.** Tabela comparativa dos resultados de coeficiente de partição dos LIPs a 40 °C, viscosidade a 60 °C e solubilidade da galactose em LIPs a 60 °C.

LIP	$K_{ow}$	Viscosidade (mPa.s)	Solubilidade (% massa)
2-HDEAF	0,53	40,346	20,44
2-HEAL	0,44	73,422	*NI
2-HDEAL	1,02	80,452	14,58
2-HDEASa	0,42	264,006	8,36
2-HEAAAd	0,83	178,422	*NI
2-HDEAOx	0,57	46,865	14,18
2-HDEAMa	0,62	381,950	18,84
2-HDEASu	0,55	99,198	*NI
2-HDEAAAd	0,33	320,244	*NI
2-HEACi	1,25	451,566	*NI

\*NI – Não Identificado em decorrência da reação de escurecimento não enzimático (Reação de Maillard).

## 6. Conclusões

Neste trabalho foram sintetizados e identificados instrumentalmente (por RMN e FTIR) com êxito um total de dez líquidos iônicos próticos (2-Hidróxi Dietanolamina Formiato (2-HDEAF), 2-Hidróxi Etanolamina Lactato (2-HEAL), 2-Hidróxi Dietanolamina Lactato (2-HDEAL), 2-Hidróxi Dietanolamina Salicilato (2-HDEASa), 2-Hidróxi Etanolamina Adipato (2-HEAAd), 2-Hidróxi Dietanolamina Oxalato (2-HDEAOx), 2-Hidróxi Dietanolamina Maleato (2-HDEAMa), 2-Hidróxi Dietanolamina Succinato (2-HDEASu), 2-Hidróxi Dietanolamina Adipato (2-HDEAAd) e o 2-Hidróxi Etanolamina Citrato (2-HEACi)). Não há registro bibliográfico prévio na literatura científica da maioria desses compostos, nem caracterização ou uso aplicado conhecido. A interpretação espectral através das técnicas espectrométricas de RMN e FTIR mostrou os sinais (ppm) e as bandas de absorção ( $\text{cm}^{-1}$ ) característicos das estruturas próprias dos LIPs sintetizados neste trabalho.

A massa específica e a velocidade de transmissão do som desses dez LIPs em função de temperatura foram medidas e os LIPs que possuem alto peso molecular e natureza polieletrólítica (aqueles cuja síntese é feita com ânions oxalato, succinato, maleato, adipato e citrato) apresentaram os maiores resultados para as propriedades estudadas. Os valores medidos de massa específica e velocidade de propagação do som expressam a natureza de alta interação entre os íons, apresentando valores elevados para ambas propriedades. A massa específica e a velocidade de propagação do som também apontaram uma tendência decrescente com o aumento da temperatura, em virtude de uma maior cinética iônica.

O modelo utilizado para estimação de ponto crítico por Valderrama & Robles (2007) é aplicado para LIAs, nesse sentido o uso do mesmo para os LIPs nesse trabalho resultou num entendimento qualitativo. Foram também avaliados os modelos de equação de estado de Rackett, Rackett Modificado por Spencer e Danner (Rackett, 1970; Spencer & Danner, 1972), a equação pelo Índice de Conectividade Mássica (ICM) (Valderrama & Rojas, 2010) e a equação de Nasrifar-Moshfeghian (Mchaweh *et al.*, 2004) para estimação da massa específica dos LIPs. Usou-se o modelo da Teoria do Fator de Colisão (TFC) (Gonzalez *et al.*, 2001) para estimar a velocidade de propagação do som, a qual é dependente dos fatores de colisão entre as moléculas ou íons. Embora esses modelos tenham sido desenhados para moléculas covalentes, em termos gerais, os resultados apresentam uma concordância qualitativa.



Baseado nos resultados dos estudos de coeficiente de partição, viscosidade e solubilidade do carboidrato nos LIPs nesse trabalho, os LIPs que podem ser os mais promissores para prosseguir com a síntese do éster graxo de açúcar são: o 2-Hidróxi Dietanolamina Formiato (2-HDEAF), o 2-Hidróxi Dietanolamina Lactato (2-HDEAL) estes apresentaram uma maior solubilização da galactose, o que trará incrementos em termos de conversão no bioproduto de interesse, assim como o 2-Hidróxi Dietanolamina Oxalato (2-HDEAOx) uma vez que o mesmo, além de ter apresentado uma boa solubilidade do carboidrato, possui também uma baixa viscosidade, o que certamente é positivo em termos de processo, por não trazer problemas de limitações de transferência de massa. Porém, também foi observado que os outros dois LIPs (2-HDEASa, 2-HDEAMa), embora com valores mais altos de viscosidade, também podem ser candidatos em potencial a essa síntese de oleato de galactose, pois, o açúcar em questão apresentou alta solubilidade no 2-Hidróxi Dietanolamina Maleato (2-HDEAMa), por exemplo.

## 7. Perspectivas para trabalhos futuros

Este trabalho se apresenta como um importante avanço dentre as pesquisas que visam à redução do impacto ambiental causado pelos processos que fazem uso de solventes industriais altamente tóxicos e de custo elevado. Além disso, estudos reportados na literatura corrente com lipases mostraram que esta classe de enzimas exibiu maior estabilidade térmica em LIs do que em solventes orgânicos tradicionais, onde LIs aparentaram exercer uma espécie de cobertura protetora para a enzima, o que resultou em biocatálise nas reações de esterificação de modo mais eficiente do que em meios orgânicos.

O uso dos LIPs para reações enzimáticas é uma inovação, pois não há na literatura qualquer estudo nesse tema com sua utilização. Espera-se com a finalização deste trabalho avançar nas pesquisas de produção de ésteres graxos de açúcares, biossurfactantes de grande aplicação tecnológica, via rota enzimática, pois, a proposta tema desta dissertação se diferencia de outras por ser inovadora e com foco em uso de novas substâncias de perfil sustentável e natureza biodegradável.

Como sugestão para trabalhos futuros está a continuidade do presente estudo através da realização dos testes de estabilidade enzimática e síntese do oleato de galactose na presença dos LIPs selecionados nesta dissertação de Mestrado aliado a produção de novos LIPs que possam apresentar uma estrutura diferenciada para evitar a reação de escurecimento não enzimático (Reação de Maillard) observada aqui e até mesmo a mistura desses LIPs já sintetizados com pHs diferentes (um mais ácido e outro mais básico) para que se atinja um potencial hidrogeniônico favorável a aplicação proposta. Além disso, de acordo com o coeficiente de partição dos LIPs, seu caráter polar (compreendidos entre 0,5 a 1,0 aproximadamente) possibilitará uma diferente interação com a camada de água presente na enzima, pois apresentam miscibilidade em água em diferentes graus, o que mantém a estrutura catalítica da enzima. Logo, a partir dos dados obtidos aliados aos testes de estabilidade da enzima, temos condições de avaliar a influência do coeficiente de partição na biocatálise.

## Referências bibliográficas

ABDULMALEK, E.; SAUPI, H. S. M.; TEJO, B. A.; BASRI, M.; SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; RAHMAN, M. B. A. "Improved enzymatic galactose oleate ester synthesis in ionic liquids". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 76, pp. 37-43, 2012.

ACHINIVU, E. C.; HOWARD, R. M.; LI, G. Q.; GRACZ, H.; HENDERSON, W. A. "Lignin extraction from biomass with protic ionic liquids". *Green Chemistry*, v. 16, pp. 1114-1119, 2014.

ADNANI, A.; BASRI, M.; CHAIBAKHSH, N.; SALLEH, A.; RAHMAN, M. "Lipase-catalyzed synthesis of a sugar alcohol-based nonionic surfactant". *Asian Journal of Chemistry*, v. 23, pp. 388-392, 2011.

ALVAREZ, V. H.; IGLESIAS, M.; DOSIL, N.; GONZALEZ-CABALEIRO, R.; MARTIN-PASTOR, M.; MATTEDI, S.; NAVAZA, J. M. "Brønsted ionic liquids for sustainable processes: Synthesis and physical properties". *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 55, pp. 625-632, 2010.

ANOUTI, M.; CAILLON-CARAVANIER, M.; DRIDI, Y.; GALIANO, H.; LEMORDANT, D. "Synthesis and characterization of new pyrrolidinium based protic ionic liquids. Good and superionic liquids". *Journal of Physical Chemistry B*, v. 112, pp. 13335-13343, 2008.

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

BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. "Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods". *Journal of Chromatography A*, v. 1037, pp. 3-14, 2004.

BONDI, A., "Van Der Waals volumes and radii". *Journal of Physical Chemistry*, v. 68, pp. 441-451, 1964.

CAMARGO, D.; ANDRADE, R. S.; FERREIRA, G. A.; MAZZER, H.; CARDOZO-FILHO, L.; IGLESIAS, M. "Investigation of the rheological properties of protic ionic liquids". *Journal of Physical Organic Chemistry*, DOI: 10.1002/poc.3553, 2016.

CARNEIRO, A. P.; RODRIGUEZ, O.; MACEDO, E. A. "Solubility of monosaccharides in ionic liquids – Experimental data and modeling". *Fluid Phase Equilibria*, v. 314, pp. 22-28, 2012.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. "Fine chemicals by biotransformation using lipases". *Química Nova*, v.18, pp. 544-554, 1995.

CAUGLIA, F.; CANEPA, P. "The enzymatic synthesis of glucosylmyristate as a reaction model for general considerations on 'sugar esters' production". *Bioresource Technology*, v. 99, pp. 4065-72, 2008.

CHEN, J. Y.; CHEN, L. X.; LU, Y. Q.; XU, Y. J. "Physicochemical properties of aqueous solution of 1-methylimidazolium acetate ionic liquid at several temperatures". *Journal of Molecular Liquids*, v. 197, pp. 374-380, 2014

CHEN, X. W.; LIU, J. W.; WANG, J. H. "Ionic liquids in the assay of proteins". *Analytical Methods*, v. 2, pp. 1222-1226, 2010.

CHHOTARAY, P. K.; GARDAS, R. L. "Thermophysical properties of ammonium and hydroxylammonium protic ionic liquids". *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 72, pp. 117-124, 2014.

COTA, I.; GONZALEZ-OLMOS, R.; IGLESIAS, M.; MEDINA, F. "New short aliphatic chain ionic liquids: synthesis, physical properties, and catalytic activity in aldol condensations". *Journal of Physical Chemistry B*, v. 111, pp. 12468-12477, 2007.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.D.G.; SOLDI, V. "Synthetic applications of immobilized lipases in polymers". *Química Nova*, v. 27, pp. 623-630, 2004.

DELGADO-ANDRADE, C.; RUFIAN-HENARES J. A.; MORALES, F. J. *Colour and fluorescence measurement as unspecific markers for the Maillard reaction*. Assessing the generation and bioactivity of neo-formed compounds in thermally treated foods. Granada: Atrio; 2009.

FABER, K. *Em Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*; 3 ed. Berlin, Springer Produktions-Gesellschaft, 1997.

FERREIRA, M. M. C. "Polycyclic aromatic hydrocarbons: A QSPR study". *Chemosphere*, v. 44, pp. 125-146, 2001.

FINDRIK, Z.; MEGYERI, G.; GUBICZA, L.; BELAFI-BAKO, K.; NEMESTOTHY, N.; SUDAR, M. "Lipase catalyzed synthesis of glucose palmitate in ionic liquid". *Journal of Cleaner Production*, v. 112, pp. 1106-1111, 2016.

FINOT, P. A. "Historical perspective of the Maillard reaction in food science". *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1043, pp. 1-8, 2005.

FISCHER, F.; HAPPE, M.; EMERY, J.; FORNAGE, A.; SCHÜTZ, R. "Enzymatic synthesis of 6- and 6'-O-linoleyl- $\alpha$ -D-maltose: From solvent-free to binary ionic liquid reaction media". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 90, pp. 98-106, 2013.

FREIRE, M. G.; NEVES, C. M. S. S.; MARRUCHO, I. M.; LOPES, J. N. C.; REBELO, L. P. N.; COUTINHO, J. A. P. "High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids". *Green Chemistry*, v. 12, pp. 1715-1718, 2010.

FRIEDMAN, M. "Food browning and its prevention: an overview". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, pp. 631-53, 1996.

GACINO, F. M.; REGUEIRA, T.; BOLOTOV, A. V.; SHARIPOV, A.; LUGO, L.; COMUNAS, M. J. P.; FERNANDEZ, J. "Volumetric behaviour of six ionic liquids from T = (278 to 398) K and up to 120 MPa". *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 93, pp. 24-33, 2016.

GALONDE, N.; NOTT, K.; DEBUIGNE, A.; DELEU, M.; JERÔME, C.; PAQUOT, M.; WATHELET, J. "Use of ionic liquids for biocatalytic synthesis of sugar derivatives". *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 87, pp. 451-471, 2012.

GANDHI, N. N. "Applications of lipase". *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 74, pp. 621-634, 1997.

GANSKE, F.; BORNSCHEUER, U. T. "Lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in ionic liquids". *Organic Letters*, v. 7, pp. 3097-3098, 2005.

GONZALEZ, C.; IGLESIAS, M.; LANZ, J.; MARINO, G.; ORGE, B.; RESA, J. M. "Temperature influence on refractive indices and isentropic compressibilities of alcohol (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>) + olive oil mixtures". *Journal of Food Engineering*, v. 50, pp. 29-40, 2001.

GREAVES, T. L.; DRUMMOND, C. J. "Protic ionic liquids: evolving structure-property relationships and expanding applications". *Chemical Reviews*, v. 115, pp. 11379-11448, 2015.

GREAVES, T. L.; DRUMMOND, C. J. "Protic ionic liquids: properties and applications". *Chemical Reviews*, v. 108, pp. 206-237, 2008.

GREAVES, T. L.; WEERAWARDENA, A.; FONG, C.; KRODKIEWSKA, I.; DRUMMOND, C. J. "Protic ionic liquids: Solvents with tunable phase behavior and physicochemical properties". *Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, pp. 22479-22487, 2006.

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M.; HEIDELBERG, T.; CHISTI, Y. "Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters". *Process Biochemistry*, v. 46, pp. 2079-2090, 2011.

HA, S. H.; HIEP, N. M.; KOO, Y. "Enhanced production of fructose palmitate by lipase-catalyzed esterification in ionic liquids". *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 15, pp. 126-130, 2010.

HALLING, P. J. "Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis". *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, pp. 178-206, 1994.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. "Industrial applications of microbial lipases". *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, pp. 235-251, 2006.

HERMENS, J. L. M.; DE BRULIN, J. H. M.; BROOKE, D. N. "The octanol-water partition coefficient: strengths and limitations". *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 32, pp. 732-733, 2013.

HODGE, J. E. "Chemistry of browning reactions in models systems". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 1, pp. 928-943, 1953.

JONSDOTTIR, S. O.; COOKE, S. A.; MACEDO, E. A. "Modeling and measurements of solid-liquid and vapor-liquid equilibria of polyols and carbohydrates in aqueous solution". *Carbohydrate Research*, v. 337, pp. 1563-1571, 2002.

KAZLAUSKAS, R. J., BORNSCHEUER, U. T. A multi-volume comprehensive treatise biotechnology. In: Rehm H. J.; Pihler G.; Stadler A.; Kelly P. J. W. (eds) Wiley, VCH Verlag, NewYork, 1998.

KOBAYASHI, T. "Lipase-catalyzed syntheses of sugar esters in non-aqueous media". *Biotechnology Letters*, v. 33, pp. 1911-1919, 2011.

KOSARIC, N. Biosurfactants production property application. *Surfactant Science*. New York, Marcel Dekker, 1993.

KURNIA, K. A., MUTALIB, M. I. A. "Densities and viscosities of binary mixture of the ionic liquid bis (2-hydroxyethyl) ammonium propionate with methanol, ethanol, and 1-propanol at T = (293.15, 303.15, 313.15, and 323.15) K and at P = 0.1 MPa". *Journal of chemical engineering data*, v. 56, pp. 79 – 83, 2011a.

KURNIA, K. A.; ARIWAHOEDI, B.; MUTALIB, M. I. A.; MURUGESAN, T. "Density and excess molar volume of the protic ionic liquid bis(2-hydroxyethyl)ammonium acetate with alcohols". *Journal of Solution Chemistry*, v. 40, pp. 470-480, 2011b.

KURNIA, K. A.; MUTALIB, M. I. A.; MURUGESAN, T.; ARIWAHOEDI, B. "Physicochemical properties of binary mixtures of the protic ionic liquid bis (2-hydroxyethyl) methylammonium formate with methanol, ethanol, and 1-propanol". *Journal of Solution Chemistry*, v. 40, pp. 818-831, 2011c.

KUSANO, T.; FUJII, K.; HASHIMOTO, K.; SHIBAYAMA, M. "Water-in-ionic liquid microemulsion formation in solvent mixture of aprotic and protic imidazolium-based ionic liquids". *Langmuir*, v. 30, pp. 11890-11896, 2014.

KWAK, E. J.; LIM, S. I. "The effect of sugar, amino acid, metal ion and NaCl on model Maillard reaction under pH control". *Amino Acids*, v. 27, pp. 85-90, 2004.

LEE, S. H.; DANG, D. T.; HA, S. H.; CHANG, W. J.; KOO, Y. M. "Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid sugar ester using extremely supersaturated sugar solution in ionic liquids". *Journal of Biotechnology*, v. 99, pp. 1-8, 2008.

LEHNINGER, A. L. "Princípios de Bioquímica" 2ª Edição. *Sarvier*, São Paulo, 1984.

LIN, X. S.; WEN, Q.; HUANG, Z. L.; HALLING, P. J.; YANG, Z. "Impacts of ionic liquids on enzymatic synthesis of glucose laurate and optimization with superior productivity by response surface methodology". *Process Biochemistry*, v. 50, pp. 1852–1858, 2015.

LOZANO, P.; DE DIEGO, T.; CARRIE, D.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. "Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide". *Chemical Communications*, v. 7, pp. 692-693, 2002.

MAILHOT, H.; PETERS, R. H. "Empirical relationships between the 1-octanol water partition-coefficient and 9 physicochemical properties". *Environmental Science & Technology*, v. 22, pp. 1479-1488, 1988.

MARTINS, S. I. F. S.; JONGEN, W. M. F.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. "A review of Maillard reaction in food and implications to kinetics modeling". *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, pp. 364-373, 2000.



MCHAWEH, A.; ALSAYGH, A.; NASRIFAR K.H.; MOSHFEGHIAN, M. "A simplified method for calculating saturated liquid densities". *Fluid Phase Equilibria*, v. 224, pp. 157-167, 2004.

MIRJAFARI, A.; PHAM, L. N.; MCCABE, J. R.; MOBARREZ, N.; SALTER, E. A.; WIERZBICKI, A.; WEST, K. N.; SYKORA, R. E.; DAVIS, J. H. "Building a bridge between aprotic and protic ionic liquids". *RSC Advances*, v. 3, pp. 337-340, 2013.

MOHAN, M.; GOUD, V. V.; BANERJEE, T. "Solubility of glucose, xylose, fructose and galactose in ionic liquids: Experimental and theoretical studies using a continuum salvation model". *Fluid Phase Equilibria*, v. 395, pp. 33-43, 2015.

MONIRUZZAMAN, M.; NAKASHIMA, K.; KAMIYA, N.; GOTO, M. "Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids". *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, pp. 295-314, 2010.

MONTAÑÉS, F.; OLANO, A.; IBÁÑEZ, E.; FORNARI, T. "Modeling solubilities of sugars in alcohols based on original experimental data". *AIChE Journal*, v. 53, pp. 2411-2418, 2007.

MOOSAVI, M.; DANESHVAR, A. "Investigation of the rheological properties of two imidazolium-based ionic liquids". *Journal of Molecular Liquids*, v. 190, pp. 59-67, 2014.

MORIKAWA, G.; SUZUKA, C.; SHOJI, A.; SHIBUSAWA, Y.; YANAGIDA, A.; "High-throughput determination of octanol/water partition coefficients using a shake-flask method and novel two-phase solvent system". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 117, pp. 338-344, 2016.

MUKHERJEE, I.; MANNA, K.; DINDA, G.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. "Shear- and temperature-dependent viscosity behavior of two phosphonium-based ionic liquids and surfactant triton X-100 and their biocidal activities". *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 57, pp. 1376-1386, 2012.

MURUGESAN, S.; LINHARDT R. J. "Ionic liquids in carbohydrate chemistry – current trends and future directions". *Current Organic Synthesis*, v. 2, pp. 437-451, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. "Biossurfactantes: propriedades e aplicações". *Química Nova*, v. 25, pp. 772-776, 2002.

NUNES, C. S.; BAPTISTA, A. O. "Implicações da reação de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos". *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 96, pp. 53-59, 2001.

NURSTEN, H. *The Maillard Reaction: Chemistry, biochemistry and Implications*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2005.

OLIVIER-BOURBIGOU, H.; MAGNA, L.; MORVAN, D. "Ionic liquids and catalysis: recent progress from knowledge to applications". *Applied Catalysis A-General*, v. 373, pp. 1-56, 2010.

PAIVA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S. "Introduction to Spectroscopy", 3<sup>a</sup> edition. *Brooks Cole*, 2000.

PARK, S.; KAZLAUSKAS, R. J. "Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology". *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, pp. 432–437, 2003.

PEREIRA, S. C.; BUSSAMARA, R.; MARIN, G.; GIORDANO, R. L. C.; DUPONT, J.; GIORDANO, R. C. "Enzymatic synthesis of amoxicillin by penicillin G acylase in the presence of ionic liquids". *Green Chemistry*, v. 14, pp. 3146 - 3156, 2012.

PERIC, B.; MARTI, E.; SIERRA, J.; CRUANAS, R.; IGLESIAS, M.; GARAU, M. A. "Terrestrial ecotoxicity of short aliphatic protic ionic liquids". *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 30, pp. 2802-2809, 2011.

PERIC, B.; SIERRA, J.; MARTI, E.; CRUANAS, R.; GARAU, M. A. "A comparative study of the terrestrial ecotoxicity of selected protic and aprotic ionic liquids". *Chemosphere*, v. 108, pp. 418-425, 2014.

PERIC, B.; SIERRA, J.; MARTI, E.; CRUANAS, R.; GARAU, M. A. "Quantitative structure-activity relationship (QSAR) prediction of (eco)toxicity of short aliphatic protic ionic liquids". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 115, pp. 257-262, 2015.

PERIC, B.; SIERRA, J.; MARTI, E.; CRUANAS, R.; GARAU, M. A. ARNING, J.; BOTTIN-WEBER, U.; STOLTE, S. "(Eco)toxicity and biodegradability of selected protic and aprotic ionic liquids". *Journal of Hazardous Materials*, v. 261, pp. 99-105, 2013.

PLECHKOVA, N. V.; SEDDON, K. R. "Applications of ionic liquids in the chemical industry". *Chemical Society Reviews*, v. 37, pp. 123-150, 2008.

POOLE, S. K.; POOLE, C. F. "Separation methods for estimating octanol–water partition coefficients". *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science*, v. 797, pp. 3-19, 2003.

RACKETT, H. G. "Equation of state for saturated liquids". *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 15, pp. 514-517, 1970.

RANDIC, M. Characterization of molecular branching. *Journal of the American Chemical Society*, v. 97, pp. 6609-6615, 1975.

RUELA, S.; SUTILI, F.; LEAL, I.; CARVALHO, N.; MIRANDA, L.; DE SOUZA, R. "Lipase-catalyzed synthesis of secondary glucose esters under continuous flow conditions". *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 115, pp. 464–467, 2013.

RUFÍAN-RENARES, J. A.; DELGADO-ANDRADE, C., MORALES, F. J. *Non-enzymatic browning: the case of the Maillard reaction*. In: Delgado-Andrade C, RufiánRenares JA. Assessing the generation and bioactivity of neo-formed compounds in thermally treated foods. Granada: Atrio; 2009.

RYBINSKA, A.; SOSNOWSKA, A.; GRZONKOWSKA, M.; BARYCKI, M.; PUZYN, T. "Filling environmental data gaps with QSPR for ionic liquids: Modeling n-octanol/water coefficient". *Journal of Hazardous Materials*, v. 303, pp. 137–144, 2016.

SABEDER, S.; HABULIN, M.; KNEZ, Z. "Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters". *Journal of Food Engineering*, v. 77, pp. 880-886, 2006.



SAHA N.; DAS, B. "Apparent molar volumes of some symmetrical tetraalkylammonium bromides in acetonitrile at (298.15, 308.15, and 318.15 K)". *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 42, pp. 227-229, 1997.

SANGSTER, J. Octanol–water partition coefficients: Fundamentals and physical chemistry, New York, Wiley, 1996.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. "Purification strategies for microbial lipases". *Journal Microbiology Methodology*, v. 52, pp. 1-18, 2003.

SCHAAFFS, W. "Problem of a theoretical calculation of the velocity of sound for binary liquid mixtures". *Acustica*, v. 33, pp. 272-276, 1975.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. "Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde". *Revista de Nutricao-Brazilian Journal of Nutrition*, v. 24, pp. 895-904, 2011.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., "Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos", 6ª. ed. *LTC Livros Técnicos e Científicos*, Rio de Janeiro, 2000.

SINTRA, T. E.; CRUZ, R.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO, J. A. P. "Phase diagrams of ionic liquids-based aqueous biphasic systems as a platform for extraction processes". *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 77, pp. 206-213, 2014.

SMITH, J. A.; WEBBER, G. B.; WARR, G. G.; ATKIN, R. "Rheology of protic ionic liquids and their mixtures". *Journal of Physical Chemistry B*, v. 117, pp. 13930-13935, 2013.

SPENCER, C. F.; DANNER, R. P. "Improved equation for prediction of saturated liquid density". *Journal of Chemical Engineering Data*, v. 17, pp. 236-241, 1972.

TAIB, M. M.; AKBAR, M. M.; MURUGESAN, T. "Densities, refractive index and excess properties of bis (2-hydroxyethyl) ammonium acetate ([bheaa]) + monoethanolamine + water system at temperatures from 303.15 to 353.15 K". *Journal of Molecular Liquids*, v. 181, pp. 121-126, 2013.

VALDERRAMA, J. O.; ROBLES, P. A. "Critical properties, normal boiling temperatures, and acentric factors of fifty ionic liquids". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 46, pp. 1338-1344, 2007.

VALDERRAMA, J. O.; ROJAS, R. E. "Mass connectivity index, a new molecular parameter for the estimation of ionic liquid properties". *Fluid Phase Equilibria*, v. 297, pp. 107-112, 2010.

VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. "Biocatalysis in ionic liquids". *Chemical Reviews*, v. 107, pp. 2757-2785, 2007.

VAN RANTWIJK, F.; LAU, R. M.; SHELDON, R. A. "Biocatalytic transformations in ionic liquids". *Trends in Biotechnology*, v. 21, pp. 131-138, 2003.

VANDYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. "Applications of microbial surfactants". *Biotechnology Advances*, v. 9, pp. 241-252, 1991.

VENTURA, S. P. M.; SANTOS, L. D. F.; SARAIVA, J. A.; COUTINHO, J. A. P. "Concentration effect of hydrophilic ionic liquids on the enzymatic activity of *Candida antarctica* lipase B". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 28, pp. 2303-2310, 2012.

VITISANT, T.; CHULALAKSANANUKUL, W.; PIUMTHONGKUM, R.; SINBUATHONG, N.; MEKTHONG, P.; CHULALAKSANANUKUL, S. "Synthesis of sugar ester by local yeast lipase in solvent free system". *International Journal of Science and Technology*, v. 2, pp. 773-777, 2012.

WALKER, A. J. "Protic ionic liquids and their potential industrial applications". *Chimica Oggi-Chemistry Today*, v. 25, pp. 17-19, 2007.

WALSH, M. K.; BOMBYK, R. A.; WAGH, A.; BINGHAM, A.; BERREAU, L. M. "Synthesis of lactose monolaurate as influenced by various lipases and solvents". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 60, pp. 171-177, 2009.

WATARI, H.; TANAKA, M.; SUZUKI, N. "Determination of partition coefficients of halobenzenes in heptane/water and 1-octanol/water systems and comparison with the scaled particle calculation". *Analytical Chemistry*, v. 54, pp. 702-705, 1982.

WILKES, J. S. "Properties of ionic liquid solvents for catalysis". *Journal of Molecular Catalysis A-Chemical*, v. 214, pp. 11-17, 2004.

YANG, Z.; HUANG, Z. "Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in ionic liquids". *Catalysis Science & Technology*, v. 2, pp. 1767-1775, 2012.

YU, G. R.; ZHAO, D. C.; WEN, L.; YANG, S. D.; CHEN, X. C. "Viscosity of ionic liquids: Database, observation, and quantitative structure-property relationship analysis". *AIChE Journal*, v. 58, pp. 2885-2899, 2012.

ZAKRZEWSKA, M. E.; BOGEL-ŁUKASIK, E.; BOGEL-ŁUKASIK, R. "Solubility of carbohydrates in ionic liquids". *Energy Fuels*, v. 24, pp. 737-745, 2010.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. "Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents". *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, pp. 3194-3201, 1988.

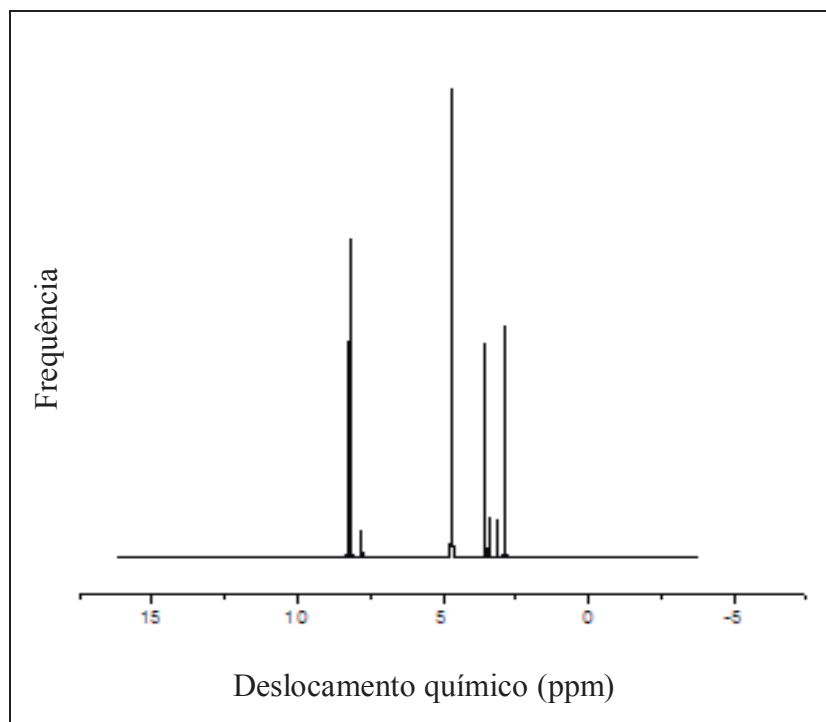
ZHANG, Q.; ZHANG, S.; DENG, Y. "Recent advances in ionic liquid catalysis". *Green Chemistry*, v. 13, pp. 2619-2637, 2011.

ZHAO, H. "Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids – a review". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, pp. 891-907, 2010.

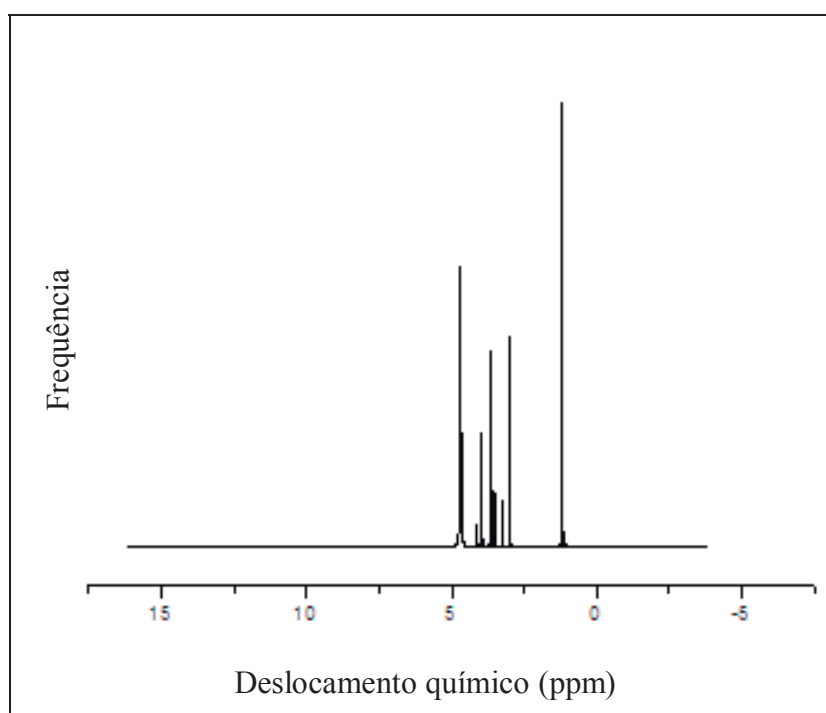
ZHU, S.; CHEN, R.; WU, Y.; CHEN, Q.; ZHANG, X.; YU, Z. "A mini-review on greenness of ionic liquids". *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 23, pp. 207-211, 2009.

## APÊNDICES

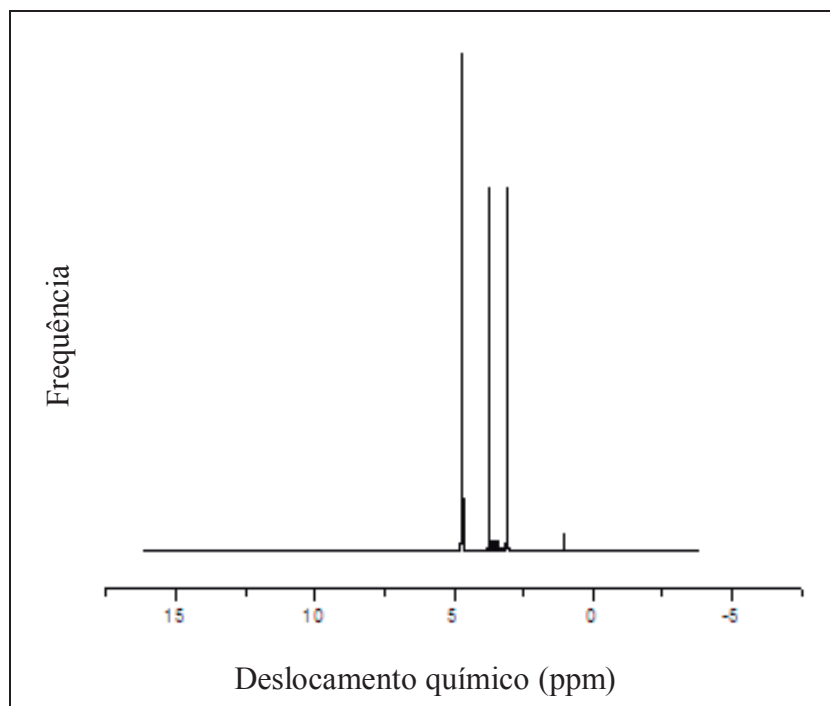
### Apêndice I: Espectros de $^1\text{H}$ -RMN



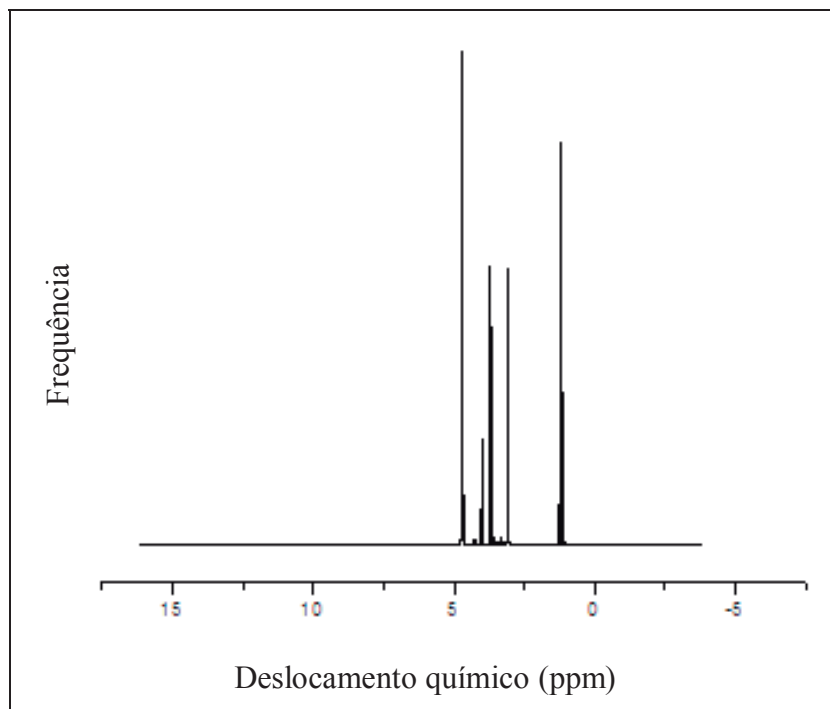
2-Hidróxi Dietanolamina Formiato



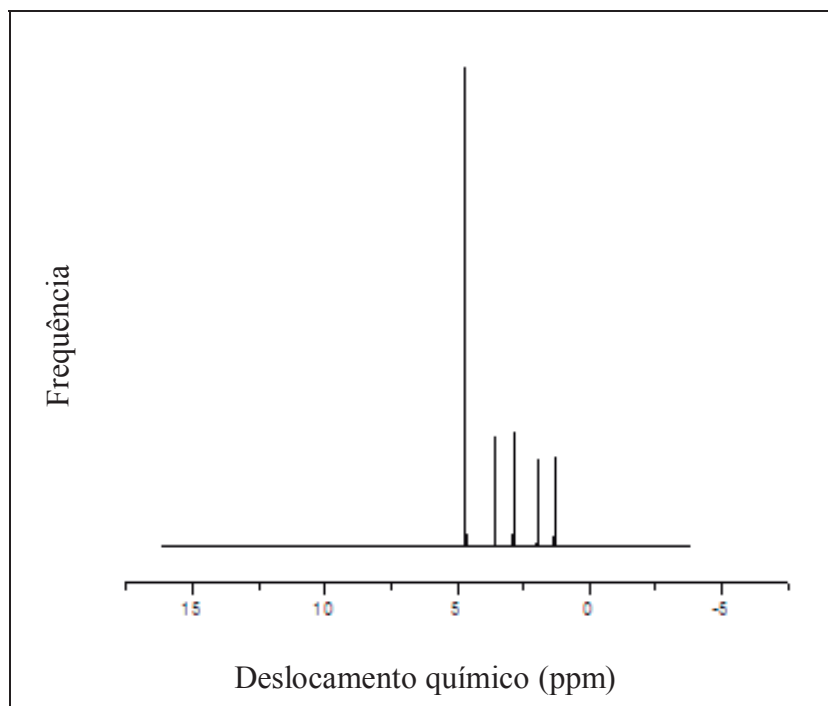
2-Hidróxi Etanolamina Lactato



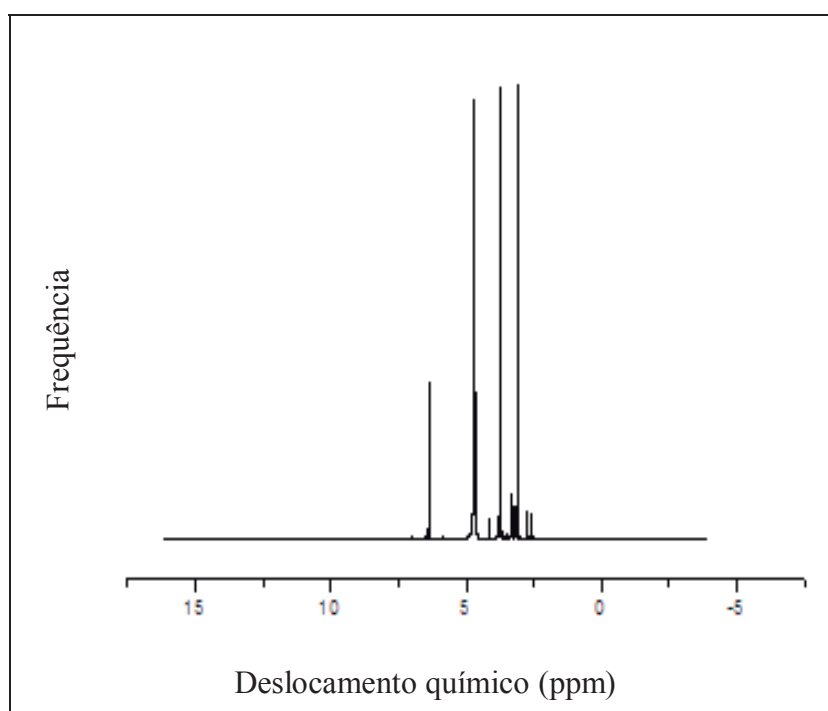
2-Hidróxi Dietanolamina Oxalato



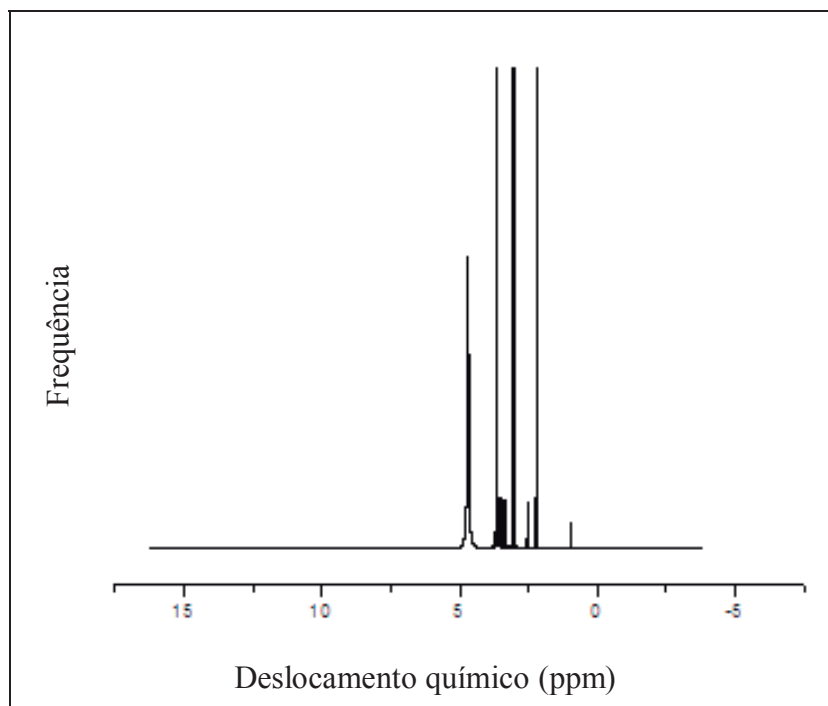
2-Hidróxi Dietanolamina Lactato



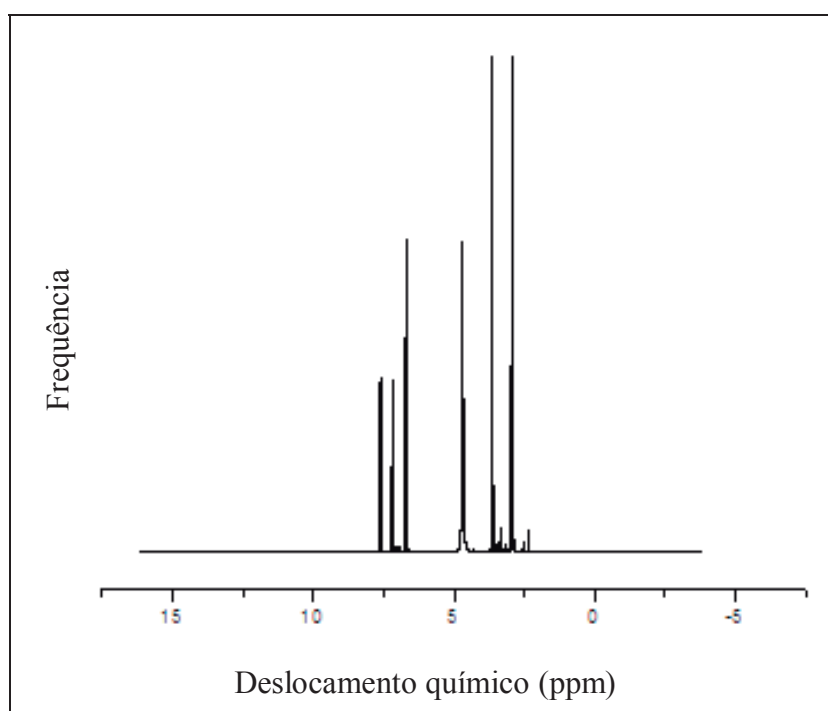
2-Hidróxi Etanolamina Adipato



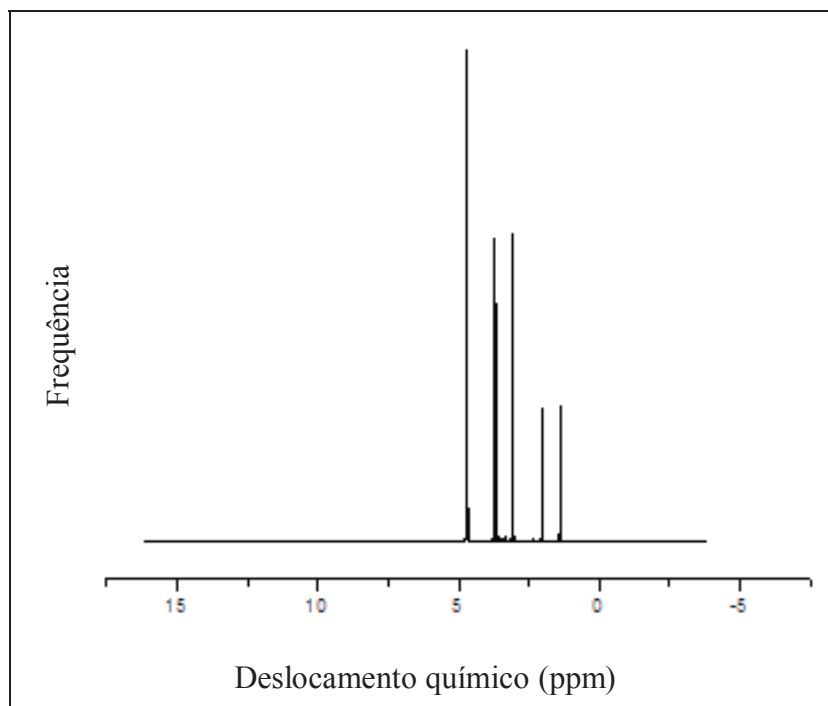
2-Hidróxi Dietanolamina Maleato



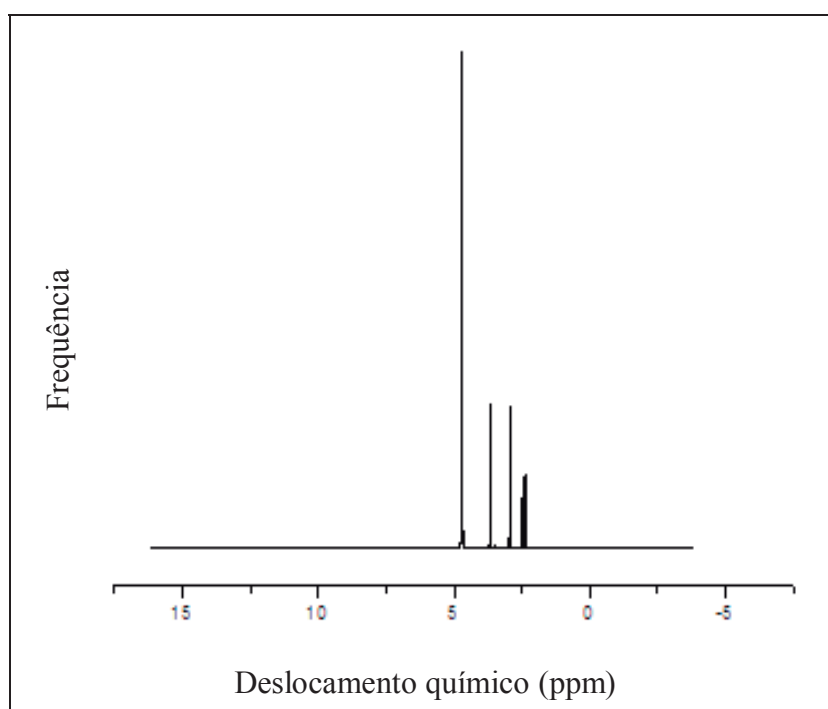
2-Hidróxi Dietanolamina Succinato



2-Hidróxi Dietanolamina Salicilato

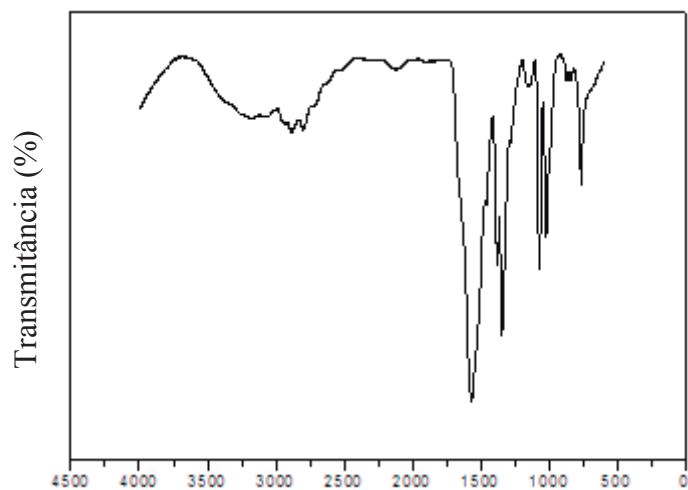


2-Hidróxi Dietanolamina Adipato

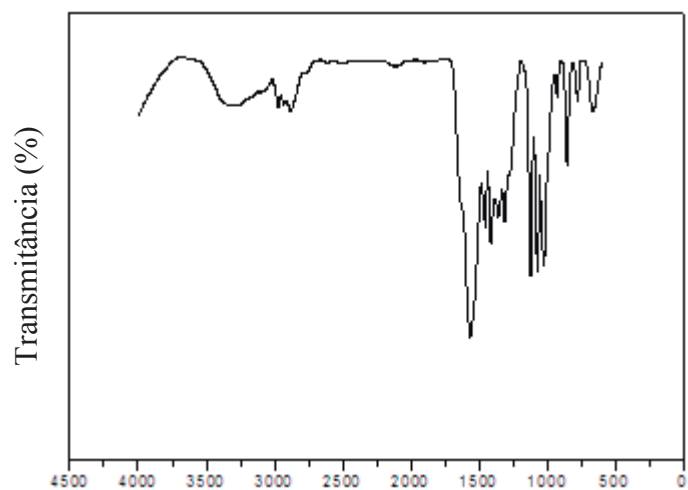


2-Hidróxi Etanolamina Citrato

## Apêndice II: Espectros de FTIR

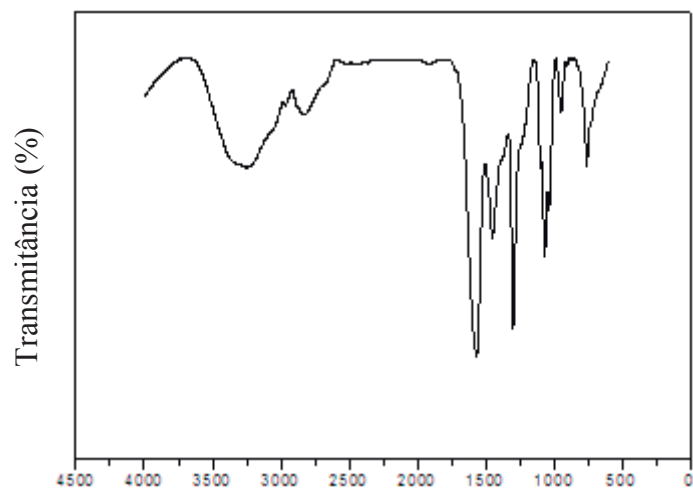
Número de onda (cm<sup>-1</sup>)

2-Hidróxi Dietanolamina Formiato

Número de onda (cm<sup>-1</sup>)

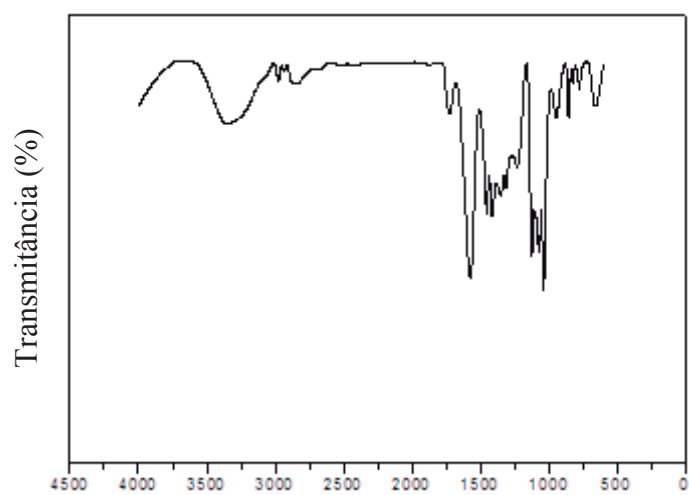
2-Hidróxi Etanolamina Lactato





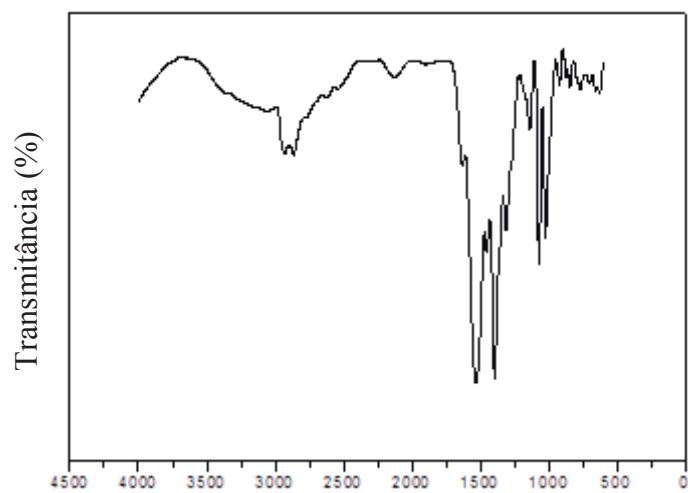
Número de onda (cm<sup>-1</sup>)

2-Hidróxi Dietanolamina Oxalato



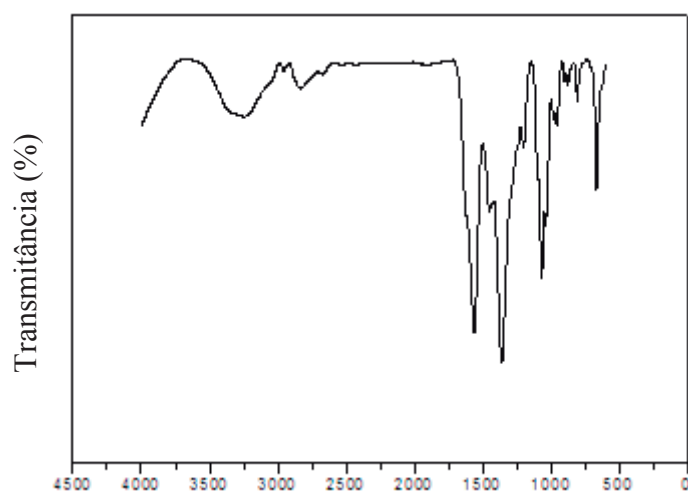
Número de onda (cm<sup>-1</sup>)

2-Hidróxi Dietanolamina Lactato



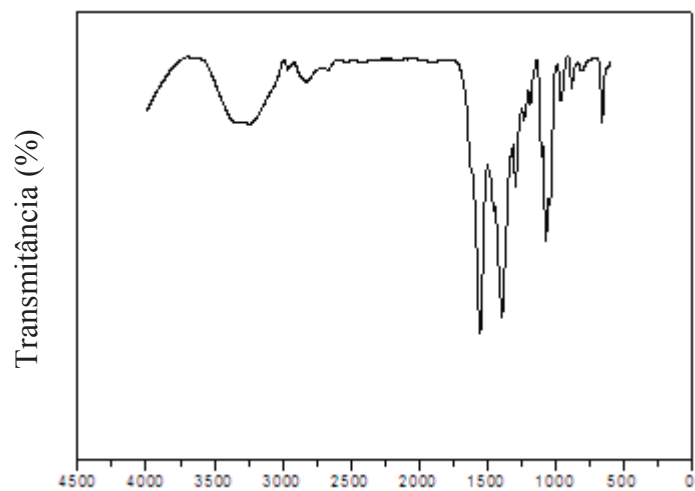
Número de onda (cm<sup>-1</sup>)

2-Hidróxi Etanolamina Adipato



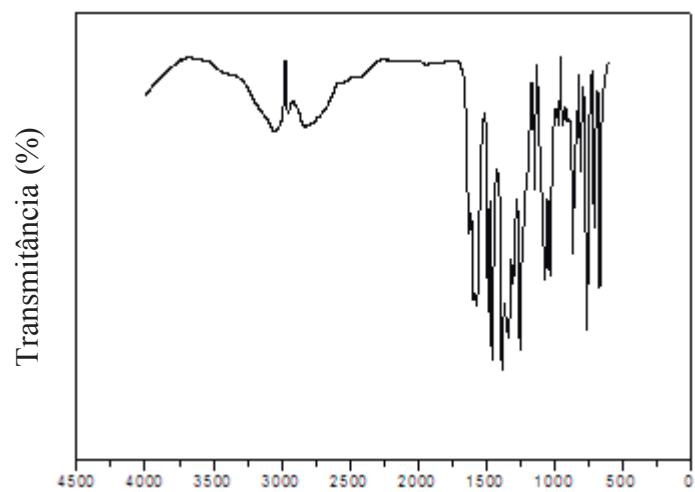
Número de onda (cm<sup>-1</sup>)

2-Hidróxi Dietanolamina Maleato



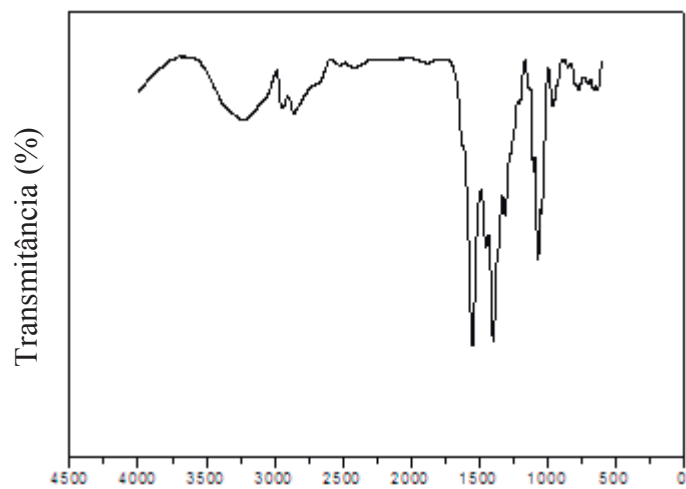
Número de onda (cm<sup>-1</sup>)

2-Hidróxi Dietanolamina Succinato



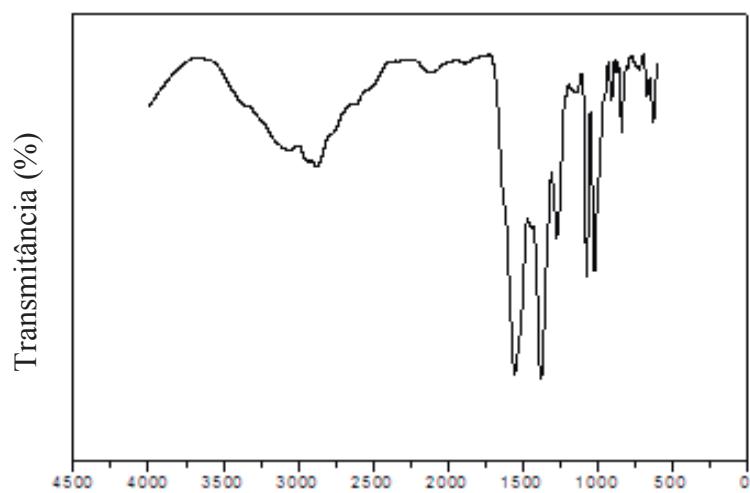
Número de onda (cm<sup>-1</sup>)

2-Hidróxi Dietanolamina Salicilato



Número de onda (cm<sup>-1</sup>)

2-Hidróxi Dietanolamina Adipato



Número de onda (cm<sup>-1</sup>)

2-Hidróxi Etanolamina Citrato

## Apêndice III: Tabela de dados experimentais das propriedades termodinâmicas

Massas específicas ( $\rho$ ) e velocidades do som ( $u$ ) dos líquidos iônicos próticos na faixa de temperatura 20-50 °C.

T (K)	2-HDEAF		2-HDEAL		2-HDEAOx		2-HEAL	
	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	$u$ (ms <sup>-1</sup> )	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	$u$ (ms <sup>-1</sup> )	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	$u$ (ms <sup>-1</sup> )	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	$u$ (ms <sup>-1</sup> )
20,00	1,197254	1811,20	1,216421	1893,41	1,263739	2052,41	1,216421	1893,41
20,50	1,196937	1809,92	1,216186	1892,40	1,263538	2051,70	1,216186	1892,40
21,00	1,196617	1808,61	1,215862	1890,17	1,263296	2050,84	1,215862	1890,17
21,50	1,196296	1807,32	1,215589	1888,19	1,263021	2049,93	1,215589	1888,19
22,00	1,195977	1806,02	1,215294	1886,43	1,262782	2049,12	1,215294	1886,43
22,50	1,195653	1804,76	1,215023	1884,78	1,262551	2048,38	1,215023	1884,78
23,00	1,195335	1803,50	1,214732	1883,13	1,262246	2047,42	1,214732	1883,13
23,50	1,195012	1802,25	1,214442	1881,47	1,262013	2046,76	1,214442	1881,47
24,00	1,194689	1801,02	1,214167	1879,97	1,261747	2045,91	1,214167	1879,97
24,50	1,194365	1799,77	1,213891	1878,51	1,261515	2045,15	1,213891	1878,51
25,00	1,194041	1798,54	1,213607	1877,02	1,261259	2044,39	1,213607	1877,02
25,50	1,193724	1797,31	1,213319	1875,50	1,261000	2043,64	1,213319	1875,50
26,00	1,193403	1796,07	1,213039	1874,17	1,260749	2042,90	1,213039	1874,17
26,50	1,193072	1794,84	1,212761	1872,80	1,260512	2042,20	1,212761	1872,80
27,00	1,192754	1793,62	1,212499	1871,53	1,260251	2041,48	1,212499	1871,53
27,50	1,192428	1792,39	1,212222	1870,13	1,260008	2040,79	1,212222	1870,13
28,00	1,192106	1791,16	1,211958	1868,84	1,259780	2040,11	1,211958	1868,84
28,50	1,191779	1789,94	1,211671	1867,45	1,259555	2039,46	1,211671	1867,45
29,00	1,191456	1788,72	1,211419	1866,26	1,259295	2038,74	1,211419	1866,26
29,50	1,191134	1787,50	1,211131	1864,95	1,259087	2038,14	1,211131	1864,95
30,00	1,190807	1786,27	1,210877	1863,76	1,258819	2037,44	1,210877	1863,76
30,50	1,190481	1785,05	1,210615	1862,53	1,258580	2036,78	1,210615	1862,53
31,00	1,190159	1783,83	1,210332	1861,32	1,258351	2036,20	1,210332	1861,32
31,50	1,189827	1782,61	1,210085	1860,16	1,258123	2035,55	1,210085	1860,16
32,00	1,189506	1781,40	1,209830	1859,05	1,257893	2034,93	1,209830	1859,05
32,50	1,189178	1780,17	1,209549	1857,83	1,257672	2034,32	1,209549	1857,83
33,00	1,188850	1778,95	1,209316	1856,83	1,257476	2033,80	1,209316	1856,83
33,50	1,188527	1777,74	1,209037	1855,66	1,257239	2033,15	1,209037	1855,66
34,00	1,188200	1776,53	1,208761	1854,47	1,257000	2032,53	1,208761	1854,47
34,50	1,187875	1775,30	1,208505	1853,37	1,256762	2031,91	1,208505	1853,37
35,00	1,187545	1774,09	1,208263	1852,31	1,256555	2031,38	1,208263	1852,31
35,50	1,187216	1772,87	1,208046	1851,40	1,256361	2030,86	1,208046	1851,40
36,00	1,186891	1771,65	1,207806	1850,29	1,256107	2030,20	1,207806	1850,29
36,50	1,186561	1770,43	1,207511	1848,91	1,255872	2029,57	1,207511	1848,91
37,00	1,186236	1769,20	1,207351	1848,34	1,255655	2029,00	1,207351	1848,34
37,50	1,185907	1767,99	1,207045	1846,97	1,255434	2028,50	1,207045	1846,97
38,00	1,185575	1766,76	1,206778	1845,83	1,255249	2027,93	1,206778	1845,83
38,50	1,185251	1765,54	1,206547	1844,68	1,255060	2027,45	1,206547	1844,68
39,00	1,184922	1764,32	1,206338	1843,87	1,254838	2026,90	1,206338	1843,87
39,50	1,184593	1763,09	1,206095	1842,74	1,254641	2026,41	1,206095	1842,74
40,00	1,184263	1761,87	1,205850	1841,66	1,254421	2025,81	1,205850	1841,66
40,50	1,183936	1760,64	1,205618	1840,65	1,254196	2025,10	1,205618	1840,65
41,00	1,183605	1759,42	1,205416	1839,57	1,254072	2024,95	1,205416	1839,57
41,50	1,183277	1758,20	1,205206	1838,53	1,253827	2024,34	1,205206	1838,53
42,00	1,182944	1756,97	1,204997	1837,53	1,253685	2023,71	1,204997	1837,53
42,50	1,182618	1755,75	1,204802	1836,79	1,253491	2023,34	1,204802	1836,79
43,00	1,182282	1754,52	1,204612	1835,88	1,253225	2022,58	1,204612	1835,88
43,50	1,181953	1753,29	1,204352	1834,47	1,253066	2022,08	1,204352	1834,47
44,00	1,181622	1752,06	1,204195	1833,82	1,252892	2021,69	1,204195	1833,82
44,50	1,181290	1750,83	1,203979	1832,83	1,252660	2020,89	1,203979	1832,83
45,00	1,180960	1749,60	1,203817	1831,91	1,252501	2020,66	1,203817	1831,91
45,50	1,180625	1748,37	1,203576	1830,98	1,252328	2020,13	1,203576	1830,98
46,00	1,180293	1747,14	1,203367	1829,78	1,252183	2019,64	1,203367	1829,78
46,50	1,179965	1745,90	1,203128	1828,75	1,251943	2018,93	1,203128	1828,75

	2-HDEAF		2-HDEAL		2-HDEAOx		2-HEAL	
T (K)	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	u (ms <sup>-1</sup> )	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	u (ms <sup>-1</sup> )	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	u (ms <sup>-1</sup> )	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	U (ms <sup>-1</sup> )
47,00	1,179628	1744,67	1,202960	1827,53	1,251722	2018,38	1,202960	1827,53
47,50	1,179294	1743,44	1,202816	1826,97	1,251510	2017,79	1,202816	1826,97
48,00	1,178961	1742,21	1,202652	1825,92	1,251298	2017,42	1,202652	1825,92
48,50	1,178624	1740,97	1,202441	1824,87	1,251151	2017,10	1,202441	1824,87
49,00	1,178293	1739,73	1,202263	1823,86	1,250895	2016,44	1,202263	1823,86
49,50	1,177958	1738,50	1,202132	1823,14	1,250646	2015,96	1,202132	1823,14
50,00	1,177621	1737,25	1,201960	1822,20	1,250516	2015,65	1,201960	1822,20
	2-HEAAd		2-HDEAMa		2-HDEASu		2-HDEAAd	
T (K)	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	u (ms <sup>-1</sup> )	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	u (ms <sup>-1</sup> )	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	u (ms <sup>-1</sup> )	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	U (ms <sup>-1</sup> )
20,00	1,196369	2028,38	1,283349	2133,42	1,231893	2021,01	1,224050	2030,30
20,50	1,196123	2026,67	1,283067	2129,70	1,231641	2019,67	1,223820	2028,22
21,00	1,195894	2025,10	1,282823	2125,77	1,231361	2018,20	1,223580	2026,16
21,50	1,195677	2023,63	1,282559	2122,36	1,231101	2016,92	1,223344	2024,12
22,00	1,195446	2021,94	1,282328	2119,00	1,230836	2015,49	1,223093	2021,85
22,50	1,195224	2020,55	1,282089	2115,99	1,230557	2014,21	1,222861	2019,89
23,00	1,195010	2019,09	1,281828	2112,77	1,230296	2012,98	1,222621	2017,94
23,50	1,194775	2017,79	1,281580	2109,74	1,230022	2011,66	1,222396	2016,00
24,00	1,194538	2016,33	1,281336	2106,95	1,229774	2010,55	1,222153	2014,13
24,50	1,194329	2015,03	1,281093	2104,08	1,229499	2009,31	1,221929	2012,36
25,00	1,194106	2013,74	1,280837	2101,14	1,229251	2008,18	1,221702	2010,54
25,50	1,193879	2012,53	1,280611	2098,34	1,228980	2007,00	1,221490	2008,87
26,00	1,193661	2011,22	1,280376	2095,86	1,228730	2005,91	1,221266	2007,13
26,50	1,193450	2010,03	1,280118	2093,27	1,228459	2004,74	1,221037	2005,45
27,00	1,193222	2008,88	1,279907	2090,92	1,228204	2003,67	1,220833	2003,89
27,50	1,193000	2007,68	1,279654	2088,41	1,227955	2002,66	1,220599	2002,27
28,00	1,192813	2006,67	1,279414	2086,14	1,227724	2001,80	1,220383	2000,67
28,50	1,192564	2005,44	1,279188	2083,87	1,227440	2000,57	1,220167	1999,16
29,00	1,192370	2004,43	1,278945	2081,59	1,227175	1999,51	1,219948	1997,65
29,50	1,192166	2003,38	1,278718	2079,38	1,226964	1998,79	1,219731	1996,21
30,00	1,191935	2002,30	1,278475	2077,31	1,226645	1997,45	1,219518	1994,69
30,50	1,191747	2001,32	1,278236	2075,14	1,226442	1996,67	1,219328	1993,25
31,00	1,191522	2000,27	1,278019	2073,24	1,226139	1995,43	1,219112	1991,96
31,50	1,191301	1999,33	1,277790	2071,25	1,225927	1994,63	1,218893	1990,43
32,00	1,191096	1998,28	1,277555	2069,35	1,225653	1993,61	1,218692	1989,25
32,50	1,190889	1997,27	1,277316	2067,45	1,225441	1992,70	1,218476	1987,73
33,00	1,190698	1996,59	1,277112	2065,74	1,225191	1991,85	1,218284	1986,50
33,50	1,190479	1995,49	1,276893	2064,02	1,224921	1990,69	1,218110	1985,11
34,00	1,190286	1994,68	1,276659	2062,21	1,224717	1990,16	1,217938	1983,96
34,50	1,190134	1994,07	1,276433	2060,56	1,224439	1988,95	1,217733	1982,72
35,00	1,189934	1993,10	1,276201	2058,71	1,224219	1988,03	1,217528	1981,23
35,50	1,189677	1991,93	1,275989	2057,19	1,224012	1987,38	1,217414	1979,92
36,00	1,189474	1991,29	1,275764	2055,83	1,223721	1986,29	1,217338	1978,50
36,50	1,189329	1990,45	1,275566	2054,30	1,223542	1985,44	1,217199	1977,78
37,00	1,189088	1989,47	1,275324	2052,47	1,223267	1984,53	1,217024	1976,17
37,50	1,188917	1988,76	1,275115	2050,93	1,223040	1983,57	1,216889	1974,80
38,00	1,188724	1988,15	1,274896	2049,57	1,222796	1982,77	1,216741	1973,53
38,50	1,188557	1987,32	1,274722	2048,23	1,222564	1981,94	1,216606	1972,36
39,00	1,188379	1986,49	1,274478	2046,50	1,222371	1981,08	1,216441	1971,18
39,50	1,188180	1985,57	1,274299	2045,35	1,222119	1980,15	1,216278	1970,39
40,00	1,187986	1984,84	1,274073	2043,86	1,221930	1979,36	1,216087	1968,87
40,50	1,187793	1983,97	1,273862	2042,45	1,221690	1978,43	1,215931	1968,04
41,00	1,187632	1983,17	1,273682	2041,53	1,221466	1977,65	1,215753	1966,86
41,50	1,187458	1982,47	1,273464	2039,91	1,221291	1976,90	1,215569	1965,52
42,00	1,187292	1981,74	1,273300	2038,65	1,221040	1975,86	1,215393	1964,44
42,50	1,187103	1980,99	1,273078	2037,17	1,220835	1974,89	1,215258	1963,26
43,00	1,186950	1980,38	1,272912	2036,24	1,220642	1974,06	1,215105	1962,24
43,50	1,186810	1979,58	1,272720	2034,94	1,220463	1973,40	1,214964	1961,29
44,00	1,186624	1978,84	1,272519	2033,69	1,220233	1972,75	1,214782	1960,09
44,50	1,186472	1978,34	1,272374	2032,64	1,220042	1971,78	1,214634	1958,89
45,00	1,186315	1977,51	1,272154	2031,40	1,219861	1971,07	1,214503	1958,24

	2-HEAAd		2-HDEAMa		2-HDEASu		2-HDEAAd	
T (K)	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	u (ms <sup>-1</sup> )	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	u (ms <sup>-1</sup> )	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	u (ms <sup>-1</sup> )	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	U (ms <sup>-1</sup> )
45,50	1,186152	1976,65	1,272048	2030,39	1,219635	1969,98	1,214313	1956,67
46,00	1,185991	1975,83	1,271795	2028,83	1,219528	1969,56	1,214188	1955,63
46,50	1,185834	1975,48	1,271624	2028,00	1,219295	1968,43	1,214052	1954,48
47,00	1,185678	1974,53	1,271432	2026,79	1,219146	1967,82	1,213917	1953,33
47,50	1,185532	1973,88	1,271272	2025,61	1,218996	1967,12	1,213794	1952,21
48,00	1,185464	1973,34	1,271093	2024,51	1,218731	1965,94	1,213684	1951,26
48,50	1,185261	1972,40	1,270929	2023,29	1,218571	1965,05	1,213564	1950,38
49,00	1,185138	1971,83	1,270774	2022,36	1,218435	1964,50	1,213441	1948,97
49,50	1,185055	1971,37	1,270674	2021,66	1,218253	1963,75	1,213357	1947,85
50,00	1,184891	1970,50	1,270497	2020,28	1,218094	1962,62	1,213250	1946,78
	2-HEACi							
T (K)	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	u (ms <sup>-1</sup> )						
20,00	1,326940	2231,87						
20,50	1,326700	2228,20						
21,00	1,326450	2224,70						
21,50	1,326210	2221,28						
22,00	1,325960	2218,00						
22,50	1,325720	2214,89						
23,00	1,325470	2211,82						
23,50	1,325230	2208,93						
24,00	1,324980	2206,11						
24,50	1,324740	2203,37						
25,00	1,324490	2200,72						
25,50	1,324250	2198,14						
26,00	1,324000	2195,67						
26,50	1,323750	2193,28						
27,00	1,323500	2190,97						
27,50	1,323260	2188,70						
28,00	1,323000	2186,52						
28,50	1,322760	2184,36						
29,00	1,322500	2182,28						
29,50	1,322250	2180,22						
30,00	1,322000	2178,21						
30,50	1,321750	2176,24						
31,00	1,321490	2174,34						
31,50	1,321240	2172,47						
32,00	1,320980	2170,66						
32,50	1,320720	2168,89						
33,00	1,320470	2167,18						
33,50	1,320210	2165,49						
34,00	1,319950	2163,86						
34,50	1,319690	2162,26						
35,00	1,319420	2160,71						
35,50	1,319160	2159,19						
36,00	1,318890	2157,72						
36,50	1,318620	2156,28						
37,00	1,318350	2154,89						
37,50	1,318090	2153,51						
38,00	1,317810	2152,18						

T (K)	2-HEACi	
	$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> )	u (ms <sup>-1</sup> )
38,50	1,317540	2150,85
39,00	1,317270	2149,58
39,50	1,316990	2148,32
40,00	1,316710	2147,09
40,50	1,316440	2145,86
41,00	1,316160	2144,67
41,50	1,315870	2143,50
42,00	1,315600	2142,36
42,50	1,315320	2141,24
43,00	1,315030	2140,12
43,50	1,314770	2139,02
44,00	1,314530	2137,94
44,50	1,314290	2136,88
45,00	1,314050	2135,84
45,50	1,313810	2134,81
46,00	1,313570	2133,80
46,50	1,313320	2132,79
47,00	1,313080	2131,79
47,50	1,312840	2130,82
48,00	1,312600	2129,85
48,50	1,312360	2128,90
49,00	1,312120	2127,96
49,50	1,311880	2127,05
50,00	1,311640	2126,10



## Apêndice IV: Produção científica

Como resultados deste trabalho foram desenvolvidos os seguintes trabalhos científicos:

## APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS

<b>Título do Trabalho</b>	<b>Evento</b>	<b>Autores</b>
Efeito da temperatura sobre a densidade e velocidade de propagação do som em óleos vegetais	<b>7º ENTEQUI - Encontro Nacional de Tecnologia Química</b> 17-19 Setembro 2014, Vitória/ES – Brasil Trabalho resumo	Miguel Iglesias, <u>Gicelia Ferreira</u> , Rebecca Andrade, A. Arnabat, Cristina Gonzalez.
Calculating the number of solvation using mixtures of ionic liquids.	<b>13 CLAFQO - 13th Latin American Conference on Physical Organic Chemistry</b> 17-21 Maio 2015, Villa Carlos Paz - Argentina Trabalho resumo	Miguel Iglesias, <u>Gicelia Ferreira</u> , Karine Souza, Deiseane Santos, Wendy Vieira.
Indústria sustentável: líquidos iônicos próticos como materiais do futuro	<b>5º REA - 5ª Reunião de Estudos Ambientais</b> 18-19 Junho 2015, Porto Alegre - Brasil Trabalho resumo	Miguel Iglesias, <u>Gicelia Ferreira</u> , Rebecca Andrade, Sandra Cerqueira, Roberta Bussamara.
Medição do coeficiente de partição de líquidos iônicos próticos	<b>II Simpósio Nacional sobre Bioenergia</b> 03-04 Dezembro 2015, Salvador – Brasil Trabalho resumo	Miguel Iglesias, <u>Gicelia Ferreira</u> , Daniel Oliveira, Sandra Pereira.
Effect of temperature on the thermodynamic properties of new protic ionic liquids	<b>CLAQ - 32º Congresso Latinoamericano de Química</b> 19-22 Janeiro 2016, Concepción, Chile Trabalho resumo	Miguel Iglesias, <u>Gicelia Ferreira</u> , Rebecca Andrade, Cristina González.

## PERIÓDICOS CIENTÍFICOS

Título do Trabalho	Periódico	Autores
Investigation of the rheological properties of protic ionic liquids	<b>Journal of Physical Organic Chemistry</b> Impact Index (2015) = 1.38	Miguel Iglesias, <u>Gicelia Ferreira</u> , Rebecca Andrade, Danillo Camargo, Helen Mazzer, Lúcio Cardozo-Filho.
Thermodynamic properties of palm oil ( <i>Elaeis guineensis</i> ) and evening primrose seed oil ( <i>Oenothera biennis</i> ) as a function of temperature	<b>World Wide Journal of Multidisciplinary Research and Development</b>	Miguel Iglesias, <u>Gicelia Ferreira</u> , Rebecca Andrade, Danillo Camargo.