

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI ERECHIM

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JOSIANE BETAT DA SILVA

**PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA VIA ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA
EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE**

ERECHIM-RS, BRASIL

AGOSTO DE 2014

JOSIANE BETAT DA SILVA

**PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA VIA ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA
EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos: Área de Concentração-Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim.

Orientadores: Prof^a. Dra. Natália Paroul
Prof. Dr. Rogério Luis Cansian

ERECHIM-RS, BRASIL

AGOSTO DE 2014

**PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA VIA ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA
EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE**

JOSIANE BETAT DA SILVA

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão julgadora:

Prof^a. Natália Paroul, D.Sc.
Orientadora

Prof. Rogério Luis Cansian, D.Sc.
Orientador

Prof^a. Débora de Oliveira, D.Sc.
UFSC - Florianópolis

Prof. Rogério Marcos Dallago, D.Sc.
URI - Erechim

ERECHIM-RS, BRASIL

AGOSTO DE 2014

Esta página é reservada para a inclusão da ficha catalográfica.

*“O tempo é o melhor autor; sempre
encontra um final perfeito.”*

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

À minha família, sobretudo à minha mãe, que sempre me apoiou e incentivou.

Aos amigos e colegas de trabalho, pelo incentivo e pelo apoio constantes.

Aos colegas de aula, especialmente a amiga Elisangela de Abreu, pelo companheirismo em todos os momentos.

À Faculdade de Tecnologia SENAI Chapecó, pelo apoio na realização do mestrado.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação, pela dedicação e ensinamentos transmitidos.

Às bolsistas Tainára e Suelen, que me auxiliaram durante todo o trabalho.

E especialmente aos meus orientadores, Natalia Paroul, pela paciência, pela dedicação, pela força e principalmente pelo carinho na orientação deste trabalho e Rogério Cansian, pela disposição em ajudar sempre.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

Resumo da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA VIA ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

JOSIANE BETAT DA SILVA

Este estudo relata a otimização da produção de acetato de isoamila via esterificação de álcool isoamílico e ácido acético num sistema isento de solvente, utilizando a lipase comercial Novozym 435 como catalisador. As condições de reação que otimizaram a produção de acetato de isoamila foram determinadas como sendo 30°C, razão molar de álcool isoamílico e ácido acético 5:1, 150 rpm e 15% em peso de enzima, com conversão da reação acima de 93%. Após a determinação dos melhores parâmetros de reação, um estudo cinético foi realizado e os resultados obtidos permitem concluir que a condição otimizada proporcionou a conversão quase completa (>93%) após 3 h de reação. A reutilização do catalisador demonstrou que depois de 10 ciclos consecutivos de utilização, o rendimento da reação se mantém em cerca de 83%.

Palavras-chave: esterificação, acetato de isoamila, Novozym 435.

Abstract of dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Food Engineering.

ISOAMYL ACETATE PRODUCTION BY ENZYMATIC ESTERIFICATION IN SOLVENT-FREE SYSTEM

JOSIANE BETAT DA SILVA

This study reports the optimization of isoamyl acetate production by esterification of isoamyl alcohol and acetic acid in a solvent-free system using the Novozym 435 commercial lipase as catalyst. The operating conditions that maximized isoamyl acetate production were determined to be 30 °C, isoamyl alcohol to acetic acid molar ratio of 5:1, 150 rpm and 15 wt% of enzyme, with a resulting reaction conversion of about 93%. After determining the best reaction parameters, a kinetic study was performed and the results obtained in this step allow to conclude that condition afforded nearly complete reaction conversion after 3 h of reaction. The reuse of the catalyst demonstrated that after 10 consecutive cycles of use, the reaction yield was about 83%.

Keywords: esterification, isoamyl acetate, Novozym 435.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 AROMAS	16
2.1.1 Regulamentação do uso de aromas/aromatizantes.....	18
2.1.2 Panorama atual da indústria de aromas	22
2.1.3 Ésteres aromatizantes.....	25
2.2 OBTENÇÃO DE AROMAS	29
2.2.1 Métodos tradicionais de obtenção de aromas	30
2.2.2 Métodos biotecnológicos de obtenção de aromas.....	33
2.2.2.1 Uso de solventes na esterificação enzimática	35
2.2.2.2 Produção de acetato de isoamila via catálise enzimática	38
2.3 ENZIMAS	40
2.3.1 Lipases	45
2.3.1.1 Reações catalisadas por lipases	49
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 MATERIAIS.....	51
3.2 MÉTODOS.....	51
3.2.1 Reação de esterificação	51
3.2.2 Determinação da conversão da reação	52
3.2.3 Otimização da produção de acetato de isoamila	53
3.2.4 Avaliação cinética da produção enzimática de acetato de isoamila ...	53
3.2.5 Ciclos de reúso da enzima.....	54
3.2.6. Efeito das peneiras moleculares	54

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA	55
4.2 AVALIAÇÃO CINÉTICA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	61
4.3 EFEITO DA REUTILIZAÇÃO DA ENZIMA.....	63
4.4 EFEITO DAS PENEIRAS MOLECULARES.....	64
4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
5 CONCLUSÃO	67
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	68
7 REFERÊNCIAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação de esterificação	32
Figura 2: Gráfico de Pareto da produção de acetato de isoamila (6 horas de reação a 30°C).....	56
Figura 3: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de acetato de isoamila em função da concentração de enzima e razão molar.	58
Figura 4: Cinética da produção enzimática de acetato de isoamila.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis e níveis do DCCR 2 ² para produção enzimática de acetato de isoamila.	53
Tabela 2: Matriz do delineamento experimental (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em acetato de isoamila, a 30°C, 150 rpm e 6 h.	55
Tabela 3: Análise de variância para produção de acetato de isoamila no segundo planejamento experimental.	57
Tabela 4: Reúso da enzima na produção de acetato de isoamila na condição otimizada (150rpm, 30°C, razão molar 1:5 (ácido acético: álcool isoamilico) e concentração da enzima (m/m substrato) 15%).	63
Tabela 5: Conversão em acetato de isoamila na condição otimizada em diferentes concentrações de peneiras moleculares.	65

1 INTRODUÇÃO

Ésteres de ácidos carboxílicos são componentes importantes de aromas naturais utilizados na indústria alimentícia para a formação e intensificação de aromas em alimentos (MACEDO & PASTORE, 1997).

Ao longo dos últimos 50 anos a indústria de aromas desenvolveu e utiliza produtos sintéticos compreendendo aromatizantes idênticos aos naturais e compostos artificiais que não são encontrados na natureza. Esse comportamento deve-se principalmente ao custo de ingredientes naturais, já que a produção desses aromas depende de grandes quantidades de matéria-prima e possui variações em relação a clima, estação e local de produção, além da oferta ser insuficiente para atender à demanda (SCHWAB *et al.*, 2008).

A maioria dos processos de esterificação na indústria ainda são catalisados empregando ácidos inorgânicos fortes, principalmente o ácido sulfúrico. No entanto, as dificuldades na recuperação do catalisador, o consumo elevado de energia, a corrosão de equipamentos, bem como a necessidade de tratamento de resíduos são as principais desvantagens na síntese catalisada por produtos químicos (RAJEANDRAN *et al.*, 2009; RAHMAN *et al.*, 2011).

A demanda por compostos químicos aromáticos naturais está crescendo rapidamente em resposta a consumidores e indústrias que buscam processos com menos impactos ambientais. No entanto, a qualidade e a oferta de sabores naturais ainda é limitada. Alternativas viáveis e inovadoras para produção de aromatizantes incluem vias biotecnológicas (SCHWAB *et al.*, 2008; PAROUL *et al.*, 2010).

Um fator de grande relevância a ser destacado é que os aromas produzidos biotecnologicamente podem ser caracterizados como “naturais” ou “idênticos aos

naturais” e, portanto são preferidos pelo mercado consumidor (GILLIES *et al.*, 1987; MACEDO & PASTORE, 1997).

Nos últimos anos, a utilização de enzimas para a catálise de reações de esterificação tem sido extensivamente estudada. Verifica-se essa tendência em função da especificidade das enzimas, das condições de operação amenas com menos impacto ambiental, do grau de pureza dos produtos e da sua aceitabilidade na indústria alimentar (GÜVENÇ *et al.*, 2002; RAJEANDRAN *et al.*, 2009).

Entre os possíveis processos catalisados por enzimas, o uso de lipases na síntese de ésteres em meio orgânico apresenta-se como uma vertente bastante promissora, conforme atestam os processos em fase de implantação industrial (CASTRO *et al.*, 2004).

A lipase obtida de *Candida antarctica* demonstra uma elevada atividade catalítica para a esterificação de ácidos dicarboxílicos, sendo um catalisador versátil para uma ampla gama de reações orgânicas. Sua alta atividade, estabilidade térmica, seletividade e especificidade em comparação com outras lipases conhecidas possibilita o uso dessa enzima em aplicações únicas (RAHMAN *et al.*, 2011).

Ésteres têm sido geralmente produzidos por lipases livres e imobilizadas, a partir de várias fontes, em solventes orgânicos. Apesar dos mais elevados rendimentos de conversão e recuperação do produto em solvente orgânico, a toxicidade do solvente é um problema para muitas aplicações. Além disso, alguns solventes orgânicos utilizados possuem custo elevado que tornam seu emprego inviável na produção em escala industrial. As principais vantagens de um sistema isento de solventes são de que a ausência de solventes facilita o processamento, uma vez que menos componentes estariam presentes no fim da reação, além disso, a eliminação de solventes na produção oferece significativa economia de custo e

minimiza o impacto ambiental. Outra vantagem dos sistemas livres de solventes é a possibilidade de utilizar elevadas concentrações de substrato, para se obter concentrações elevadas de produtos (GÜVENÇ *et al.*, 2002).

Entretanto, apesar das inúmeras vantagens apresentadas pela esterificação enzimática, diversos parâmetros, como por exemplo, concentração e hidratação da enzima, temperatura, concentração do substrato, tamanho da cadeia e estrutura química dos reagentes (ácido e álcool), podem afetar o desempenho da síntese, tornando-se indispensável o aprofundamento de estudos nesta área para identificar as condições ideais para que o processo seja viável (CASTRO *et al.*, 2004; RAJEANDRAN *et al.*, 2009).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar a produção enzimática de acetato de isoamila (aroma de banana), pela lipase industrial imobilizada Novozim 435 (*Candida antarctica*). Para atender a este objetivo, os seguintes objetivos específicos foram determinados:

- Avaliar o efeito da concentração de enzima e razão molar de álcool e agente acilante no processo da síntese enzimática de acetato de isoamila ;
- Avaliar a cinética da reação;
- Avaliar os ciclos de reutilização da enzima comercial na condição otimizada;
- Avaliar o efeito das peneiras moleculares na produção de acetato de isoamila em sistema livre de solvente orgânico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão apresenta o embasamento teórico sobre a produção de aromas e como as tendências de escolha do consumidor, as definições regulamentares e avanços tecnológicos apresentam oportunidades para a exploração comercial da biotecnologia na produção de aromas.

2.1 AROMAS

Os aromas são misturas muito complexas de origem natural e/ou sintética possuindo propriedades olfativas e gustativas bastante definidas. Incorporando-os aos produtos alimentícios, lhes conferem um odor característico. Os aromas constituem, assim, um fator importante e indispensável para a fabricação dos produtos alimentícios (LINDEN & LORIENT, 1996).

Misturas de aromas são formulações complexas de compostos aromáticos, tais como óleos essenciais e seus derivados naturais, bem como produtos químicos aromáticos contendo até 100 constituintes (SCHWAB *et al.*, 2008). Já foram identificadas mais de 10.000 moléculas odoríferas. Este número basta por si só para ilustrar a complexidade desta família de substâncias (LINDEN & LORIENT, 1996).

Hall & Merwin (1981) definiram aromatizante como "uma substância que pode ser um simples composto químico, ou uma mistura de produtos químicos de origem natural ou sintética cuja principal função consiste em fornecer a totalidade ou parte do efeito especial do aroma em qualquer alimento ou outro produto levado à boca".

De acordo com o Código de Boas Práticas da *International Organization of the Flavor Industry* (IOFI, 2010), aromas são produtos adicionados aos produtos alimentícios para conferir, modificar ou intensificar o sabor dos alimentos.

Os aromas desempenham um papel essencial em nossa relação com o alimento. Estas substâncias atuam diretamente sobre a capacidade de assimilação dos outros ingredientes: predisposição do indivíduo para ingerir um alimento, secreção de saliva ou suco gástrico (LINDEN & LORIENT, 1996).

Preferências culturais e regionais, juntamente com a disponibilidade local de alimentos e sabores, resultam na escolha diversificada de aromas por diferentes populações. Considerando-se a grande variedade de alimentos que são consumidos e a complexidade dos aromas destes alimentos, globalmente é conhecido um grande número de ingredientes aromatizantes (IOFI, 2010). Portanto, a conversão de precursores em compostos de aroma não tem somente importância científica, mas também é de interesse da indústria de alimentos em geral. Os seus produtos representam um elemento crítico no sucesso de outras indústrias alimentícias que os utilizam como insumos (ARAGÃO *et al.*, 2009).

Os aromas podem ser utilizados para compensar variações sazonais naturais ou variações geográficas nas safras. A aplicação de aromas pode compensar a limitação da oferta, ajudando a padronizar o sabor dos alimentos (IOFI, 2010).

Aromas criam a identidade de um produto, assim como permitem adaptar o sabor característico de um alimento à preferência do público local. Os aromas podem ser considerados ingredientes críticos, pois alguns alimentos e bebidas simplesmente não teriam aceitação sem a adição de aromas, como por exemplo: refrigerantes, sorvetes, confeitos doces e sobremesas lácteas (IOFI, 2010). Além disso, as tecnologias empregadas na fabricação de alimentos fazem desaparecer

geralmente todas as moléculas aromatizantes mais características (LINDEN & LORIENT, 1996), já que os compostos voláteis do aroma são, em sua maioria, substâncias termolábeis, sujeitos a rearranjos, ciclizações e oxidações, quando submetidos a aumentos de temperatura ou mudança físico-química (GAVA *et al.*, 2008).

Segundo Aragão *et al.* (2009), o aroma típico de cada produto é resultado da combinação de dezenas de substâncias voláteis representantes de diversas classes químicas, com diferentes propriedades físico-químicas. Nenhum constituinte individual é totalmente responsável pelo aroma característico de um alimento, mas em alguns produtos existem um ou mais componentes que, sozinhos, lembram a qualidade característica de seu aroma (GAVA *et al.*, 2008). As funções químicas mais frequentemente encontradas nos aromas são, nesta ordem: ésteres, cetonas, alcóois, aldeídos, éteres de fenóis, heterocíclicos nitrogenados, heterocíclicos oxigenados e ácidos carboxílicos (LINDEN & LORIENT, 1996). Estes compostos responsáveis pelo aroma se forem apreciados isoladamente, têm cheiros característicos e ocorrem nos frutos em proporções bastante diferentes (ARAGÃO *et al.*, 2009).

2.1.1 Regulamentação do uso de aromas/aromatizantes

Os aromatizantes são normatizados/regulamentados por diversas entidades em todo o mundo. De acordo com Código de Boas Práticas da *International Organization of the Flavor Industry*, os aromas podem ser classificados nos seguintes grupos (IOFI, 2010):

- **Aromas naturais**, que são obtidos a partir de matérias primas de origem animal, vegetal ou microbiológica. Fontes para a obtenção de complexos aromatizantes naturais e substâncias aromatizantes naturais são os óleos essenciais, oleoresinas, extratos, destilados, bem como produtos de torrefação, aquecimento ou transformações enzimáticas de especiarias, frutas ou suco de frutas, vegetais ou suco de vegetais, leveduras comestíveis, ervas, cascas, brotos, raízes, folhas ou materiais semelhantes de plantas, carne, frutos do mar, aves, ovos e outros produtos animais, produtos lácteos, ou produtos lácteos fermentados.
- **Aroma de reação**, é o produto sintetizado com a finalidade de obter propriedades aromáticas, e é resultante do aquecimento de uma mistura de matérias-primas que são alimentos ou ingredientes alimentícios.
- **Aromas de fumaça** são misturas complexas de componentes da fumaça, obtidos através da pirólise da madeira sem tratamento com uma quantidade de ar limitada e controlada, por destilação a seco ou por vapor superaquecido. A fumaça da madeira é submetida a um sistema de extração aquosa ou à destilação, condensação, e separação para coleta da fase aquosa. Os principais componentes aromáticos em aromas de fumaça são ácidos carboxílicos, compostos com grupos carbonilas e compostos fenólicos.
- **Aromas produzidos por processos enzimáticos e microbiológicos**, contendo ou não ingredientes alimentícios não aromatizantes, são preparações concentradas utilizadas para conferir sabor. São produzidos submetendo-se um substrato ou substratos à ação de enzimas ou microrganismos.

No Brasil, o uso de aromatizantes é regulamentado pela Resolução RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007 (ANVISA, 2007), que aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/Aromas. De acordo com a resolução, os aromatizantes são substâncias ou misturas de substâncias, com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos. São classificados em aromas naturais ou sintéticos, conforme descrito a seguir:

“Os aromas naturais são obtidos exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes naturais, de origem animal ou vegetal, aceitáveis para consumo humano, em seu estado natural ou após um tratamento adequado como torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento enzimático, tratamento enzimático ou outros” (ANVISA, 2007). Os aromas naturais compreendem:

- Óleos Essenciais: São produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processos físicos (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Os óleos essenciais podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados.
- Extratos: São produtos obtidos por esgotamento, a frio ou a quente, a partir de produtos de origem animal, vegetal ou microbiana com solventes permitidos. Devem conter os princípios sápidos aromáticos voláteis e fixos correspondentes ao respectivo produto natural.
- Bálsamos, oleoresinas ou oleogomaresinas: São os produtos obtidos mediante a exudação livre ou provocada de determinadas espécies vegetais.
- Substâncias aromatizantes naturais isoladas: São as substâncias quimicamente definidas obtidas por processos físicos, microbiológicos ou

enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes naturais ou de aromatizantes naturais. Incluem-se os sais de substâncias naturais com os seguintes íons cátions: H^+ (hidrogênio), Na^+ (sódio), K^+ (potássio), Ca^{++} (cálcio) e Fe^{+++} (ferro), e ânions: Cl^- (cloreto), SO_4^- (sulfato), CO_3^- (carbonato).

Já os aromas sintéticos são definidos como “compostos quimicamente definidos obtidos por processos químicos, compreendendo aromas idênticos aos naturais e artificiais” (ANVISA, 2007). Os aromatizantes sintéticos compreendem:

- Aromatizantes idênticos ao natural: São as substâncias quimicamente definidas obtidas por síntese e aquelas isoladas por processos químicos a partir de matérias-primas de origem animal, vegetal ou microbiana que apresentam uma estrutura química idêntica às substâncias presentes nas referidas matérias.
- Aromatizantes artificiais: São os compostos químicos obtidos por síntese, que ainda não tenham sido identificados em produtos de origem animal, vegetal ou microbiana, utilizados em seu estado primário ou preparados para o consumo humano.
- Misturas de aromatizantes: Os aromatizantes podem apresentar-se misturados entre si, seja qual for o número de componentes e tipo de aromatizantes.
- Aromatizantes de reação/transformação: São produtos obtidos por aquecimento comparável ao cozimento de alimentos, a partir de matérias-primas que são alimentos ou ingredientes alimentares ou mistura de ingredientes que possam ou não ter propriedades aromatizantes por si

mesmos, sendo que ao menos um contenha nitrogênio amínico e o outro seja um açúcar redutor.

- Aromatizantes de fumaça: São preparações concentradas, utilizadas para conferir aroma de defumado aos alimentos.

2.1.2 Panorama atual da indústria de aromas

O conhecimento e uso de plantas como aromatizantes para melhorar a qualidade de alimentos, bebidas e drogas é tão antigo quanto a história da humanidade. No século 19, a comercialização de aromas e fragrâncias em escala industrial começou com o isolamento dos produtos químicos individuais responsáveis pelo aroma característico de produtos naturais, por exemplo, cinamaldeído, isolado a partir do óleo de canela e benzaldeído a partir do óleo de amêndoa amarga (SCHWAB *et al.*, 2008).

A indústria de aromas e fragrâncias é um mercado mundial de bilhões de dólares que cresce anualmente (PRINS *et al.*, 2010), avaliada em aproximadamente US\$ 21,8 bilhões em 2011 e deverá ultrapassar os US\$ 30 bilhões em 2017, com uma taxa de crescimento anual composta de 5,6% entre 2012 e 2017 (VENKATARAMAN *et al.*, 2012). Esse setor possui diversas aplicações, tais como, perfumes finos, fragrâncias de base usadas em domissanitários, cosméticos, brindes de borracha, entre outros (EDRIS & MALONE, 2011). Representa não somente um mercado global multibilionário, mas também uma fonte de desenvolvimento científico e de inovação constante. As grandes empresas de fragrâncias, conhecidas como *Flavor Houses*, se concentram principalmente na Europa, mas estendem suas ramificações por todo o resto do planeta (SPEZIALI, 2012).

De acordo com Venkataraman *et al.* (2012), até o ano de 2011 o mercado mundial somente de aromas era estimado em US\$ 10,6 bilhões, e em 2012 ultrapassou US\$ 11,1 bilhões. Este valor deverá ultrapassar os US\$14,5 bilhões em 2017, a uma taxa de crescimento anual de 5,4%. Os maiores mercados estão na Europa (36%) e América do Norte (32%), seguida pela região da Ásia-Pacífico (26%). Oito grandes empresas globais compartilham 60% do mercado mundial (SCHWAB *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, os aromas vêm sendo isolados a partir de fontes naturais ou produzidos por síntese química (SCHRADER *et al.*, 2004; KARRA-CHÂABOUNI *et al.*, 2006). Apesar dos avanços na síntese química de aromas, muitos compostos ainda são extraídos de fontes botânicas, por razões econômicas e pela preferência do consumidor por produtos naturais (ARMSTRONG & YAMASAKI, 1986). No entanto, a demanda por produtos químicos aromáticos naturais está crescendo rapidamente, em resposta a ambos os consumidores, que estão solicitando um retorno à natureza, bem como os perfumistas e flavoristas, que estão à procura de novos ingredientes criativos (SCHWAB *et al.*, 2008).

Esse aumento na demanda de produtos naturais, segundo Armstrong & Yamasaki (1986), é observado, provavelmente, devido ao aumento do número de produtos químicos não-naturais encontrados que apresentam algum tipo de toxicidade. Como consequência, os consumidores podem se sentir mais à vontade com compostos naturais, particularmente aqueles que são consumidos com frequência.

Com isso, vários esforços têm sido feitos no sentido de aumentar a produção de substâncias de interesse comercial (SPEZIALI, 2012). Com o aumento do interesse por produtos "naturais", mais pressão foi colocada sobre a produção de

aromas naturais por processos de extração de matérias-primas, tais como plantas. Essas matérias-primas são, no entanto, sujeitas a vários problemas. Frequentemente, elas contêm baixas concentrações do composto desejado e, por conseguinte, a extração é cara. Além disso, o fornecimento dos materiais está sujeito a variações sazonais e climáticas, o que afeta significativamente o rendimento e a qualidade do sabor. A oferta também é influenciada pela estabilidade sócio-política das regiões produtoras; esta tem sido uma das principais preocupações das indústrias transformadoras que dependem das tecnologias de extração tradicionais. Além disso, algumas espécies botânicas estão em risco de extinção (ARMSTRONG & YAMASAKI, 1986; LARIOS *et al.*, 2004; FEHÉR *et al.*, 2008).

Apesar do alto valor econômico associado aos aromas naturais, a pesquisa por aromas sintéticos é crescente devido à possível extinção das fontes de matéria-prima de qualidade (SPEZIALI, 2012), já que a produção de aromas naturais não depende apenas de fatores genéticos e do estágio de desenvolvimento das plantas, mas também de fatores ambientais, que podem resultar em alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas de modificar a quantidade e a qualidade do óleo essencial. Essas modificações prejudicam a produção de plantas aromáticas que visa óleo essencial, reduzindo sua qualidade (PRINS *et al.*, 2010). O Brasil, por exemplo, destaca-se na produção mundial de óleos essenciais, mas sofre de problemas crônicos como falta de manutenção do padrão de qualidade dos óleos, representatividade nacional e baixos investimentos governamentais no setor, que levam ao quadro estacionário observado (BIZZO *et al.*, 2009).

Atualmente, devido ao custo elevado ou a falta de disponibilidade de extratos de aromas naturais, a maioria dos aromatizantes comerciais são “idênticos aos

naturais”, o que significa que eles correspondem ao equivalente químico de aromas naturais, mesmo sendo quimicamente sintetizados, na sua maioria a partir de precursores de derivados do petróleo. Além da síntese química, muitas vezes usar processos de produção ambientalmente hostis, tais como catalisadores de metais pesados, e o petróleo bruto ser uma fonte limitada. Neste contexto, é desejável mudar para a bioprodução, incluindo a extração a partir de fontes naturais, os processos microbianos (fermentação), e bioconversão de precursores utilizando microrganismos ou enzimas isoladas (BIZZO *et al.*, 2009).

Diante do mercado mundial crescente, em que existe uma tendência nítida para compostos "naturais", a produção de aromas por meio de processos biotecnológicos oferece muitas vantagens (ARMSTRONG & YAMASAKI, 1986; SCHRADER *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2005). Apelos de políticas de preservação ambiental são instrumentos de marketing muito eficientes, particularmente no mercado Europeu. Esta é uma ótima oportunidade para o desenvolvimento de processos sustentáveis de exploração da biodiversidade (BIZZO *et al.*, 2009).

2.1.3 Ésteres aromatizantes

Ésteres naturais e sintéticos são materiais essenciais na indústria química. Eles têm sido mais comumente aplicados na produção de óleos lubrificantes, solventes, plastificantes, tintas, alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e combustíveis líquidos (MAHAPATRA *et al.*, 2009; RAHMAN *et al.*, 2011).

De acordo com Barzca (2011), os ésteres podem ser divididos em três grandes classes:

- Classe dos ftalatos: ésteres ftálicos destacam-se no mercado de polímeros nas áreas de plastificantes e resinas. Caracterizam-se pelo alto ponto de ebulição, estabilidade, não apresentam odor e cor, confere ao produto final flexibilidade e maciez.
- Classe dos acetatos: em função da natureza hidrofóbica e baixa polaridade, ésteres de acetatos baixo peso molecular como acetatos de metila, etila, e derivados propilas e butilas, são destaque no mercado de solventes, extractantes e diluentes. Ao contrário dos ácidos carboxílicos, de odor desagradável, alguns ésteres são importantes compostos com aplicações nas áreas de essências e fragrâncias sintéticas. Também possuem aplicações no mercado de polímeros, por exemplo, o acetato de vinila é um importante intermediário (monômero) da produção de diversos tipos de polímeros nas áreas de tintas (PVA), colas e adesivos (hot-melt) e filmes para embalagem de alimentos.
- Classe dos acrilatos: são usados nas indústrias de polímeros. Metacrilato de metila e acrilato de metila são monômeros utilizados na obtenção das resinas acrílicas usadas principalmente para fabricação de chapas acrílicas, pós de moldagem e tintas, consumidos pelas indústrias de tintas, automobilística e eletrônica.

Dentre os ésteres, os de baixo peso molecular têm um potencial interesse para a indústria de alimentos, como compostos de aroma, devido a sua fragrância e sabor característicos (ROMERO *et al.*, 2007; RAJEANDRAN *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2011). Muitos deles são responsáveis por odores de frutas dos alimentos que são constituídos principalmente por ácidos e seus derivados de cadeia curta como

acetatos, propionatos e butiratos (MACEDO & PASTORE, 1997; KRISHNA *et al.*, 2000).

São conhecidos muitos ésteres componentes de aromas naturais que têm sido obtidos de fonte natural ou por métodos tradicionais de síntese química (MACEDO & PASTORE, 1997). Os principais ésteres utilizados como aromas de frutas em produtos alimentícios, são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1: Substâncias aromáticas de impacto em alguns alimentos

Aroma relacionado	Substância aromática de impacto
Abacaxi	Acetato de metila, formiato de metila, proprianato de etila, butanoato de etila
Banana	Acetato de isoamila, acetato de pentila
Cereja	Acetato de benzila
Coco	Nonanolida-4
Damasco	Butanoato de butila
Framboesa	Formiato de isobutila
Goiaba	Cinamato de metila, acetato de fenanteíla
Laranja e limão	Acetato de geranila, butirato de etila, formiato de geranila, isovaleriato de metila
Maçã	Etanoato de etila
Manga	Acetato de etila, butirato de etila, butirato de butila
Maracujá	Acetato de citronelila
Melão	Decanolida-4
Menta	Acetato de etila
Morango	Etanoato de isobutila
Pera	Acetato de isopentila, Tras-2-cis-4-decadienoato
Pêssego	Formiato de etila
Uva	Antranilato de metila

Fonte: Belitz & Grosch (1982); Linden & Lorient (1996); Evangelista (2001) e Gava *et al.* (2008).

Entre todos os ésteres empregados pela indústria, o acetato de isoamila tem grande importância comercial, devido ao seu característico sabor de banana (KRISHNA *et al.*, 2001; GHAMGUI *et al.*, 2005; ROMERO *et al.*, 2007; AZUDIN *et al.*, 2013), chegando a taxas de produção de 74.000 kg/ano, segundo Güvenç *et al.* (2007).

Também é utilizado como um solvente para alguns vernizes e lacas de nitrocelulose. Além de, por ser um feromônio de abelhas, poder ser usado para atrair grandes grupos de abelhas a uma pequena área (KUMARI *et al.*, 2009).

De acordo com CVJETKO *et al.* (2012), a produção deste tipo de composto tem sido tradicionalmente conseguida através de síntese química (através da reação de um álcool com um ácido orgânico na presença de um catalisador ácido), uma vez que a extração de materiais vegetais ou a produção por fermentação, é atualmente inviável para exploração comercial (ROMERO *et al.*, 2005).

Tradicionalmente, o acetato de isoamila foi produzido por extração a partir de fontes naturais, porém, a falta de abastecimento gerava dificuldades de produção. Em seguida, os pesquisadores descobriram uma forma alternativa usando o método de fermentação, mas a prática é demasiada escassa ou cara para produção industrial. Devido à necessidade da indústria, os pesquisadores lançaram mão de rotas alternativas de processos de esterificação via natural para produção de acetato de isoamila, porém, as mesmas também apresentaram dificuldades, como o longo tempo necessário para a produção de éster e baixo rendimento. Então, foi introduzida a síntese química, utilizando-se ácido forte e álcool. No entanto, a síntese por métodos químicos utiliza poluentes ácidos como catalisadores, que requerem um tratamento após o processo, muito dispendioso para aplicação industrial. Recentemente, um novo método de produção de ésteres pela aplicação de lipase foi

desenvolvido e que vem apresentando mais vantagens econômicas em comparação com os métodos anteriores, devido às suas condições de operação suaves, o grau de pureza dos produtos e a sua aceitabilidade na indústria alimentar (AZUDIN *et al.*, 2013).

Estudos sobre a produção de acetato de isoamila foram ampliados desde 1976, sendo que já foram realizadas 1.174 patentes relacionadas a esse éster. A maioria dos estudos tem utilizado o hexano ou o heptano como solvente, que não são preferíveis devido às suas propriedades tóxicas. O risco e as condições desfavoráveis foram removidos mediante a introdução do sistema livre de solvente (AZUDIN *et al.*, 2013).

Embora a síntese de acetato de isoamila catalisada por lipase em solventes orgânicos tenha sido estabelecida com sucesso, a utilização de sistemas isentos de solventes, dióxido de carbono supercrítico e líquidos iônicos, também demonstraram ser alternativas promissoras (FEHÉR *et al.*, 2008; CVJETKO *et al.*, 2012).

2.2 OBTENÇÃO DE AROMAS

Os aromas podem ser obtidos por três técnicas: extração de fontes naturais, sínteses químicas e enzimáticas (ARAGÃO *et al.*, 2009; MAHAPATRA *et al.*, 2009, PAROUL *et al.*, 2010). Atualmente, a maior parte dos componentes do sabor e aroma são produzidos por métodos tradicionais, tais como a extração a partir de fontes naturais e de síntese química (GHAMGUI *et al.*, 2005).

2.2.1 Métodos tradicionais de obtenção de aromas

Ésteres extraídos de materiais vegetais são muitas vezes escassos ou caros para uso comercial (GHAMGUI *et al.*, 2005). Podem ser obtidos diretamente de extração de plantas, mas o alto custo e a pequena quantidade de produto obtido indica que essa técnica é inadequada para aplicações industriais (ROMERO *et al.*, 2007; SALAH *et al.*, 2007; ARAGÃO *et al.*, 2009; MAHAPATRA *et al.*, 2009).

Entre os produtos naturais utilizados como aromatizantes, os óleos essenciais são de grande destaque na indústria de aroma. Entretanto, para atender as exigências do mercado e indústrias, alguns requisitos são necessários visando manter uma produção de óleo essencial constante e de qualidade, principalmente em termos de composição química. A produção de óleo essencial não depende só da genética da planta ou fase de desenvolvimento. O ambiente e as suas mudanças podem influenciar de forma significativa vias bioquímicas e processos fisiológicos que alteram o metabolismo da planta e, portanto, a biossíntese de óleo essencial (PRINS *et al.*, 2010).

À medida que as estruturas dos compostos de base dos aromas começaram a ser identificadas mais aromas sintéticos tornaram-se disponíveis (ARMSTRONG & YAMASAKI, 1986). No entanto, apesar de muitos dos constituintes voláteis do aroma já terem sido identificados, muitas das enzimas e genes envolvidos na sua biossíntese não são ainda conhecidos. No entanto, a modificação do aroma por engenharia genética é dependente do conhecimento e da disponibilidade de genes que codificam enzimas de reações principais que influenciam ou desviam as vias de biossíntese voláteis derivados de plantas (SCHWAB *et al.*, 2008).

Uma vez que identificou-se determinada escassez dos voláteis em suas fontes vegetais, muitos dos produtos naturais foram substituídos pelos seus análogos sintéticos, até ao final do século passado (ABBAS & COMEAU, 2003). Entretanto, quando estes ésteres são produzidos por síntese química, não podem ser considerados aromas naturais, sendo, portanto, menos valorizados no mercado que outros ésteres obtidos de fontes naturais (MACEDO & PASTORE, 1997; ABBAS & COMEAU, 2003). A falta previsível do petróleo bruto, que é a fonte de muitos dos aromas artificiais, suscitou recente interesse na compreensão da formação destes compostos e a engenharia da sua biossíntese (SCHWAB *et al.*, 2008).

De acordo com Güvenç *et al.* (2002), a síntese química de ésteres pode ser realizada por diversas maneiras: a reação entre os álcoois e ácidos carboxílicos (esterificação) com a eliminação de água, troca de grupos acilo entre os ésteres e ácidos (acidólise), entre os ésteres e álcoois (alcoólise) ou glicerol (glicerólise) e entre ésteres (transesterificação). Os últimos quatro tipos de reação são denominados interesterificação. Os produtos de esterificação de ácidos graxos de cadeia longa com álcoois de cadeia longa são usados como lubrificantes e plastificantes para máquinas de alta precisão. Os ésteres resultantes da reação de ácidos graxos de cadeia longa com álcoois de cadeia curta são utilizados como aditivos em alimentos, detergentes, cosméticos e produtos farmacêuticos. Os produtos de cadeia curta são importantes aromas e fragrâncias empregados como componentes em alimentos, bebidas, produtos cosméticos e farmacêuticos (GUBICZA *et al.*, 2000).

Segundo Barzca (2011), os ésteres são obtidos a partir da substituição de uma hidroxila (-OH) de um ácido por um radical alcoxíla (-OR). O método mais

comum é a reação reversível de um ácido carboxílico com um álcool, havendo eliminação de água, conforme observa-se na Figura 1.

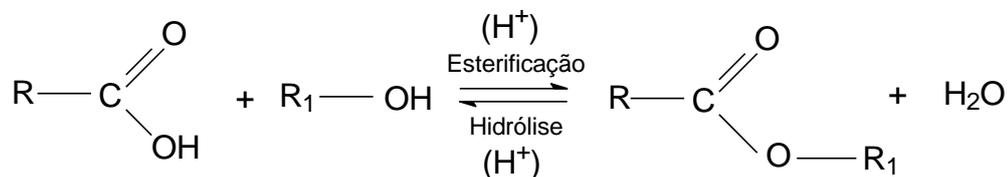


Figura 1: Reação de esterificação (BARZCA, 2011).

Os principais fatores que influenciam a esterificação são o excesso de um dos reagentes e o uso de catalisadores (H_2SO_4 e HCl). Estes aceleram os limites da conversão com aumento do rendimento. A velocidade de formação do éster também depende do ácido orgânico e álcool utilizado, além do aumento da temperatura do meio (BARZCA, 2011).

Os processos de esterificação na indústria ainda são catalisados por ácidos de Brønsted, principalmente ácido sulfúrico. No entanto, as dificuldades na recuperação do catalisador, consumo elevado de energia (já que necessitam de temperaturas de processo de 200 a 250°C), corrosão de equipamentos, pouca seletividade, bem como a necessidade de tratamento de resíduos apresenta desvantagens de catálise ácida (GHAMGUI *et al.*, 2005; OZYILMAZ & GEZER, 2010; RAHMAN *et al.*, 2011; LIMA, 2013). A desidratação dos álcoois também é desvantagem na utilização de ácidos minerais como catalisadores (BARZCA, 2011). Além disso, o uso de catalisadores ácidos minerais fortes, geralmente leva à formação de subprodutos indesejáveis, além de produzirem ésteres opticamente inativos (racematos) (CHIARADIA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2011).

Outro problema encontrado envolve os álcoois e está relacionado com o estérico impedimento e a proximidade das hidroxilas. Quanto mais ramificada é a

cadeia carbônica e mais perto estiverem as hidroxilas no álcool, o processo será mais lento e com menor limite de esterificação, ocasionando um baixo rendimento de processo (BARZCA, 2011).

2.2.2 Métodos biotecnológicos de obtenção de aromas

A biocatálise enzimática é uma tecnologia importante que tem sido amplamente aplicada na biossíntese de produtos químicos valiosos, permitindo a utilização eficaz de baixo custo de materiais naturais e, aumentando seus valores comerciais (DUBAL *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2012).

Com o aumento da conscientização sobre questões ambientais, a produção de ésteres de aroma com o emprego de enzimas ou através de fontes microbianas vêm ganhando importância industrial rapidamente, devido a diversas vantagens que ela oferece em relação às tecnologias convencionais (DUBAL *et al.*, 2008; KRISHNA *et al.*, 2000; HASAN *et al.*, 2006). Nos últimos anos a produção biotecnológica através da aplicação das lipases torna-se mais atraente devido à maior aceitabilidade ecológica quando comparado com a síntese química, ou devido a benefícios econômicos, quando comparados à extração de fontes naturais (SCHRADER *et al.*, 2004; CVJETKO *et al.*, 2012). Embora os processos biotecnológicos ainda sejam mais caros do que os processos químicos, eles têm vantagens ambientais evidentes, uma vez que os ácidos inorgânicos (utilizados como catalisadores na síntese química) são evitados, e as enzimas podem ser reutilizadas, minimizando a geração de resíduos da reação (ROMERO *et al.*, 2007; ARAGÃO *et al.*, 2009).

Os processos biotecnológicos oferecem diversos benefícios comparando-se aos métodos químicos devido à alta eficiência catalítica, condições operacionais brandas (temperaturas e pressões moderadas) e à seletividade dos catalisadores naturais (KRISHNA *et al.*, 2001; SCHRADER *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2007).

O campo de enzimas industriais vem experimentando grandes iniciativas de pesquisa, resultando tanto no desenvolvimento de uma série de novos produtos e na melhoria no desempenho de processos de vários produtos existentes (HASAN *et al.*, 2006). A biotecnologia abre a porta a um importante desenvolvimento no campo das preparações aromáticas, tanto que atualmente a legislação reconhece como naturais as substâncias aromatizantes obtidas por via biotecnológica (LINDEN & LORIENT, 1996; MACEDO & PASTORE, 1997; ABBAS & COMEAU, 2003; GHAMGUI *et al.*, 2005; ROMERO *et al.*, 2007; SALAH *et al.*, 2007; ARAGÃO *et al.*, 2009; MAHAPATRA *et al.*, 2009).

Segundo Castro *et al.* (2004), aproximadamente 50 ésteres formadores de aromas foram sintetizados por reações enzimáticas. Em geral, o processo pode ser realizado em meios reacionais contendo mistura de álcool e ácido carboxílico em presença ou ausência de solventes, resultando em altas produtividades e rendimentos praticamente quantitativos.

Além disso, síntese enzimática de compostos de aroma é mais específica e viável em relação à extração química a partir de vegetais, pois independe da estação, clima e variação geográfica e não requer grandes quantidades de matéria-prima, além de permitir a obtenção de produtos com melhor odor e cor (ARAGÃO *et al.*, 2009; KUMARI *et al.*, 2009; OZYILMAZ & GEZER 2010).

Apesar das inúmeras vantagens da aplicação da biotecnologia para produção de aromas, um fator importante a ser considerado é o custo da própria enzima, que é uma desvantagem para o processo biotecnológico comparado com a síntese química, exigindo, assim, que a enzima seja reutilizada várias vezes, mantendo a sua atividade tanto tempo quanto possível. Várias estratégias podem ser utilizadas para recuperar a atividade enzimática dos sistemas imobilizados após cada ciclo de reação como, por exemplo, lavar a enzima com o solvente, que geralmente é um solvente orgânico, a fim de eliminar qualquer substância adsorvida no suporte (MARTINS *et al.*, 2011).

2.2.2.1 Uso de solventes na esterificação enzimática

A utilização de enzimas em meio aquoso foi extensamente usada em processos catalíticos, por vários anos. Porém, seu uso tornou-se limitado, pelo fato de muitos substratos apresentarem uma solubilidade limitada em solução aquosa, o que demandava grande volume reacional e procedimentos de separação complexos. O uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas superou esse problema e o desenvolvimento de novos métodos de imobilização permitiu que várias reações pudessem se tornar viáveis. A adição de quantidade moderada de solvente orgânico é uma forma direta de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e de tornar a reação possível, além de melhorar a estabilidade térmica da enzima (GUBICZA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2004; BEZBRADICA *et al.*, 2007).

A utilização de solventes orgânicos para as reações enzimáticas proporciona inúmeras vantagens industrialmente atraentes em comparação com os sistemas de reação aquosos tradicionais, tais como a melhoria da solubilidade dos substratos, a

reversão do equilíbrio termodinâmico, a supressão de reações dependentes de água e para a proteção contra a contaminação microbiana (ŽNIDARŠIČ-PLAZL & PLAZL, 2009; LERIN *et al.*, 2011). Segundo Gomes *et al.* (2004), uma das principais vantagens da catálise em meio orgânico é a possibilidade de deslocar o equilíbrio termodinâmico de reações que seriam impossíveis em meio aquoso, pela extração dos substratos e/ou produtos para a fase aquosa e/ou orgânica ou pela diminuição da quantidade de água do meio reacional. Desta forma, reações como a esterificação e as interesterificações tornam-se viáveis industrialmente. Entretanto, de acordo com Güvenç *et al.* (2002), alguns solventes orgânicos utilizados possuem custo muito alto para permitir viabilidade na produção em escala industrial.

Muitos trabalhos foram realizados por diferentes lipases comerciais, tais como *Candida antarctica*, *Rhizomucor meihei*, *Aspergillus sp.*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor Meihei* e *Thermomyces lanuginosus* em solventes (AZUDIN *et al.*, 2013). Apesar dos melhores rendimentos em reações com solvente orgânico, a toxicidade do solvente continua a ser um problema para muitas aplicações (GÜVENÇ *et al.*, 2002; AZUDIN *et al.*, 2013).

A utilização de solventes orgânicos limita muitas aplicações, e entre as principais desvantagens encontradas, segundo diversos autores (KARRA-CHÂABOUNI *et al.* 2006; BEZBRADICA *et al.*, 2007; SALAH *et al.*, 2007; KUMARI *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2013), estão: a toxicidade, a inflamabilidade dos solventes e investimentos mais elevados para separação e purificação dos produtos. Essas características fazem com que a aplicação destes solventes seja acompanhada por alguns riscos e dificuldades no manuseio, armazenamento e transporte de grandes quantidades (EDRIS & MALONE, 2011).

Além disso, outras dificuldades no uso de solvente orgânico podem ser citadas, tais como a inativação das enzimas, trabalho e preparação intensiva, custo de biocatalisadores em forma de sistemas covalentemente modificados, as limitações de transferência de massa no caso de sistemas heterogêneos ou de solventes viscosos e controle de atividade de água necessário para os processos que envolvem reações de condensação (LERIN *et al.*, 2011).

O uso deste tipo de solventes também pode ter algumas desvantagens associadas com os custos de separação e a presença de substâncias residuais nocivas para o produto final, prejudiciais para saúde humana (PAROUL *et al.*, 2010). Torna-se fundamental a eficiência da remoção do solvente a partir dos produtos, até mesmo porque os níveis finais de solvente residual devem ser muito baixos (por exemplo, 0,5-50 ppm) para se obter um produto final considerado "natural" (ARMSTRONG & YAMASAKI, 1986).

Os meios de reação mais utilizados na síntese enzimática ainda são solventes orgânicos, tais como o hexano ou heptano, apesar de meio supercrítico, líquidos iônicos e sistemas sem solventes também tenham sido explorados (ROMERO *et al.* 2007; ARAGÃO *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2011). Segundo Paroul *et al.* (2010), quando os substratos sozinhos promovem uma homogeneidade suficiente para o sistema de reação, em termos de área interfacial para manter a eficiência do biocatalisador, especialmente para as lipases que atuam na interface, sistemas livres de solventes são um meio interessante para este tipo de reação.

As principais vantagens de um sistema isento de solventes são de que a ausência de solventes facilita o processamento, uma vez que menos componentes estariam presentes no fim da reação, além disso, a eliminação de solventes na produção oferece economias de custo significativas e minimiza o impacto ambiental

pela toxicidade do solvente. Além disso, com o uso de sistemas isentos de solventes, é possível a utilização de altas concentrações de substrato, para obtenção de concentrações elevadas de produtos (GÜVENÇ *et al.*, 2002; KUMARI *et al.*, 2009; AZUDIN *et al.*, 2013).

Outras vantagens de reações no sistema livre de solvente são economias em projeto de reatores no processo em grande escala. Portanto, os estudos sobre a síntese de ésteres em sistemas isentos de solventes são mais freqüentes durante a última década (BEZBRADICA *et al.*, 2007).

2.2.2.2 Produção de acetato de isoamila via catálise enzimática

Diversas pesquisas são apresentadas na literatura abordando a síntese enzimática de acetato de isoamila, e podem ser resumidas em alguns estudos citados a seguir.

Torres *et al.* (2009) investigaram a produção desse éster utilizando enzima obtida de *Bacillus licheniformis* (4.6×10^{-5} mg.ml⁻¹), a partir de álcool isoamílico e acetato de p-nitrofenilo em n-hexano. Nessas condições, foi obtida uma de 42,8%, após 24 horas de reação a 28°C.

Romero *et al.* (2007) obtiveram conversões de aproximadamente 100% de acetato de isoamila utilizando álcool isoamílico e anidrido acético como substrato e lipase de *Candida antarctica* (13,8 g/mol de substrato) após 3 horas de reação. O grupo utilizou hexano com o solvente e temperatura de 40°C.

Cvjetko *et al.* (2012) alcançaram até 92% de rendimento de acetato de isoamila em 15 minutos de reação, utilizando anidrido acético e álcool isoamílico

(1:3) como substrato, utilizando lipase de *Candida antarctica* em líquido iônico em micro-reator de fluxo contínuo a 55°C.

Entretanto, há poucos relatos na literatura sobre a produção de acetato de isoamila via catálise enzimática em sistemas livres de solventes. A seguir são destacados alguns estudos de relevância na área.

Güvenç *et al.* (2002) investigaram a produção de acetato de isoamila utilizando duas lipases comerciais imobilizadas, *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica* via esterificação de ácido acético com álcool isoamílico num sistema livre de solventes. Os resultados obtidos demonstraram a maior eficiência catalítica da lipase Novozym 435 quando comparada com a lipase RM Lipozyme IM chegando a conversões 8,3 vezes superiores para a Novozym. A conversão máxima (80%) foi obtida para razão molar ácido/álcool 1:2, concentração de enzima 5% (m/m substratos), temperatura 30°C, agitação 150rpm e tempo de reação 6 horas. Inibição da enzima pelo ácido acético ocorreu acima da concentração crítica de ácido acético 3,6M.

Kumari *et al* (2009), estudou a produção de acetato de isoamila em meio livre de solvente, com lipase de *Rhizopus oryzae* utilizando álcool isoamílico e acetato de vinila como substrato. Após 8 horas de reação a uma temperatura de 40°, foi alcançada uma taxa de 95% de conversão.

Ghamgui *et al.* (2005), utilizou uma lipase não-comercial de *Staphylococcus simulans* para catalisar a esterificação entre ácido acético e álcool isoamílico para produção de acetato de isoamila em sistema livre de solvente. A conversão máxima obtida foi de 64%, com 8 horas de reação, adição inicial de água de 10% e razão molar ácido/álcool 1:2.

Entretanto, apesar de excelentes resultados de conversão em alguns dos estudos citados, sistemas reacionais com solventes orgânicos, altas concentrações de enzimas ou longo tempo de reação podem inviabilizar a produção deste aromatizante em escala industrial, conforme citado anteriormente.

2.3 ENZIMAS

De acordo com Dewanet *et al.* (2014), o mercado mundial de enzimas industriais foi de quase US\$ 4,5 bilhões em 2012 e cerca de US\$ 4,8 bilhões em 2013. O mercado deve chegar a cerca de 7,1 bilhões de dólares em 2018, com uma taxa de crescimento anual de 8,2% de 2013 a 2018.

Com um mercado crescente e promissor, a maior parte da produção de enzimas ainda é destinada às indústrias de detergente e amido (CASTRO *et al.*, 2004). Entretanto, a utilização de enzimas para melhorar os processos químicos tradicionais de fabricação de alimentos tem sido desenvolvida nos últimos anos (RODRIGUEZ-NOGALES *et al.*, 2005).

Quimicamente, as enzimas são proteínas com uma estrutura química especial, contendo um centro ativo, denominado apoenzima e algumas vezes um grupo não protéico, denominado coenzima (BOBBIO & BOBBIO, 2003).

As enzimas são substâncias sólidas, mas difíceis de serem cristalizadas devido à complexidade de suas estruturas químicas. Com algumas exceções, são solúveis em água e álcool diluído, e quando em solução são precipitadas pela adição de sulfato de amônio, álcool ou ácido tricloroacético. São inativadas pelo calor e esta, talvez, seja uma das propriedades mais importantes desses compostos (BOBBIO & BOBBIO, 2003).

Enzimas são consideradas como catalisadores da natureza (HASAN *et al.*, 2006). Os catalisadores são agentes que aceleram a velocidade das reações sem sofrer nenhuma modificação química. Exercem essa função porque reduzem a barreira energética que é necessária superar para transformar um reagente em um produto (DAMODARAN *et al.*, 2008).

São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica. Mais de 3.000 diferentes enzimas têm sido identificadas e muitas isoladas em sua forma pura (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

De acordo com Bobbio & Bobbio (2003), existe uma correlação estreita entre a estrutura das proteínas ou peptídios que fazem parte da molécula enzimática, e suas propriedades biológicas e essa propriedade leva a uma especificidade extraordinariamente alta. Provavelmente apenas uma fração da molécula, denominada sítio ativo, é a responsável pela ligação da enzima ao substrato ou substratos, e essa fração determinaria a especificidade enzimática.

Segundo Dalla-Vecchia *et al.* (2004), as enzimas hidrolíticas (proteases, celulasas, amilases e lipases) são as mais freqüentemente usadas na química orgânica. Entre as várias razões que as tornam uma opção particularmente atrativa, pode-se citar ampla disponibilidade, baixo custo, condições suaves de síntese, facilidade de uso porque não necessitam cofatores e ampla especificidade para substratos. Aplicações analíticas também têm se beneficiado das reações enzimáticas em meio orgânico.

Enzimas lipolíticas estão atraindo uma enorme atenção por causa de seu potencial biotecnológico. Eles constituem o grupo mais importante de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas (LIMA, 2013). A produção de alto nível, das lipases microbianas requer não apenas a superexpressão eficiente dos

genes correspondentes, mas também um entendimento detalhado dos mecanismos moleculares que regulam a sua dobragem e secreção. A otimização das propriedades das lipases industrialmente relevantes pode ser conseguida por evolução dirigida (HASAN *et al.*, 2006).

Dessa forma, o interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente, nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. As razões do enorme potencial biotecnológico das enzimas incluem fatos relacionados com: i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; ii) não requerem a presença de co-fatores; iii) possuem uma larga especificidade pelo substrato e, iv) exibem uma alta enantiosseletividade (CASTRO *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2005).

O termo biotransformação pode ser aplicado para modificações específicas ou interconversões na estrutura química, realizadas por enzimas presentes nas células ou na forma isolada. A biotransformação difere da fermentação, na qual o substrato é convertido a produtos através de um caminho metabólico bastante complexo na célula. As enzimas podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em microrganismos. Entretanto, quando a permeabilidade da membrana celular é insuficiente para a passagem do substrato ou quando ocorrem reações laterais indesejáveis, é necessário conduzir a biotransformação com enzimas isoladas ou purificadas (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

A biocatálise é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microrganismos, de plantas ou células animais representam os métodos tradicionais

de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial (CARVALHO *et al.*, 2005; DUBAL *et al.*, 2008).

A aplicação de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, devido à alta eficiência catalítica em comparação com os catalisadores convencionais (podem elevar a velocidade de uma reação de 10^8 a 10^{12} vezes), seletividade, atuação em condições brandas de temperatura (30 a 70°C) e em pressão atmosférica (CASTRO *et al.*, 2004; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2005; RAJENDAN *et al.*, 2009).

De acordo com Okumura *et al.* (1979), as enzimas podem ser utilizadas na biotransformação, para a síntese de substâncias aromatizantes quimicamente definidas, tais como os ésteres, lactonas, terpenos, pirazinas, aldeídos, ácidos aminados e nucleótidos. Cerca de 100 produtos químicos aromáticos no mercado já são produzidos por processos enzimáticos ou microbianos, incluindo microrganismos geneticamente modificados (SCHWAB *et al.*, 2008).

Estudos relatam que as enzimas microbianas são muitas vezes mais úteis do que as enzimas derivadas de plantas ou animais por causa da grande variedade de atividade catalítica disponível, dos rendimentos elevados possíveis, facilidade de manipulação genética, fornecimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e rápido crescimento de microrganismos em meios de baixo custo. Enzimas microbianas também são mais estáveis do que suas correspondentes enzimas de plantas e de animais e a sua produção é mais conveniente e mais segura. Apenas cerca de 2% de microrganismos mundiais foram testados como fontes de enzimas. Cepas bacterianas são geralmente mais utilizadas por oferecerem atividades mais elevadas em comparação com leveduras e tendem a ter pH ótimo neutro ou alcalino e muitas vezes são termoestáveis (HASAN *et al.*, 2006).

A utilização de tecnologia genética e de novas tecnologias de produção fizeram enzimas industriais com propriedades melhoradas ou um melhor custo. Os benefícios para os clientes são consideráveis: redução de custos no processo, melhoria da qualidade do produto, e na maioria dos casos, também um impacto significativamente reduzido no ambiente. As tecnologias aplicadas na produção de enzimas permitiu a obtenção de uma maior eficiência e elevada pureza do produto, e também enzimas com estabilidade a atividade melhoradas (HASAN *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos. O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; KARRA-CHÂABOUNI *et al.*, 2006; KUMARI *et al.*, 2009). A imobilização de enzimas também permite a facilidade de aplicação tanto em sistemas contínuos ou em bateladas (YAHYA *et al.*, 1998; OZYILMAZ & GEZER, 2010).

Materiais de suporte com uma elevada resistência mecânica são particularmente desejáveis em sistemas agitados. A presença de solventes pode exigir materiais de apoio com elevada resistência química. Vários microrganismos crescem facilmente em muitos dos substratos catalisados por lipases exigindo

suportes resistentes à microrganismos. Os suportes devem permitir a utilização eficaz da enzima, estando elas acessíveis aos substratos (YAHYA *et al.*, 1998).

2.3.1 Lipases

Muitas enzimas microbianas foram imobilizadas e um número de estudos relacionados com as vantagens da utilização de lipases imobilizadas como biocatalisadores têm sido relatados (ABBAS & COMEAU, 2003; SHARMA *et al.*, 2011).

O uso comercial de lipases é um negócio de bilhões de dólares, que inclui uma grande variedade de diferentes aplicações. As lipases têm recebido maior atenção recentemente, evidenciada pelo aumento da quantidade de informações sobre lipases na literatura atual, principalmente no seu papel na patogênese e sua crescente utilização em aplicações biotecnológicas (HASAN *et al.*, 2006). Embora atualmente, as aplicações industriais das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes, novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel e no tratamento de resíduos industriais. As lipases vêm deste modo, conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas para a utilização no setor industrial (CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) (CASTRO *et al.*, 2004). Possuem alta versatilidade e realizam uma série de reações de bioconversão (GULATI *et al.*, 1999; RODRIGUEZ-NOGALES *et al.*, 2005).

As lipases têm um importante papel devido ao fato de serem disponíveis comercialmente, obtidas a partir de diferentes fontes, serem seletivas em relação aos seus substratos e também catalisadores muito eficientes mesmo sob condições brandas de operação, evitando alterações indesejáveis (CARVALHO *et al.*, 2003).

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (LIMA, 2013). Inicialmente, eram obtidas a partir de pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. Em função do baixo rendimento do processo fermentativo, as lipases microbianas tinham também um custo bem mais elevado quando comparado com outras hidrolases, como proteases e carboxilases. Entretanto, os recentes avanços registrados na tecnologia do DNA têm permitido aos fabricantes de enzimas colocar no mercado lipases microbianas com atividade elevada, a um custo bem mais acessível. Estima-se que comercialmente estão disponíveis lipases de mais 34 diferentes fontes, incluindo 18 a partir de fungos e 7 de bactérias (CASTRO *et al.*, 2004; SHARMA *et al.*, 2011).

A maioria das lipases de uso industrial corrente são de origem microbiana e são produzidas em fermentações aeróbicas submersas convencionais, o que permite um maior controle sobre as condições de crescimento do que as fermentações em estado sólido (HASAN *et al.*, 2006). As lipases microbianas, não são nocivas a saúde humana, sendo reconhecidas como *Generally Regarded as Safe* (GRAS). Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação. Os trabalhos relatados em literatura sobre lipases fúngicas são numerosos, sendo que os mais extensivamente estudados são os fungos *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus*

oryzae, *Rhizopus delemar* e *Penicillium cyclopium* (CARVALHO *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2011), sendo conhecidas também as estruturas de lipases de *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas glumae*, *Candida rugosa* (anteriormente *C. cylindraceae*), *Candida antarctica*, *Chromobacterium viscosum*, pâncreas de cavalo, pâncreas humano e pâncreas bovino (YAHYA *et al.*, 1998; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa (YAHYA *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 2004). Algumas lipases demonstraram estabilidade considerável ao longo de uma ampla gama de valores de pH. Normalmente elas são ativas em pH entre 6,5 e 7,0 podendo chegar a 8,0 (RAJEANDRAN *et al.*, 2009). As lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (CASTRO *et al.*, 2004). No entanto, de acordo com Hasan *et al.* (2006), quando lipases imobilizadas são utilizadas em condições normais "industriais", temperaturas tão elevadas quanto 70°C são possíveis por períodos prolongados (GULATI *et al.*, 1999).

As lipases também possuem propriedades características tais como a especificidade do substrato, a estereoespecificidade, a regiospecificidade e a capacidade de catalisar reações heterogêneas na interface de sistemas solúveis em água e insolúveis em água e em solventes orgânicos (GULATI *et al.*, 1999; RAJEANDRAN *et al.*, 2009). Além disso, as lipases, não requerem cofatores (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; YAHYA *et al.*, 1998; ARAGÃO *et al.*, 2009).

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. As lipases são divididas em 3 grupos baseados em sua especificidade. Lipases não específicas (ex: produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas* sp.), quebram as moléculas de acilglicerol na posição randômica, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior (CASTRO *et al.*, 2004).

Também merece referência a estereoespecificidade, ou seja, a capacidade que algumas lipases possuem de discriminar os enantiômeros de uma mistura racêmica. A especificidade estrutural ou regiosseletividade é decorrente da orientação imposta pelas dimensões e pela estrutura do centro ativo à ligação do substrato. Estas restrições levam à distinção e à transformação seletiva de funções quimicamente similares na mesma molécula. A seletividade e a estereoquímica advém da própria quiralidade da enzima, ou seja, de sua simetria estrutural, que limita a ação em substratos que não satisfaçam determinadas relações espaciais. Desse modo, a catálise enzimática permite transferir ou criar centros quirais nas moléculas, assim como distinguir formas enantiômeras. Lipase tem sido empregada para resolução de racematos, resultando em rendimentos elevados, para obtenção de ésteres, álcoois e ácidos opticamente puros (CASTRO *et al.*, 2004, DUBAL *et al.*, 2008).

2.3.1.1 Reações catalisadas por lipases

As lipases são biocatalisadores muito importantes que vêm sendo utilizados para catalisar uma série de reações de grande valor sintético (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Lipases atuam sobre as ligações éster de triacilgliceróis, com a posterior liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (LERIN *et al.*, 2011). A diferenciação entre uma lipase e uma esterase (EC. 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

As lipases também são capazes de catalisar reações reversíveis (esterificação, transesterificação e interesterificação), desde que o meio aquoso seja substituído por um solvente orgânico ou um meio aquoso/orgânico bifásico (GOMES *et al.*, 2004; HASAN *et al.*, 2006; RAJEANDRAN *et al.*, 2009; OZYILMAZ & GEZER, 2010; LERIN *et al.*, 2011). Os substratos de baixo peso molecular parecem ter menos afinidade para estas enzimas que substratos de cadeia longa, uma vez que estas moléculas são encontradas para exercer efeitos inibitórios sobre a enzima (ABBAS & COMEAU, 2003).

Em particular, o potencial de aplicação destas enzimas para a síntese de ésteres de cadeia curta tem atraído o interesse de uma ampla gama de campos industriais (GÜVENÇ *et al.*, 2002; TORRES *et al.*, 2009).

Diversos trabalhos de pesquisa estão sendo realizados, visando a otimização e o desenvolvimento de processos em escala industrial para a síntese de diversos ésteres de valor comercial (CASTRO *et al.*, 2004).

Entre as enzimas, a lipase *Candida antarctica* B (CALB) mostrou uma alta atividade catalítica para a esterificação de ácidos carboxílicos. A CALB é um catalisador versátil para uma ampla gama de reações orgânicas. Sua alta atividade, estabilidade térmica, seletividade e especificidade em comparação com outras lipases conhecidas a tornam especial para aplicações exclusivas (RAHMAN *et al.*, 2011).

Industrialmente, a esterificação empregando a enzima lipase foi comercializada pela Unichema International para a produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de pureza e qualidade, como o isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilexilpalmitato, que são ingredientes empregados na formulação de cremes cosméticos e outros produtos de higiene. O processo permite a recuperação da preparação enzimática e sua reutilização em bateladas subsequentes (GOMES *et al.*, 2004).

Desde que lipases são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, é necessário estudar o seu desempenho durante a reação de esterificação. O controle preciso da concentração da lipase, álcool e/ou concentração do ácido, temperatura e tempo de reação é necessária para maximizar a produção de ésteres de aroma (RODRIGUEZ-NOGALES *et al.*, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental realizada no âmbito deste trabalho relacionado ao estudo da otimização da síntese enzimática de acetato de isoamila em sistema livre de solvente. Todos os experimentos foram realizados nos laboratórios do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI Erechim.

3.1 MATERIAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados álcool isoamílico e ácido acético (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) como substratos para as reações de esterificação, sem qualquer pré-tratamento. Peneiras moleculares de 4 Å foram adquiridas da Sigma-Aldrich (EUA). A lipase comercial utilizada neste trabalho foi a Novozym 435 de *Candida antarctica*, imobilizada em resina aniônica macroporosa, adquirida da Novozymes, Brasil (Araucária, PR, Brasil).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Reação de esterificação

A síntese de acetato de isoamila foi realizada a partir da preparação de 25mL de mistura reacional de álcool isoamílico e ácido acético, nas razões molares determinadas no delineamento experimental (Tabela 1), em Erlenmeyers de 50 mL. Após a dissolução completa dos substratos, foram adicionadas as peneiras

moleculares (2% em peso de substrato) e enzima à mistura conforme tabela 1, sendo que o tempo reacional foi contado a partir da adição das mesmas. Todos os experimentos foram realizados em agitador orbital a uma agitação constante de 150 rpm durante 6 horas a 30°C. Os parâmetros de temperatura e agitação foram determinados a partir de testes preliminares e foram fixos em todos os ensaios.

Após a conclusão do tempo de reação, o biocatalisador foi filtrado e as amostras foram mantidas a 5°C para posterior determinação de conversão da reação.

3.2.2 Determinação da conversão da reação

A produção de acetato de isoamila foi quantificada em um cromatógrafo a gás (GC-2010, Shimadzu Scientific Instruments, EUA), equipado com processador de dados, usando uma coluna capilar RTX-WAX Restek (30 m de comprimento × 250 µm i.d. × 0,25 µm de espessura), detector de ionização de chama, com a seguinte programação de temperatura: 40°C (5 min.); 40-180°C (10 min.), 180°C (5 min.); temperatura do injetor 250°C, detector a 275°C, modo de injeção split, razão de split 50:1. H₂ (56 kPa) foi usado como gás de arraste e um volume de 0,4 µL de amostra diluída em diclorometano (1:10) foi injetado. A conversão da reação foi calculada com base na redução da área de reagente limitante com base na estequiometria da reação. A formação do produto foi confirmada comparando o tempo de retenção do mesmo com padrão autêntico de acetato isoamila.

3.2.3 Otimização da produção de acetato de isoamila

Para determinar as condições experimentais que otimizam a síntese de acetato de isoamila, um Delineamento Composto Central Rotacional 2² (DCCR) foi realizado. Onze ensaios foram realizados, variando a razão molar de álcool/ácido (0,18:1 a 5,8:1) e concentração de enzima (3 a 17% em peso). Os intervalos estudados para cada variável são apresentados na Tabela 1. O planejamento foi executado em triplicata no ponto central para avaliar o erro associado com o processo. O software Statistica® 8.0 (Statsoft Inc.,EUA) foi utilizado para auxiliar na elaboração e análise estatística dos dados experimentais, adotando-se em todos os casos estudados um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 1: Variáveis e níveis do DCCR 2² para produção enzimática de acetato de isoamila.

Variáveis/Níveis	Razão Molar (mol/mol) (álcool/ácido)	[E] (%m/m substratos)
-1,41	0,18:1	3
-1	1:1	5
0	3:1	10
1	5:1	15
1,41	5,8:1	17

3.2.4 Avaliação cinética da produção enzimática de acetato de isoamila

O estudo cinético da reação foi realizado na condição otimizada definida anteriormente: razão molar ácido/álcool de 1:5, concentração da enzima de 15% (em peso do substrato) e temperatura de 30°C. Pode ser importante enfatizar que os

experimentos foram destrutivos e sem amostragem, nos tempos de 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5 e 6 horas.

3.2.5 Ciclos de reúso da enzima

Para a determinação dos ciclos de reúso da Novozym 435, as reações foram realizadas em *shaker* com agitação constante de 150 rpm, temperatura de 30°C, razão molar dos substratos de 1:5 (ácido/álcool), concentração de enzima de 15% (em peso do substrato), tempo de reação de 4 horas e 2% (em peso do substrato) de peneiras moleculares. Após o término da reação a enzima foi recuperada para ser reutilizada num novo ciclo, sem qualquer tratamento. A conversão da reação foi determinada no fim de cada ciclo de utilização.

3.2.6. Efeito das peneiras moleculares

Para determinação do efeito das peneiras moleculares na reação, realizou-se os ensaios na condição otimizada (150 rpm, 30°C, razão molar 1:5 (ácido/álcool), 15% e 4 horas de reação) utilizando-se as seguintes proporções de peneiras moleculares: 0%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5% em relação ao peso de substratos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ACETATO DE ISOAMILA

A Tabela 2 apresenta a matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 completo (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em acetato de isoamila.

Tabela 2: Matriz do delineamento experimental (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em acetato de isoamila, a 30°C, 150 rpm e 6 h.

Ensaio	Razão molar ácido/álcool	Concentração de enzima (m/m %)	Conversão (%)
1	-1(1:1)	-1(5)	15,14
2	1(1:5)	-1(5)	78,77
3	-1(1:1)	1(15)	17,27
4	1(1:5)	1(15)	93,11
5	-1,41(1:0,18)	0(10)	24,97
6	1,41(1:5,8)	0(10)	87,22
7	0(1:3)	-1,41(3)	18,33
8	0(1:3)	1,41(17)	93,39
9	0(1:3)	0(10)	72,64
10	0(1:3)	0(10)	72,90
11	0(1:3)	0(10)	78,70

Uma análise preliminar desta tabela permite-nos verificar que a condição experimental em relação à concentração mais elevada de enzima e um excesso de álcool (experimentos 4 e 8) proporcionaram a maior produção de acetato de isoamila (~93%). Relacionado com a razão molar de ácido e álcool, a literatura salienta que um excesso de álcool pode afetar positivamente o processo de conversão (YEE *et al.*, 1997; BARTLING *et al.*, 2001; CHIARADIA *et al.*, 2012; AZUDIN *et al.*, 2013). De

uma maneira geral, as conversões mais elevadas foram atingidas com concentrações de enzima elevadas.

Os resultados obtidos no delineamento experimental foram analisados estatisticamente e os efeitos das variáveis independentes estão apresentados na forma de Gráfico de Pareto (Figura 2.).

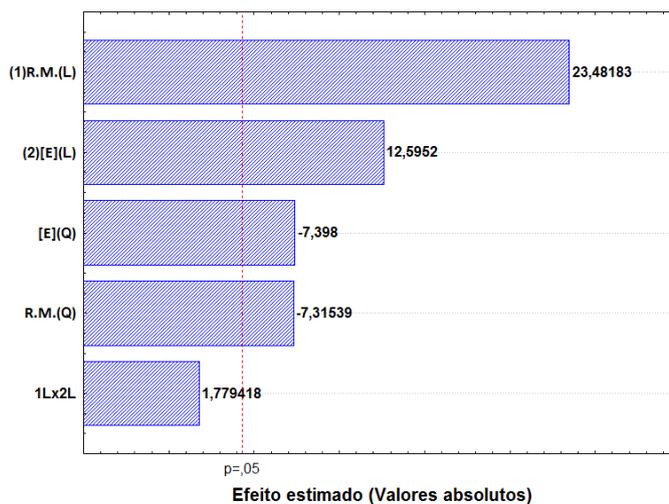


Figura 2: Gráfico de Pareto da produção de acetato de isoamila (6 horas de reação 30°C).

Observou-se que após 6 horas de reação, a concentração da enzima (E) e a razão molar dos substratos (RM) apresentaram efeitos significativos positivos ($p < 0,05$) sobre a conversão da reação, o que significa que os maiores níveis destas variáveis conduzem as maiores conversões (Figura 2).

A Análise de variância dos resultados do planejamento experimental está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Análise de variância para produção de acetato de isoamila no segundo planejamento experimental.

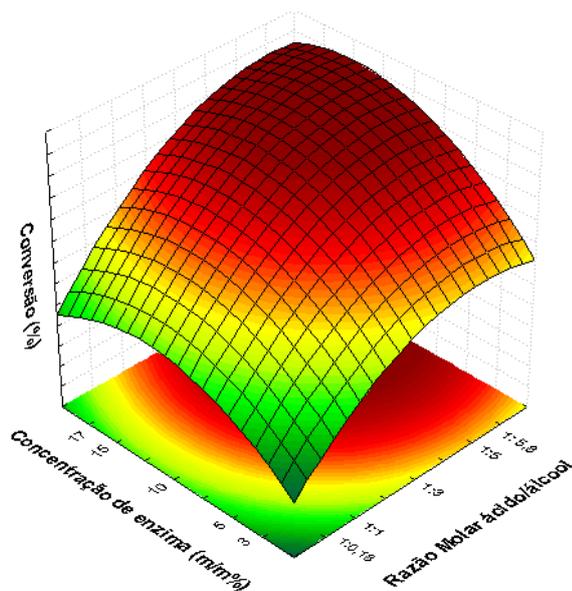
	SQ	GL	QM	F calc.	p-valor
Regressão	9377,962	5	1875,59	6,70	0,028
Resíduo	1398,943	5	279,78		
Falta de ajuste	1375,42	3			
Erro puro	23,52	2			
Total	10776,90	10			

F tab= 5,05

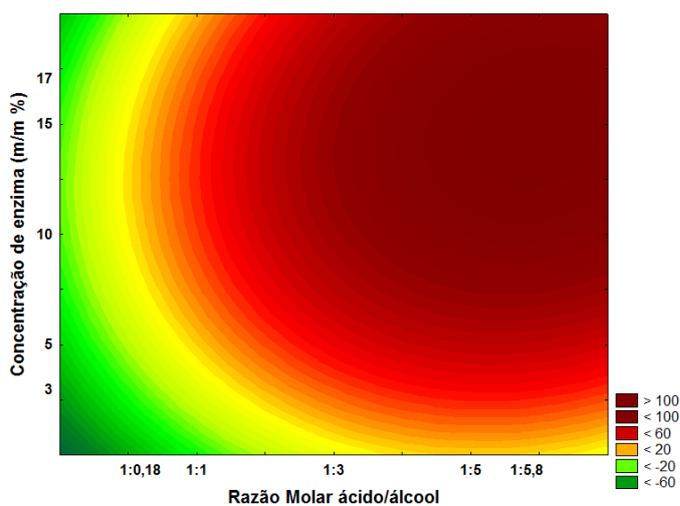
O coeficiente de correlação obtido (0,87) e o teste F (F calculado maior que F tabelado) validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,95$) e permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno, apresentados na Figura 3.

Como pode ser observado na Figura 3, nas maiores concentrações de enzima e razões molares foram encontradas as maiores conversões.

Güvenç *et al.* (2002), investigaram a produção de acetato de isoamila por duas lipases comerciais imobilizadas utilizando ácido acético e álcool isoamílico como substratos num sistema isento de solvente. A conversão mais elevada (80%) foi obtida por Novozym 435, com razão molar de substratos de 1:2 (ácido:álcool), concentração de enzima de 5% em peso (com base na massa total de substratos), temperatura de 30°C, 150 rpm e 6 horas de reação. Comparativamente, a conversão de acetato de isoamila obtida no presente estudo foi superior, entretanto, os resultados confirmam a tendência observada de quanto maior a razão molar ácido/álcool maiores níveis de conversão são obtidos.



(a)



(b)

Figura 3: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para produção de acetato de isoamila em função da concentração de enzima e razão molar.

Os resultados obtidos no planejamento experimental permitiram a obtenção de um modelo empírico codificado para a conversão enzimática de acetato de isoamila em função da razão molar e concentração de enzima, o qual está apresentado na Equação 1.

$$\text{Convers\~{a}o (\%)} = 74,80 + 28,61 * RM - 10,70 * RM^2 + 15,34 * E - 10,82 * E^2$$

(1)

Onde:

RM = raz\~{a}o molar entre \c{a}cido ac\~{e}tico e \c{a}lcool isoam\~{i}lico

[E] = concentra\~{c}\~{a}o de enzima (%) m/m substratos

Em estudo realizado por F\~{e}her *et al.* (2008) o excesso de \c{a}lcool tamb\~{e}m apresentou uma influ\~{e}ncia positiva significativa sobre a taxa de rea\~{c}\~{a}o e rendimento final, para a produ\~{c}\~{a}o enzim\c{a}tica bif\c{a}sica de acetato de isoamila em l\~{i}quido i\~{o}nico como solvente.

Krishna *et al.* (2000), obtiveram convers\~{o}es de 95% de acetato de isoamila utilizando 34% em peso de Lipozyme RM IM como catalisador, heptano como solvente e a concentra\~{c}\~{a}o equimolar de substratos (0,06 M) a 40°C em 72 horas. O mesmo grupo (KRISHNA *et al.*, 2001) obteve a convers\~{a}o de 80%, utilizando o mesmo sistema catalisador em heptano na propor\~{c}\~{a}o molar de substratos de 8:1 e 72 horas de rea\~{c}\~{a}o.

Resultados semelhantes foram obtidos por Azudin *et al.* (2013). O acetato de isoamila foi produzido utilizando-se lipase de *Candida antarctica* (CALB) por meio de rea\~{c}\~{a}o de esterifica\~{c}\~{a}o entre o anidrido ac\~{e}tico e \c{a}lcool isoam\~{i}lico num sistema isento de solvente. Os par\~{a}metros estudados foram raz\~{a}o molar \c{a}cido-\c{a}lcool (0,1-2), tempo de rea\~{c}\~{a}o (2-6 horas), temperatura (30-50°C) e concentra\~{c}\~{a}o de enzima (4-12% em peso). A m\c{a}xima produ\~{c}\~{a}o de acetato de isoamila (41,6 vezes) foi alcan\~{c}ada com raz\~{a}o molar \c{a}cido/\c{a}lcool 2, a concentra\~{c}\~{a}o de enzima de 5,78% em peso, 3 horas e temperatura de rea\~{c}\~{a}o de 44°C. Altas convers\~{o}es de acetato

isoamila foram alcançadas por estes autores, no entanto, a utilização de anidrido acético como agente doador de acila pode tornar o processo economicamente inviável além de produzir ácido acético como produto secundário da reação.

O Quadro 2 apresenta relatos da produção de acetato de isoamila apresentados na literatura, em diferentes condições de reação.

Quadro 2: Condições ótimas de produção de acetato de isoamila obtidas por diversos autores

Lipases obtidas de/ Concentração	Razão molar (ácido/álcool)	Solvente	Tempo	Temperatura	Conversão	Referência
<i>Candida antarctica</i> 5,78% m/m substrato	Equimolar	Isento	3h	44°C	41.6 vezes	Azudin <i>et al.</i> , 2013.
<i>Candida antarctica</i> / micro-reator de fluxo contínuo (70mg)	1:3 anidrido acético/ álcool isoamílico	Líquido iônico	15 min.	55°C	92%	Cvjetko <i>et al.</i> , 2012.
<i>Staphylococcus simulans</i> / 60UI	Equimolar	Isento	8h	37°C	64%	Ghamgui <i>et al.</i> , 2005.
<i>Candida antarctica</i> / 5% m/m substrato	1:2	Isento	6h	30°C	80%	Guvenc <i>et al.</i> , 2002.
<i>Candida antarctica</i> 12% m/m substrato	Equimolar	Isento	8h	30°C	75%	Guvenc <i>et al.</i> , 2007.
<i>Mucor miehei</i> 34%	Equimolar	Heptano	72h	40°C	95%	Krishna <i>et al.</i> , 2000.
<i>Rhizomucor miehei</i> 10g.L ⁻¹	1:8	Heptano	72h	40°C	~80%	Krishna <i>et al.</i> , 2001.
<i>Rhizopus oryzae</i> 16%	Equimolar	Isento	8h	40°C	95%	Kumari <i>et al.</i> , 2009.
<i>Candida antarctica</i> 13,8 g/mol de substrato	Equimolar	Hexano	3h	40°C	~100%	Romero <i>et al.</i> , 2007
Pâncreas de porco (LPP)	1:2	Heptano	5h	30°C	77,1 ± 1,2%	Silva <i>et al.</i> , 2013.
<i>Bacillus licheniformis</i> (4.6x10 ⁻⁵ mg.ml ⁻¹)	Não informado	Hexano	24h	28°C	42,8%	Torres <i>et al.</i> , 2009.

Segundo Güvenç *et al.* (2002), a utilização de ácido acético como um doador de acila na transesterificação e reações de esterificação diretas foram anteriormente estudadas com pouco ou nenhum sucesso. O ácido acético tem um efeito inibitório sobre a maioria das lipases, uma vez que tem pouca afinidade com ácidos de dois carbonos, além da redução de pH ocasionada pelo mesmo.

Reações de síntese de ésteres fazem uso da lei de ação de massas conduzindo o equilíbrio no sentido da síntese, quando a água gerada durante a reação é removida. Estas reações ocorrem em baixa atividade de água. Em estudo realizado por Rajeandran *et al.* (2009), o rendimento ótimo da esterificação foi obtido determinando a razão molar de substrato e a concentração de enzima ótimos. Os efeitos inibidores dos ácidos foram fortemente atenuados através da redução da quantidade de ácido e aumentando a quantidade de enzima nos meios de reação. O desempenho de esterificação foi dependente da estrutura do álcool, com a atividade máxima observada para o álcool primário. Álcoois secundários e terciários diminuíram as taxas de reação em mais de 40%. A síntese de éster pode ser maximizada para os substratos que contêm o excesso de doadores de acila.

4.2 AVALIAÇÃO CINÉTICA DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

A Figura 4 apresenta a avaliação da cinética da produção de acetato de isoamila na condição experimental otimizada previamente determinada.

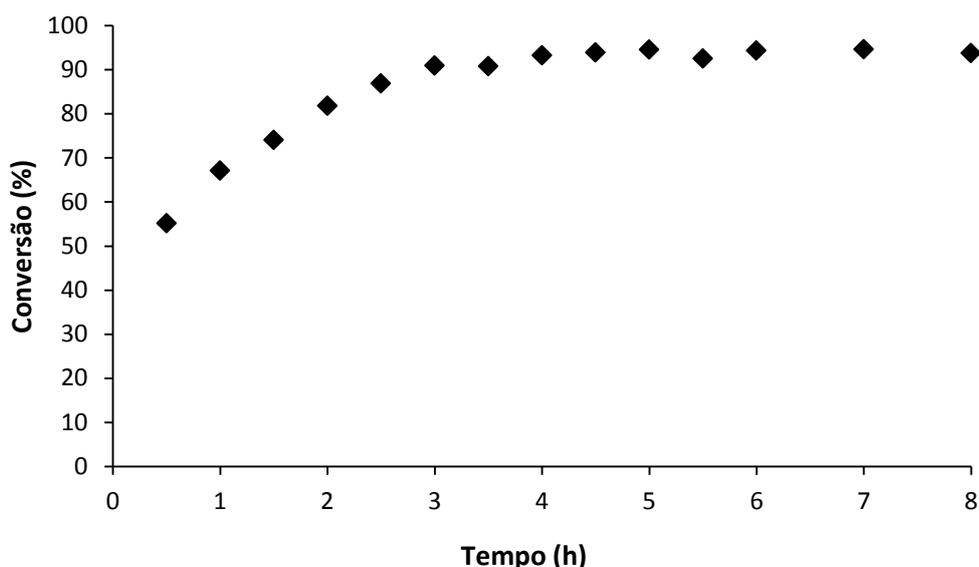


Figura 4: Cinética da produção enzimática de acetato de isoamila (150rpm, 30°C, razão molar 1:5 (ácido acético: álcool isoamilico) e concentração da enzima (m/m substrato) 15%).

Como pode ser observado na Figura 4, após 3 horas de reação a conversão acima de 90% foi obtida.

Romero *et al.* (2007) estudaram a cinética da síntese de acetato de isoamila catalisada por Novozym 435 em n-hexano, utilizando uma concentração equimolar de substratos (0,4 M), concentração de enzima de 13,8 g/mol de substrato, 200 rpm e 40°C e relataram uma conversão de cerca de 100% após 3 horas de reação. Um estudo semelhante conduzido por Shih *et al.* (2007), na produção de butirato de L-mentila, mostraram conversões de 72,6%, depois de 8,7 horas, 37°C, 31,7% da enzima e uma proporção molar de substratos de 1:2,6.

De acordo com Lerin *et al.* (2010), a perda de atividade da enzima ao longo do tempo pode ser provocada pela desativação da enzima como uma consequência do efeito térmico e concentração do produto. O conhecimento da lei de velocidade

que rege o processo de desativação muitas vezes é importante nos processos de catálise enzimática e de interesse na concepção do processo.

4.3 EFEITO DA REUTILIZAÇÃO DA ENZIMA

Na condição experimental otimizada definida anteriormente, os ciclos sucessivos de uso da enzima foram avaliados. Depois de cada lote, a mistura da reação foi avaliada em termos de conversão de acetato de isoamila e a enzima, sem qualquer pré-tratamento, foi testada em termos de atividade enzimática. Conversões de cerca de 80% foram observadas após cada ciclo, para 10 ciclos sucessivos (Tabela 4).

Tabela 4: Reúso da enzima na produção de acetato de isoamila na condição otimizada (150rpm, 30°C, razão molar 1:5 (ácido acético: álcool isoamilico) e concentração da enzima (m/m substrato) 15%).

Ensaio	Conversão (%)
1	85,11
2	87,33
3	87,73
4	85,34
5	87,13
6	85,45
7	81,13
8	83,95
9	77,18
10	85,53

Estes resultados podem ser considerados relevantes para a aplicação deste processo em escala industrial, visto que o biocatalisador pode ser utilizado para vários ciclos, sem perda significativa de atividade, reduzindo os custos de produção.

Na avaliação do uso da Novozym 435 para produção de propionato de geranila também foi possível a reutilização por 10 ciclos sucessivos da enzima (PAROUL *et al.*, 2010).

Lerin *et al.* (2011), estudaram o reuso do mesmo biocatalisador em três sistemas diferentes e após 10 ciclos a atividade enzimática se manteve em até 90%. Em estudo de produção de acetato de hexila e valerato de etila por lipase imobilizada de *Staphylococcus simulans* num sistema isento de solvente, Karra-Châabouni *et al.* (2006), relataram o decréscimo da atividade enzimática somente após 10 ciclos de reuso.

4.4 EFEITO DAS PENEIRAS MOLECULARES

Silva *et al.* (2013), estudaram o efeito das peneiras moleculares na produção de acetato de isoamila, catalisado por lipase de pâncreas de porco, e obtiveram a conversão máxima (77,1% +/- 1,2%) utilizando 7,5% em massa de peneira molecular, para a reação conduzida a 30°C, razão molar ácido:álcool de 1:2, e 12,5% em massa de biocatalisador após 5 h de reação.

O estudo do efeito das peneiras moleculares no rendimento da reação está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Conversão em acetato de isoamila na condição otimizada em diferentes concentrações de peneiras moleculares.

Peneiras Moleculares (% m/m substratos)	Conversão em acetato de isoamila (%)
0	97,09
1	98,56
2	97,90
3	96,91
4	97,67
5	98,19

Como pode ser observado o uso das peneiras moleculares torna-se desnecessário caso a reação seja conduzida com excesso de álcool (condição otimizada razão molar 1:5 ácido/álcool).

De acordo com Fehér *et al.* (2008), a água como subproduto da reação de esterificação pode deslocar o equilíbrio no sentido da direção de hidrólise, portanto, vários métodos foram utilizados para a remoção da água produzida, entre eles, está o uso de peneiras moleculares.

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da metodologia de superfície de resposta para otimizar a esterificação catalisada por lipase foi relatado por alguns autores, sendo as principais variáveis analisadas a razão molar do substrato, a concentração de enzima e o tempo de reação. Os resultados muitas vezes mostram que, mesmo após a otimização, o tempo de reação era geralmente longo, levando em torno de 8 a 48 horas para os rendimentos máximos. Este período de tempo é considerado longo demais para uma

aplicação industrial e representa a maior parte dos custos de aplicações de enzimas, tornando-o impróprio para processos em grande escala (MARTINS *et al.*, 2011).

No presente trabalho, conversões elevadas (> 90%) foram obtidas após 3 horas, a 30°C, razão molar ácido acético e álcool isoamílico 1:5 e concentração da enzima de 15% em peso (com base na massa de substratos). O estudo da reutilização do biocatalisador demonstrou elevado potencial deste sendo que conversões superiores a 83% foram obtidas após 10 ciclos de uso. Os resultados obtidos podem ser considerados promissores, em comparação com aqueles apresentados na literatura.

5 CONCLUSÃO

O comportamento da enzima utilizada, a concentração da mesma e a razão molar dos substratos mostraram ser parâmetros de reação importantes que afetam o rendimento da reação e devem ser avaliados para obtenção de um processo otimizado na produção de ésteres. O presente trabalho avaliou o efeito dessas variáveis e obteve a melhor condição para produção de acetato de isoamila (93% em 6 horas) a 30°C, razão molar 1:5 (ácido acético:álcool isoamilico) e concentração da enzima de 15% (m/m substrato). Através do estudo da cinética reacional foi possível reduzir o tempo para 3 horas mantendo a conversão acima de 90%. Nestas condições, também foi possível reutilizar a enzima por pelo menos 10 ciclos sem uso das peneiras moleculares.

A metodologia utilizada também possibilitou a obtenção de um modelo matemático empírico para a produção de acetato de isoamila. As condições ótimas demonstradas neste estudo podem ser utilizadas futuramente para escalonamento da produção enzimática de acetato de isoamila para se obter produtos de alta qualidade com custos reduzidos e economicamente viáveis.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos, podem ser apresentadas as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Realizar testes com outras lipases comerciais de menor custo e não comerciais e comparar o desempenho com lipase comercial;
- Realizar testes em escala piloto e em sistema de fluxo contínuo;
- Realizar a síntese de diferentes ésteres de aromas frutais nas condições experimentais otimizadas;
- Realizar reações de esterificação usando proporções equimolares dos substratos com peneiras moleculares tendo como objetivo a redução do custo de produção;
- Realizar testes de reuso e recuperação das peneiras moleculares após a reação.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, 32: 589–595, 2003.

ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada, Resolução - RDC Nº 2, de 15 de Janeiro de 2007. **Regulamento Técnico Sobre Aditivos Aromatizantes**, 2007.

ARAGÃO, V.C.; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B.D.A.; THIESEN, C.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, 32: 2268-2272, 2009.

ARMSTRONG, D.W.; YAMAZAKI, H. Natural flavours production a biotechnological approach. **Trends in Biotechnology**, 4(10): 264-268, 1986.

AZUDIN, N.Y.; MAD DON, M.; SHUKOR, S.R.A. Production and kinetics of isoamyl acetate from acetic anhydride using *Candida antarctica* Lipase B in a solvent-free system. **Chemical Engineering Transactions**, 32: 1057-1062, 2013.

BARTLING, K.; THOMPSON, J.U.S.; PFROMM, P.H.; CZERMAK, P.; REZAC, M.E. Lipase-catalyzed synthesis of geranyl acetate in n-hexane with membrane-mediated water removal. **Biotechnology Bioengineering.**, 75(6): 676-681, 2001.

BARZCA, M.V. **Esterificação**: Processos químicos industriais III. In: Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP. 2011. Disponível em <<http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/Esterificacao.pdf>> Acesso em: 21/06/2013.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1982. 813 p.

BEZBRADICA, D.; MIJIN, D.; ŠILER-MARINKOVIĆ, S.; KNEŽEVIĆ, Z. The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 45: 97–101, 2007.

BIZZO, H. R.; HOVEL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, 32(3): 588-594, 2009.

BOBBIO, Florinda O.; BOBBIO, Paulo A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo (SP): Varela, 2003. 238 p.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M. Da; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, 28(4): 614-621, 2005.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G de; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. da. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, 26(1): 75-80, 2003.

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

CHANG, SHU-WEI; SHAW, JEI-FU; YANG, CHENG-KANG; SHIEH, CHWEN-JEN. Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. **Process Biochemistry**, 42: 1362–1366, 2007.

CHIARADIA, V.; DETOFOL, M.; CANSIAN, R.L.; DALLAGO, R.; OLIVEIRA, D.; PAROUL, N. Produção de mentil acetato via esterificação enzimática em sistema livre de solvente. **Perspectiva**, 35(131): 35-42, 2011.

CHIARADIA, V.; PAROUL, N.; CANSIAN, R.L.; JÚNIOR, C.V.; DETOFOL, M.R.; LERIN, L.A.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D. Synthesis of Eugenol Esters by Lipase-Catalyzed Reaction in Solvent-Free System. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 167: 742-751, 2012.

CONN, Eric E.; STUMPF, Paul K. **Introdução à bioquímica**. São Paulo, SP: Edgard Blücher, 1984. 525 p.

CVJETKO, M.; VORKAPIĆ-FURAČ, J.; ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P. Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor. **Process Biochemistry**, 47: 1344–1350, 2012.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, 27(4): 623-630, 2004.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L; FENNEMA, Owen R. **Fennema química de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 2008. 1154 p.

DEWAN, Shalini S. *et al.* **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. 2014. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>> 2014. Acesso em: 23/06/2014.

DUBAL, S. A.; TILKARI, Y. P.; BORKAR, I. V. Biotechnological routes in flavour industries. **Advaced Bioytech**, 3: 20-21, 2008.

EDRIS, A. E., MALONE, C. R. Formulation of banana aroma impact ester in water-based microemulsion nano-delivery system for flavoring applications using sucrose laurate surfactante. **Procedia – Food Science**, 1: 1821 – 1827, 2011.

EVANGELISTA, José. **Alimentos: um estudo abrangente**. São Paulo, SP: Atheneu, 2001. 450 p.

FEHÉR, E.; ILLEOVÁ, V.; KELEMEN-HORVÁTH, I.; BÉLAFI-BAKÓ, K., M. POLAKOVIČ, GUBICZA, L. Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid–alcohol biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 50: 28–32, 2008.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B. da; FRIAS, GAVA, J. R.. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo (SP): Nobel, c2008. 511 p.

GHAMGUI, Hanen; KARRA-CHÂABOUNI, Maha; BEZZINE, Sofiane; MILED, Nabil; GARGOURI, Youssef. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, 38: 788–794, 2006.

GILLIES B, YAMAZAKI H, ARMSTRONG D.W. Production of flavor esters by immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, 10:709–714, 1987.

GOMES, F. M., SILVA, M. B. da, CASTRO, H. F. de. Avaliação das condições reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila empregando lipase de *Candida rugosa*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2: 189-195, 2004.

GUBICZA, L.; KABIRI-BADR, A.; KEOVES, E.; BELAFI-BAKO, K. Large-scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal. Short communication. **Journal of Biotechnology**, 84: 193–196, 2000.

GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, W. S. Parametric optimisation of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. **Process Biochemistry**, 35: 459–464, 1999.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOĞLU, Ü. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, 38: 379–386, 2002.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; KAPUCU, H.; AYDOĞAN, Ö. MEHMETOĞLU, Ü. Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: Optimization by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, 40: 778–785, 2007.

HALL, R.L.; MERWIN, E.J. **The role of flavors in food processing**. Food Technology, 35 (46), 1981.

HASAN, FARIHA; SHAH, AAMER ALI; HAMEED, ABDUL. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 39: 235–251, 2006.

IOFI. **Code of Practice**. V1. 2, aprovada pelo Conselho Diretor em 21 de Junho de 2010. Disponível em <<http://www.iofi.org/Home/Teaser-Code-of-Practice/IOFI-Code-of-Practice/page.aspx/103>> Acesso em: 15/01/2014.

KARRA-CHÂABOUNI, Maha; GHAMGUI, Hanen; BEZZINE, Sofiane; REKIK, Ahmed; GARGOURI, Youssef. Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, 41: 1692–1698, 2006.

KRISHNA, M.B., DIVAKAR S., PRAPULLA S.G., KARANTH N.G. Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor miehei* by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, 26:131-136, 2000.

KRISHNA, S.H., DIVAKAR S., PRAPULLA S.G., KARANTH N.G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, 87: 193–201, 2001.

KUMAR, R.; MODAK, J.; MADRAS, G. Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, 23: 199-202, 2005.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R.; DASGUPTA, S..Lipase Mediated Isoamyl Acetate Synthesis in Solvent-Free System Using Vinyl Acetate as Acyl Donor. **Food Technology and Biotechnology**, 47(1): 13–18, 2009.

LARIOS, A.; GARCÍA, H. S.; OLIART, R. M.; VALERIO-ALFARO, G. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 65: 373–376, 2004.

LERIN, L.; CENI, G.; RICHETTI, A.; KUBIAK, G.; OLIVEIRA, J. Vladimir; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E. G.; OLIVEIRA, D. Successive cycles of utilization of Novozym 435 in three different reaction systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 28(02): 181-188, 2011.

LIMA, L. M. Síntese enzimática de ésteres catalisada por lipases imobilizadas em diferentes suportes. **Tese (Doutorado em Engenharia Química)**. São Paulo: UFSCar, 2013.

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial**: revalorización alimentaria de la producción agrícola. Zaragoza: Acribia, 1996. xxv, 428 p.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aromas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 17: 115-119, 1997.

MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; GARLAPATI, V. K. Banerjee, R., NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 60: 57–63, 2009.

MARTINS, A. B.; GRAEBIN, N. G.; LORENZONI, A. S.G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A.Z.; RODRIGUES, R. C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, 46: 2311–2316, 2011.

OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases. **Biochimica et Biophysica Acta**, 575: 156-165, 1979.

OZYILMAZ, GUL; GEZER, ESRA. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 64: 140–145, 2010.

PAROUL, N., GRZEGOZESKI, L.P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D. Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Journal of Chemical. Technology and Biotechnology**, 85: 1636–1641, 2010.

PRINS, C. L.; VIEIRA, I. J.; FREITAS, S. P. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Society of Plant Physiology**, 22(2): 91-102, 2010.

RAHMAN, M. B. A.; CHAIBAKHSH, N.; BASRI, M. Effect of Alcohol Structure on the Optimum Condition for Novozym 435-Catalyzed Synthesis of Adipate Esters. **Biotechnology Research International**, 2011: 1-7, 2011.

RAJEANDRAN, Aravindan, PALANISAMY, Anbumathi and THANGAVELU, Viruthagiri. Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, 52(1): 207-219, 2009.

RODRIGUEZ-NOGALES, J. M.; ROURA, E.; CONTRERAS, E. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. **Process Biochemistry**, 40: 63–68, 2005.

ROMERO, M.D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A.. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal of Biotechnology**, 127: 269–277, 2007.

ROMERO, M.D.; CALVO, L.; ALBA, C.; HABULIN, M., PRIMOŽIČ, M.; KNEZ, Ž. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida Antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, 33: 77–84, 2005.

SALAH, R. B.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of Butyl Acetate Ester by Lipase from Novel Strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 103(4): 368–372, 2007.

SCHRADER, J.; ETSCHMANN, M.M.W.; SELL, D.; HILMER, J. M.; RABENHORST, J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavor compounds – current industrial processes and future prospects. **Biotechnology Letters**. 26: 463-472, 2004.

SCHWAB, W.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; LEWINSOHN, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. **The Plant Journal**, 54: 712–732, 2008.

SILVA, N. C. A; MIRANDA, J. S.; MENDES, A. A.. Produção enzimática de aroma de banana por esterificação direta em meio orgânico. In: Latin American Symposium of Food Science (10^o Slaca), 2013, Campinas. **Anais**: 816, 2013.

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A review. **Biotechnology**, 10(1): 23-40, 2011.

SHIH, I.L.; HUNG, S.H.; CHEN, F.Y.; JU, H.Y.; SHIEH, C.J. Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-menthyl butyrate by *Candida rugosa* lipase. **Food Chemistry**, 100: 1223–1228, 2007.

SPEZIALI, M. G. De aromas e perfumes, o mercado da indústria do “cheiro”. **Quimica Nova**, 35(4): 861-864, 2012.

SUN, JINGCA; YU, BIN; CURRAN, PHILIP; LIU, SHAO-QUAN. Lipase-catalysed ester synthesis in solvent-free oil system: Is it esterification or transesterification? **Food Chemistry**, 141: 2828–2832, 2013.

SUN, JINGCA; YU, BIN; CURRAN, PHILIP; LIU, SHAO-QUAN. Optimisation of flavour ester biosynthesis in an aqueous system of coconut cream and fusel oil catalysed by lipase. **Food Chemistry**, 135: 2714–2720, 2012.

TORRES, S.; BAIGORÍ, M. D.; SWATHY, S.L.; PANDEY, A.; CASTRO, G. R. Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis*S-86 esterase. **Food Research International**, 42: 454–460, 2009.

VENKATARAMAN, N.S. *et al.* **Global Markets for Flavors and Fragrances**. 2012. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/chemicals/flavors-fragrances-global-markets-chm034c.html>> Acesso em: 23/06/2014.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M.. Ester synthesis in lipase catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, 23: 438, 1998.

YEE, L.; AKOH, C.C.; PHILLIPS, R.S.. Lipase PS-catalyzed transesterification of citronellyl butirate and geranyl capronate: effect of reaction parameters. **Journal of the American Oil Chemists Society**. 74(3): 255-260, 1997.

ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P.; PLAZL, I. Modelling and experimental studies on lipase-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a microreactor. **Process Biochemistry**, 44: 1115–1121, 2009.