

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI - ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SÍNTESE DE BUTANOATO DE GERANILA (AROMA DE CEREJA) VIA
ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO

CARLA REGINA SBARDELOTTO

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

Orientadores:

Jamile Zeni
Natalia Paroul

ERECHIM, RS – BRASIL

DEZEMBRO, 2015

SÍNTESE DE BUTANOATO DE GERANILA (AROMA DE CEREJA) VIA
ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO

CARLA REGINA SBARDELOTTO

Dissertação de Mestrado submetida 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. Jamile Zeni.

Orientadora

Prof^ª. Natalia Paroul

Orientadora

Prof^ª. Adriana Biasi Vanin

Prof. Rogério Cansian

Erechim, dezembro de 2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus...

À minha família, aos meus pais Darcy e Inês pela motivação e por trazer - me apoio incondicional, meu guia e pilar nos momentos difíceis e por acreditar nos meus sonhos e por tantos momentos de amor, alegria e felicidade.

Ao meu irmão Carlos e a minha cunhada Edi, por me apoiarem em meu objetivo.

Ao meu marido Ivonir, pelo apoio na minha decisão de realizar o mestrado e incentivo nos momentos difíceis e principalmente à minha princesinha, Emanuely.

À minhas orientadoras Jamile e Natalia pela valorosa orientação, paciência, compreensão e amizade, mas principalmente, pelos ensinamentos e confiança no meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, pelos conhecimentos compartilhados e amizade.

À todos os meus colegas do mestrado.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios de Biotecnologia de Alimentos que de alguma forma ou outra sempre estiveram à disposição para ajudar-me, em especial à Nádia e o Alessandro.

Muito obrigada a todos.

À URI- ERECHIM, que forneceu todas as ferramentas para a realização deste trabalho.

A todos que não citei, mas que de alguma forma fizeram parte deste trabalho.

*Dedico este trabalho aos amores
da minha vida, Ivonir e Emanuely.
E aos meus pais e a todos aqueles
que me apoiaram e acreditaram
em mim.*

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

Resumo de Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

SÍNTESE DE BUTANOATO DE GERANILA (AROMA DE CEREJA) VIA
ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO

Carla Regina Sbardelotto

Dezembro/2015

Orientadores: Jamile Zeni

Natalia Paroul

Produção de aromatizantes via esterificação enzimática é uma pesquisa de grande interesse científico e tecnológico devido às inúmeras inconveniências relacionadas com a catálise ácida, principalmente por estes sistemas não se adequarem mais ao atual termo “tecnologias limpas”. Este trabalho teve como objetivo a otimização dos parâmetros da reação para a síntese de aromatizante natural a partir de um álcool monoterpênico (geraniol) e ácido butanóico catalisada pelas lipase Novozym 435 e Novozyme NZL-102-LYO-HQ (Cal B (PU)). A condição ótima para conversão do geraniol e ácido butanóico (94%) para as duas enzimas em estudo foi razão molar (geraniol: ácido butanóico) 5:1, agitação de 150 rpm, 70°C e concentração de enzima de 10% em massa em 2 horas de reação. Um estudo cinético foi realizado para avaliar a influência da razão molar dos substratos, concentração de enzima e da temperatura no rendimento em produto. Os resultados mostram que em uma hora de reação a conversão foi quase completa (~95%) para as duas enzimas sendo que a condição ótima para Novozyme 435 foi razão molar (álcool: ácido) 3:1, concentração de enzima de 10% e temperatura de 25°C e para a enzima Cal B (PU) a melhor condição foi razão molar (3:1), concentração de enzima de 5% e temperatura de 40°C.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering

SÍNTESE DE BUTANOATO DE GERANILA (AROMA DE CEREJA) VIA
ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO

Carla Regina Sbardelotto

December/2015

Advisors: Jamile Zeni

Natalia Paroul

Flavoring production via enzymatic esterification is a great scientific and technological research due to numerous inconveniences related to acid catalysis, mainly because these systems do not fit over the current term "clean technologies". This study aimed to the optimization of reaction parameters for natural flavoring synthesis from a monoterpenic alcohol (geraniol) and butanoic acid catalyzed by lipase Novozym 435 and Novozyme NZL-102-LYO-HQ (Cal B (PU)). Optimal condition for conversion of geraniol and butanoic acid (94%) for both enzymes study molar ratio (geraniol: butanoic acid) 5: 1, stirring 150 rpm, 70°C and concentration of 10% enzyme in mass 2 hours of reaction. A kinetic study was undertaken to evaluate the influence of the molar ratio of the substrates, enzyme concentration and temperature on the yield of product. The results show that in one hour of reaction the conversion was almost complete (~ 95%) for both enzymes being that the optimum condition for Novozyme 435 was molar ratio (alcohol: acid) 3: 1 enzyme concentration of 10% and 25°C and the enzyme Cal B (PU) The best condition was mole ratio (3: 1), the enzyme concentration of 5% and 40°C.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE QUADROS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
2.1 Aromas	1
2.1.1 Aromas Naturais	2
2.1.2 Aromas artificiais	3
2.2 Panorama da indústria de aromas	4
2.3 Obtenção de Aromas por Vias Biotecnológicas	6
2.4 Enzimas	11
2.4.1 Lipases	12
2.4.1.1 Aplicação Industrial das Lipases	13
2.5 Produção enzimática de aromas livre de solvente	14
2.6 Produção de Aromas a Partir de Álcoois Monoterpênicos	16
2.7 Mecanismo Cinético de Esterificação Enzimática	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Materiais	21
3.1.1 Reativos	21
3.1.2 Enzima	21
3.2 Determinação do tempo reacional para produção de butanoato de geranila	22
3.3 Otimização da produção de butanoato de geranila	22
3.4 Procedimento experimental para a produção de butanoato de geranila	22
3.5 Estudo cinético para a produção de butanoato de geranila	23
3.6 Determinação da conversão da reação	24
3.7 Determinação da velocidade específica para a produção de butanoato de geranila ..	24
3.8 Análise Estatística	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1 Determinação do tempo de reação para a produção de butanoato de geranila	25
4.2 Otimização de produção de butanoato de geranila	27
4.3 Estudo cinético para a produção enzimática de butanoato de geranila	34
4.3.1 Efeito da razão molar (álcool: ácido) na cinética de produção enzimática de butanoato de geranila	35
4.3.2 Efeito da concentração de enzima na cinética de produção enzimática de butanoato de geranila	38
4.3.3 Efeito da temperatura na cinética de produção enzimática de butanoato de geranila	40
5 CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	47
5.1 Conclusão	47
5.2 Sugestões para trabalhos futuros	47
6 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral da reação de esterificação.....	17
Figura 2. Conversão de butanoato de geranila em função do tempo de reação quando utilizadas as enzimas Novozym 435, Lipozym 435, Cal B(PU) e reação sem enzima.	26
Figura 3. Gráfico de Pareto para os efeitos: razão molar, temperatura e concentração de enzima na produção de butanoato de geranila ($p > 0,05$) usando Cal B (PU).	30
Figura 4. Superfície de resposta (a, c e d) e curva de contorno (b, d e f) para a produção de butanoato de geranila utilizando Novozym 435 (a e b) em função da razão molar e temperatura, (c e d) em função de concentração de enzima e razão molar e (e e f) em função da concentração de enzima e temperatura.	32
Figura 5. Diagrama de conversões previstas x conversões observadas para a produção de butanoato de geranila via esterificação enzimática.	33
Figura 6. Cinética de produção de butanoato de geranila usando Novozyme 435 (a) e Cal B (PU) (b) para diferentes razões molares, temperatura de 70° C. concentração de 10% e 150 rpm.....	36
Figura 7. Cinética de produção de butanoato de geranila usando (a) Novozyme 435 e (b) Cal B (PU) para diferentes concentrações de enzima, temperatura de 70°C, razão molar 5:1 e 150 rpm.....	39
Figura 8. Cinética de produção de butanoato de geranila usando (a) Novozyme 435 e (b) Cal B (PU) com diferentes temperaturas, concentração de enzima (10%), razão molar 5:1 e 150 rpm.....	40
Figura 9. Cinética de produção de butanoato de geranila (a) temperatura de 25°C para a Novozyme 435 e (b) temperatura de 40°C para Cal B (PU), com concentração de enzima de 0 e 5% e razão molar (álcool:ácido) de 3:1 e 5:1 para ambas as enzimas.....	43
Figura 10. Cinética de produção de butanoato de geranila usando Novozyme 435 nas condições de 150 rpm e razão molar (a) 3:1 e 5:1 à 25°C , (b) 3:1 e 5:1 à 30°C.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis e níveis do DCCR 2 ³ para produção enzimática de butanoato de geranila.	22
Tabela 2. Efeito da razão molar na produção enzimática de butanoato de geranila utilizando a Novozyme 435 e Cal B (PU).....	23
Tabela 3. Efeito da concentração de enzima na produção enzimática de butanoato de geranila utilizando Novozyme 435 e Cal B (PU).....	23
Tabela 4. Efeito da temperatura na produção enzimática de butanoato de geranila utilizando a Novozyme 435 e Cal B (PU).....	23
Tabela 5. Matriz do Planejamento Experimental com os valores reais e codificados das variáveis independentes e a conversão de butanoato de geranila utilizando a enzima comercial Novozyme 435 e Cal B (PU).....	28
Tabela 6. Coeficientes de regressão para a esterificação enzimática de butanoato de geranila.	30
Tabela 7. Análise de variância para a produção de butanoato de geranila.....	31

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Visão geral da produção de aromas e fragrância catalisadas por lipases.....	11
Quadro 2. Aplicação industrial de lipases.....	14
Quadro 3. Compostos monoterpênicos e suas propriedades organolépticas.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PU – Poliuretano

Cal B – Lipase *Candida Antarctica* tipo B

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

RM – Razão molar

[E] – Concentração de enzima

T – Temperatura

1 INTRODUÇÃO

Empresas e consumidores buscam compostos químicos aromáticos naturais e que causam menos impactos ambientais. No entanto, a qualidade e a oferta de sabores naturais ainda são limitadas, portanto as vias biotecnológicas se tornam uma alternativa viável e inovadora para a produção de aromatizantes, pois possuem várias vantagens como: alta eficiência catalítica, condições operacionais brandas, alta seletividade, são classificados como naturais, vantagem ambiental evidente e menor consumo de energia (ZHANG et al., 2007; ARAGÃO et al., 2009; AKACHA et al., 2014).

Os ésteres são substâncias orgânicas, frequentemente encontradas na natureza e utilizadas como importantes intermediários em síntese orgânica. Tais substâncias desempenham um papel relevante na indústria farmacêutica, de perfumes, de polímeros, de cosméticos e estão presentes na composição de produtos alimentícios para realçar e imitar sabores e aromas (TAN et al., 2006). Ésteres formadores de aroma são obtidos atualmente por dois processos principais, a síntese química e extração de fontes naturais. O processo clássico para produção de ésteres ocorre através da catálise ácida, na qual normalmente utiliza-se um ácido de Bronsted como catalisador. Os resíduos de ácido graxo e do catalisador podem ser removidos através de um tratamento alcalino, o que aumenta ainda mais o impacto ambiental por emitirem certa carga de resíduos não biodegradáveis, além de elevado custo energético de produção.

O interesse industrial por tecnologias limpas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia. O uso de lipases nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos executados na natureza. A economia de energia e minimização da degradação térmica são provavelmente as maiores vantagens na substituição de tecnologias químicas atuais pelas biológicas (HASAN et al., 2006).

Embora, as aplicações industriais das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes e de alimentos e ainda sejam, em sua maioria, baseadas nas reações de hidrólise, novas aplicações decorrentes das reações de síntese e transesterificação em função das características enântio e região seletivas das lipases vêm se estabelecendo nos mais diversos campos: indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais (BERGER, 2009; KARRA-CHAÂBOUNI et al.,

2006).

A síntese de ésteres naturais em sistemas livres de solventes pode ser definida como solvólise, ou seja, uma reação na qual o reagente por si próprio atua como solvente. Várias investigações estão focadas no estudo das reações de esterificação enzimática em sistemas livres de solventes orgânicos (MELO et al., 2005; CHANG et al., 2007; RICHETTI et al., 2010; VANIN et al., 2014).

Neste contexto, a presente pesquisa teve como principal objetivo a produção do éster butanoato de geranila (aroma de cereja) via esterificação enzimática em sistema livre de solvente orgânico. Para atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados.

- ✓ Avaliar o tempo de reação necessário para a produção de butanoato de geranila com as enzimas comerciais Novozyme 435, Lipozyme 435 e a enzima Cal B imobilizada em suporte rígido de poliuretano.
- ✓ Avaliar o efeito das variáveis do processo (razão molar, concentração de enzima e temperatura) empregando técnicas de planejamento experimental visando determinar as condições de processo que maximizem a conversão do mesmo;
- ✓ Avaliar a cinética reacional nas condições experimentais maximizadas, determinadas na etapa anterior.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte no que concerne à esterificação enzimática para produção de bioaromas na ausência de solventes orgânicos. Com base no exposto e levando em consideração os objetivos delineados para este trabalho, ênfase especial será dada à álcoois monoterpenicos e ácidos carboxílicos. Resultados da literatura concernentes aos obtidos nesta pesquisa apresentarão especial destaque.

2.1 Aromas

Aromas e aromatizantes são compostos extremamente importantes para as indústrias de alimentos, bebidas, química, cosméticos e farmacêuticos.

Na indústria de alimentos os aromatizantes são geralmente utilizados com a função de impedir alterações, caracterizar, melhorar, padronizar e/ou reconstituir o aroma/sabor dos produtos, além de serem utilizados também para mascarar os aromas e sabores indesejáveis que possam ocorrer durante o processamento de alimentos (FANI, 2011).

Hoje em dia, os aromas representam mais de um quarto do mercado de aditivos alimentares de todo o mundo e a maioria deles são obtidos por extração a partir de fontes naturais ou por métodos tradicionais como a síntese química. Os aromas movimentam cerca de 7 milhões de dólares por ano no comércio mundial, valor que aumenta 4,4% a cada ano. Financeiramente isto significa 25% da total de mercado de aditivos alimentares (DUBAL et al., 2008).

Segundo a RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007 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” e podem ser classificados em sintéticos e naturais.

Nesta classe de aditivos é onde existe o maior número de substâncias, uma vez que os aromas são muito complexos. Alguns produtos podem apresentar naturalmente mais de mil substâncias que, em conjunto, conferem um aroma característico. 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). Como exemplo, pode-se citar o Aroma Natural de Café. O café torrado apresenta um aroma tão complexo que já se identificaram mais de mil componentes na sua constituição.

Os aromatizantes aumentam a aceitabilidade dos alimentos, melhorando o seu aroma; desde o século XIX são sintetizados numerosos aromatizantes químicos.

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 aromatizantes têm várias funções, como por exemplo, caracterização do aroma/sabor, melhoramento do aroma/sabor, padronização do aroma/sabor, reconstituição do aroma/sabor, mascaramento de aromas/sabores indesejáveis.

2.1.1 Aromas Naturais

Nos EUA, o termo aroma natural significa essência ou extrato, proteína hidrolisada, destilado de qualquer produto de aquecimento ou conversão enzimática, que contenham componentes de aroma derivados de um tempero, suco de frutos, frutas, fungos comestíveis, ervas, brotos, cascas, material vegetal de raiz, folhas, ou similares, carnes, frutos do mar, ovos, laticínios, ou produtos de fermentação dos mesmos. A principal função nos alimentos é aromatizar em vez de nutrir.

Na Europa, a definição de aromas naturais é “substâncias ou preparações obtidas por processos físicos, microbiológicos ou enzimáticos oriundos de material de origem vegetal ou animal”. No Brasil, os aromas naturais são obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas naturais (PANDEY et al., 2008; ANVISA, 1999).

De acordo com Código de Boas Práticas da *International Organization of the Flavor Industry* (IOFI, 2010), os aromas naturais 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.

Segundo Resolução RDC nº. 2 de 15 de janeiro de 2007, “aromas naturais são obtidos exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes naturais”, as quais são “produtos de origem animal ou vegetal aceitáveis para consumo humano, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado, como: torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, tratamento enzimático ou outros”.

De acordo com a legislação brasileira (RDC nº. 2 de 15 de janeiro de 2007) os aromatizantes/aromas naturais compreendem:

- ✓ Óleos essenciais: misturas de compostos voláteis de origem vegetal, obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado).
- ✓ Extratos: produtos obtidos por esgotamento a frio ou a quente de plantas ou animais com solventes permitidos, que posteriormente possam ser eliminados ou não. Os extratos devem conter os princípios sápidos aromáticos voláteis e fixos correspondentes ao respectivo produto natural. Eles apresentam-se como extratos líquidos e secos.
- ✓ Bálsamos, oleoresinas e oleogomaresinas: produtos obtidos mediante a exsudação livre ou provocada de determinadas espécies vegetais.
- ✓ Substâncias aromatizantes/aromas naturais isolados: substâncias quimicamente definidas, obtidas por processos físicos, microbiológicos ou enzimáticos adequados, a partir de matérias primas aromatizantes naturais ou de aromatizantes/aromas naturais.

2.1.2 Aromas artificiais

Um rápido progresso na produção de aromas teve início com o desenvolvimento da síntese orgânica. Mais de um século atrás a obtenção de cumarina (1868) e vanilina (1874) forneceram os primeiros aromatizantes artificiais, disponíveis por síntese. A partir destes compostos sintéticos, um número expressivo de aromas foi obtido por esta via em escala industrial (SERRA et al., 2005).

Segundo a ANVISA (RDC nº. 2 de 15 de janeiro de 2007) “Aromatizantes sintéticos são compostos quimicamente definidos obtidos por processos químicos”, compreendendo os aromatizantes idênticos aos naturais e os aromatizantes artificiais.

- ✓ Aromatizantes/aromas idênticos aos naturais: “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-primas naturais (processadas ou não)”.
- ✓ Aromatizantes/aromas 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.

2.2 Panorama da indústria de aromas

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 , 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).

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.

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).

2.3 Obtenção de Aromas por Vias Biotecnológicas

A obtenção de aromas por vias biotecnológicas pode ser realizada de várias formas: produção por células vegetais, células microbianas ou catálise enzimática.

Os processos biotecnológicos oferecem diversas vantagens e se mostram como uma alternativa competitiva aos métodos químicos, devido à alta eficiência catalítica, condições operacionais brandas e a seletividade dos catalisadores naturais (JANNSENS et al., 1992; CHANG et al., 2007).

Vários compostos voláteis são importantes na formação dos aromas: acetaldeído, acetato de etila, de isoamila, de propila, de isopropila, de isobutila, etanol, butirato de etila, etc. A maioria são alcoóis, aldeídos, ésteres e cetonas. Estes podem ser identificados a partir da utilização de diversas técnicas instrumentais de química orgânica, tais como cromatografia gasosa e espectrometria de massa (JANSSENS et al., 1992).

Processos biológicos com base em micro-organismos (bactérias, fungos, leveduras) e suas enzimas fazem parte da biotecnologia. O princípio desta tecnologia consiste do uso de recursos renováveis, produção limpa, menos poluição e processos menos intensivo de energia em sistemas biológicos, tais como células inteiras, ou enzimas, utilizados como reagentes ou catalisadores (AKACHA et al., 2014).

Tan et al. (2011) estudou a viabilidade da biossíntese de aromas naturais ativos 2-feniletílicos ésteres de creme de coco. Cinco lipases fúngicas comerciais (Palatase 20000L, Lipase AYS “Amano” 12, Piccantase A e Piccantase AN) foram testadas em relação a sua capacidade de produção de 2-fenil-etil-hexanoato de 2-feniletílo e octanoato de creme de coco suplementado com natural 2-feniletanol. Palatase 20000L e Lipase AYS “Amano” 12 mostraram o maior potencial para a síntese de ésteres de 2-feniletílo. A reação de biossíntese de lipase pela Palatase 20000L foi ainda estudada em diferentes concentrações de temperatura, pH da enzima e do substrato, com a síntese do éster obtido no máximo 9% (v/v) de 2-fenil-etanol e 2,15 a 8,6 mg de enzima proteína/100 mL de mistura de reação. Um intervalo de temperatura de 30 a 53°C e um intervalo de pH de 5,2 a 8,5 teve pouco efeito sobre a atividade da lipase Palatase.

2.3.1 Obtenção de Aromas a partir de Células Vegetativas

A técnica de obtenção de aromas a partir de células vegetais pode variar desde extração por prensagem do fruto até a extração a seco por fluido supercrítico.

Malaman et al. (2011) extraíram vários compostos de aroma com características frutais de pitanga com utilização de dióxido de carbono ou induzindo a produção de aromas pela própria cultura de células vegetais. Culturas de células vegetais possuem habilidade de transformar substratos exógenos, como subprodutos industriais, em produtos de interesse. Várias plantas com características aromáticas são boas candidatas para a cultura de células vegetais, como a baunilha, que é um dos ingredientes de aromas mais utilizados em alimentos, sendo um dos principais componentes produzidos durante a cultura de células da planta *Vanilla planifolia* (MEDEIROS et al., 2010).

Longo e Sanromán (2006) citam a produção de aromas por cultivo de células vegetais: aroma de maçã a partir do cultivo de *Malus silvestris*, de cacau a partir de *Theobromo caçãõ*, e de cebola a partir do cultivo de *Allium cepa* para a utilização na indústria de alimentos.

2.3.2 Obtenção de Aromas por Micro-organismos

Muitos micro-organismos são capazes de sintetizar compostos de aroma quando cultivados em meios de cultura adequados, demonstrando sua habilidade de conversão, que pode necessitar de diversas etapas bioquímicas (KEMPLER, 1983).

Segundo Chiappini (2007) o primeiro relato publicado sobre a capacidade de bactérias e fungos selecionados produzirem fragrância foi realizado por Omelianski, em 1923. Em seu trabalho, o autor destacou as leveduras como um dos grupos mais importantes de micro-organismos que produz, em cultura, um forte aroma etéreo, de variada intensidade, que lembra o odor de frutas como morango, abacaxi, maçã, pêra e melão. Os gêneros *Mycoderma*, *Pichia*, *Willia* e *Torula* e outros isolados de uva, de grãos úmidos de cevada, de suco de abacaxi, de folhas de ruibarbo, de queijo e de kumis foram citados pelo autor como produtores de um agradável e complexo aroma de frutas. Omelianski (1923) realizou uma série de experimentos com micro-organismos isolados do leite, do pão e de algumas frutas, onde variou a composição do meio de cultura e obteve, em diferentes substratos, o que chamou de aroma de morango, aroma de fruta impuro e aroma de queijo.

Chiappini (2007) reportou a produção de ésteres por *Pseudomonas fragi*; sendo que, o aroma de coco foi detectado em cultivos de *Trichoderma viride*, *Myocacia uda*, *Ischnoderma benzoinum*, *Trichoderma harzianum* e de espécies do gênero *Neurospora*. O agradável aroma de maçã foi percebido no cultivo da levedura *Dipodascus aggregatus*. Vinte compostos voláteis, predominantemente ésteres e terpenos foram identificados no meio de cultura de *Trichothecium roseum*; os monoterpenos citronelol, linalol e geraniol foram produzidos no cultivo de *Kluyveromyces lactis*. E o aroma de abacaxi intenso e agradável produzido pela levedura *Dipodascus magnusii*; os monoterpenos com qualidade sensorial de leve aroma frutal produzido por duas linhagens de *Ambrosiozyma monospora*, e as notas frutais e florais produzidas por *Hansenula anomala*.

2.3.3 Obtenção de Aromas por Catálise Enzimática

Apesar dos elevados custos da aplicação de enzimas microbianas na produção de aromas, estas podem oferecer alta seletividade para a conversão de um determinado substrato, alta eficiência, alta velocidade de reação e atividade catalítica em ambos os sentidos de reação (AKACHA et al., 2014). Algumas enzimas (lipases, proteases, glicosidasas, pectinases, esterases, etc.) catalisam a produção de compostos de aromas através de precursores moleculares. Também técnicas como a imobilização de enzimas ou regeneração da coenzima podem ser altamente eficientes e específicas em processos de biocatálise para a síntese de aromas (PANDEY et al., 2008).

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).

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 independem da estação, clima e variação

geográfica e não requerem 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 catálise 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 orgânico, a fim de eliminar qualquer substância adsorvida no suporte (MARTINS et al., 2011).

Lerin et al. (2011) investigaram a atividade de esterificação residual e a conversão do produto após 10 ciclos sucessivos de utilização de uma lipase comercial (Novozym 435) em três sistemas: esterificação de hexanol 2-etil e ácido palmítico em um sistema livre de solvente; esterificação de ácido ascórbico e ácido palmítico em terc-butanol; e transesterificação de glicerol e metil benzoato de metilo em 2-propanol. Estes sistemas foram escolhidos com base nos resultados anteriores de pesquisa em termos de conversão do produto. Antes do aumento de escala, há uma necessidade de avaliar vários ciclos de utilização do biocatalisador. A esterificação de 2-etil hexanol mostrou que, após 10 ciclos, a enzima manteve 90% da sua atividade. O sistema constituído por ácido ascórbico, ácido palmítico, Novozym 435 e terc-butanol mostraram que uma redução na atividade da enzima foi acompanhada por uma redução na conversão da reação; o mesmo comportamento não foi observado para o terceiro sistema.

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 antactica* em líquido iônico em micro-reator de fluxo contínuo a 55°C.

Martins et al. (2014) comparou o desempenho de três lipases comerciais (Novozym 435, Lipozyme TL-IM, e Lipozyme RM-IM) na síntese de ésteres de sabores obtidos por esterificação de ácidos acético, propiônico, butírico e utilizando álcoois, etanol, álcool isopropílico, butanol ou pentanol. Em geral, quanto maior for a cadeia do ácido, maior o

rendimentos da reação. Novozym 435 foi a enzima mais eficaz na maioria dos casos, e a Lipozyme IM-RM apresentou resultados melhores do que a Novozym 435 na produção de butirato de etilo. Reações com ácido butírico mostrou as taxas de conversão mais altas usando todos os biocatalisadores. Após a otimização, os rendimentos ultrapassaram 90% para as três enzimas, mas Lipozyme TL-IM necessitou de quatro vezes mais conteúdo biocatalisador do que as outras duas preparações. Novozym 435 manteve mais de 80% de sua atividade quando reutilizado em 9 sucessivos lotes, enquanto Lipozyme RM-IM pode ser reutilizada 5 vezes e Lipozyme TL-IM apenas 3 vezes. Em geral, Novozym 435 mostrou-se mais adequada para estas reações do que as outras duas preparações de enzima.

Muitas enzimas estão envolvidas na produção de aromas. As lipases estão incluídas nas reações de esterificação e transesterificações. As esterases estão envolvidas na produção de ésteres, os álcoois acetil transferases estão envolvidas na formação de álcool. As pectinases, principalmente as pectinas liases e poligalacturonases, normalmente são produzidas durante o crescimento de algumas linhagens de fungos que produzem aromas de frutas (PASTORE & UENOJO, 2006). Dentre estas enzimas, as que possuem maior valor agregado para indústrias são as lipases que são largamente empregadas no processamento de óleos e gorduras, detergentes e desengraxantes, processamento de alimentos, síntese de produtos para química fina e fármacos, manufatura de papel e produção de cosméticos.

Além disso, destacam-se entre as principais enzimas utilizadas em biocatálise, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é limitado. Por outro lado, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente a temperatura, pH e solventes orgânicos e sua quimio-regio e enantiosseletividade (KAPOOR et al., 2012; KRIEGER et al., 2004).

O Quadro 1 apresenta alguns trabalhos citados na literatura referentes a produção de aromas e fragrâncias catalisadas por lipases.

Quadro 1. Visão geral da produção de aromas e fragrâncias catalisadas por lipases.

Ester	Enzima utilizada	Condições de Reação	Conversão	Referência
Acetato de butila	<i>Novozyme 435</i>	40°C, 3:1 (butano: ácido acético), 7,5%	90%	Martins et al., (2011)
Acetato de citronelol	Cal B	45°C, 0,5 g enzima, livre de solvente orgânico	74%	Fonteyn et al., (1994)
Acetato de geranila	RML (<i>Rhizomucos miehei</i>)	50°C, 5 h, 10%, livre de solvente orgânico	50-77%	De et al., (1999)
Acetato de geranila	Cal B	30°C, 5-100 h, n-heptano (solvente)	85%	Ikeda et al., (2001)
Acetato de isoamila	<i>Rhizomucor miehei</i>	40°C, 72 horas de reação, n-heptano (solvente)	95%	Fehèr et al., (2008) Krishna et al., (2001)
Acetato de isoamila	Cal B (<i>Candida antarctica</i>)	30°C, 150 rpm, livre de solvente orgânico	80%	Güvenç et al., (2002)
Acetato de isoamila	Novozyme 435 (<i>Candida antarctica</i>)	4-8 horas de reação, livre de solvente	75%	Güvenç et al., (2007)
Acetato de isoamila	Novozyme 435 (<i>Candida antarctica</i>)	2 horas de reação, n-hexano (solvente)	~100%	Romero et al., (2007)
Acetato de isoamila	Cal B (<i>Candida antarctica</i>)	36,5 segundos de reação, n-hexano (solvente)	35%	Polona et al., (2009)
Laurato de citronelol	Novozyme 435 (<i>Candida antarctica</i>)	2 horas de reação, heptano (solvente)	~100%	Romero et al., (2007)
Galactose oleato	Lipozyme (<i>Rhizomucor miehei</i>)	60°C, 2%, 3:1(ácido: álcool), 300 rpm e 2 horas de reação.	87%	Saupia et al., (2012)

Fonte: Autor.

2.4 Enzimas

Desde os primórdios da civilização, o homem vem explorando de forma natural a utilização de enzimas para a produção de alimentos e bebidas. A evolução dos conhecimentos técnicos e científicos propiciou a utilização de enzimas em diversos ramos de atuação da atividade humana (WANDERLEY et al., 2011).

O elevado desempenho catalítico apresentado por essas proteínas em condições brandas de reação (temperaturas amenas, pH neutros e meio aquoso/orgânico), e a sua versatilidade, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação, as torna atraentes para aplicações em processos industriais (MARZZOCO & TORRES, 1999; DALLA VECCHIA et al., 2004). Segundo Medeiros et al. (1999) a aplicação tecnológica de enzimas é bastante vantajosa por não necessitar de condições de temperatura e pressão drásticas.

O mercado mundial de enzimas foi estimado em cerca de US\$ 4 bilhões por ano (SARROUH et al., 2012). Cerca de 90% da produção anual provém das maiores empresas produtoras de enzimas, como Novozymes, com sede na Dinamarca; Gist Brocades, na Holanda; Amano, no Japão; Solvay, Pfizer e Genencor, nos Estados Unidos (SHANLEY, 1998; CASTRO et al., 2004; HASAN et al., 2006).

2.4.1 Lipases

Atualmente, as lipases têm apresentado grande importância no cenário biotecnológico, econômico e industrial. Essas enzimas são utilizadas como ferramenta tecnológica, representando uma perspectiva de desenvolvimento nos processos para obtenção de uma grande gama de produtos, entre eles os monoglicérides, ácidos graxos, agentes biotensioativos, compostos de aroma e sabor e lipídios estruturados ou modificados (TREICHEL et al., 2010).

Lipase é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C. 3.1) e que atuam sobre ligações éster (E.C. 3.1.1). As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3) pertencem a família de enzimas com maior interesse do ponto de vista prático pela sua elevada atividade e seletividade, por possuírem estabilidade relativamente elevada, por não necessitarem de cofatores dispendiosos e por operarem em condições de temperatura, pH e pressão relativamente moderadas. Das fontes produtoras de lipases, as microbianas são as de maior interesse industrial por vários motivos, entre eles, a grande variedade de microorganismos produtores deste tipo de enzimas e por serem em muitos casos facilmente obtidas comercialmente e com produtividade elevada, nomeadamente por fungos e bactérias (JAEGER & EGGERT, 2002; RAJENDRAN et al., 2009).

Lipases são amplamente utilizados em escala industrial com aplicações em alimentos,

detergentes, cosméticos e indústrias farmacêutica (BRIGIDA et al., 2014; LI et al., 2014; MURALIDHAR et al., 2002). O papel fisiológico das lipases é hidrolisar os triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol.

No que diz respeito à indústria alimentar, as reações com maior interesse são as de interesterificação, transesterificação e esterificação em meios não convencionais, na modificação de óleos e gorduras e/ou na produção de ésteres aromatizantes (RAJENDRAN et al., 2009).

As lipases também são utilizadas em processamento de alimentos no desenvolvimento de aromas e no controle de qualidade com o objetivo de modificar o aroma através da síntese de ésteres de cadeia curta de ácidos graxos e alcoóis. As de diferentes origens microbianas são utilizadas em refinarias de arroz, modificam o leite de soja e aumentaram e aceleraram a fermentação de vinhos de maçã. Também podem ser utilizadas em indústria para resolver problemas de misturas racêmicas e na produção de polímeros biodegradáveis (HASAN et al., 2006).

Lipases possuem capacidade de catalisar reações com uma grande variedade de substratos sintéticos, permitindo o seu uso para a obtenção de diversos compostos (SIQUEIRA, 2012). Dheeman et al. (2011) mostraram que a lipase de *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 é estável na presença de solventes orgânicos e é capaz de sintetizar acetato de isoamila a partir de álcool isoamílico e ácido acético com adição de n-hexano em 72 horas de reação.

2.4.1.1 Aplicação Industrial das Lipases

As lipases recebem atenção especial por parte do meio industrial devido à sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade ao substrato e representam a classe de enzimas mais amplamente empregada em aplicações biotecnológicas e química orgânica (TREICHEL et al., 2010).

O potencial de aplicações industriais dessas enzimas abrange, além da indústria de alimentos, como aditivos (modificação de aromas), a química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêutica e a área

médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos) (KAPOOR et al., 2012).

Exemplos de aplicações industriais de lipase podem ser observados no Quadro 2.

Quadro 2. Aplicação industrial de lipases

Indústria de alimentos	Efeito	Produto
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos
Panificação	Melhora o sabor/qualidade, aumenta o tempo de prateleira	Confeitos e bolos
Bebidas	Melhora o aroma e acelera a fermentação, por remoção dos lipídeos	Bebidas alcoólicas, ex: saquê, vinho e outras
Processamento de derivados de ovos	Melhora a qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	Maionese, molhos e cremes
Processamento de carnes e peixes	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gordura	Produtos embutidos
Processamento de Óleos	Transesterificação de óleos naturais; Hidrólise de óleos	Óleos e gorduras modificadas (substitui a manteiga de cacau)
Indústria Química	Efeito	Produto
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Detergentes	Remoção de óleo e gordura	Detergentes
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes.

Fonte: Castro et al. (2004) e Sharma et al. (2001).

2.5 Produção enzimática de aromas livre de solvente

A maior vantagem de um sistema livre de solvente é que a ausência deste permite a recuperação de produtos, facilitando os processos de purificação, uma vez que menos componentes podem estar presentes no meio reacional ao final da reação. Além disso, a

eliminação de solventes na produção oferece significativa redução de custos e minimiza o impacto ambiental (CHARPE et al., 2011; YADAV et al., 2012; SOROUV et al., 2012; BANSODE & RATHOD, 2014). Tem alguns estudos de investigação em matéria de sistema livre de solvente para lipase catalisada produção de éster de sabor e verificou-se que as velocidades iniciais são encontradas para aumentar em comparação com o solvente orgânico (GÜVENÇ et al., 2002; DHAKE et al., 2013).

Em adição, isto possibilita o uso de altas concentrações de substratos (GÜVENS et al., 2002; AZUDIN et al., 2013)

Além disso, são mais compactos, têm produtividade volumétrica mais elevada e exigem menores concentrações de catalisadores em relação aos reagentes (CASTRO et al., 1997; IRIMESCU et al., 2004).

A água gerada durante a reação de esterificação é considerada o principal parâmetro a ser controlado. Mesmo sob condições de baixa concentração de água, durante o curso da reação, 1mol de água é formado para cada mol de éster sintetizado. Remoção de água por diversas metodologias pode prevenir este fenômeno e auxiliar no deslocamento do equilíbrio para altas conversões (IRIMESCU et al., 2004). Segundo Gubicza et al. (2000) a produção enzimática de isoamil acetato em hexano em larga escala com contínua remoção de água utilizando Novozym 435 resultou em 95,5 % de conversão.

Macedo, Lozano e Pastore (2003) utilizaram lipase de *Rhizophus* sp. para síntese de ésteres de citronelol (butirato de citronelol, acetato de citronelol) em meio livre de solvente, com aumento na produção de 95% e 60%, respectivamente.

Martins et al. (2011) realizaram a otimização da reação de esterificação de acetato de butila catalisada por *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) avaliando os parâmetros de temperatura, razão molar de substrato, teor de enzima e adição de água. A melhor concentração de ácido para a reação, sem inativação da enzima foi determinado em 0,3M. As melhores condições para a síntese de acetato de butila foram em temperatura de 40°C, razão molar de 3:1 (butano: ácido acético), 7,5% de enzima e 0,25% de água adicionada apresentando mais de 90 % de conversão em 2,5 horas. Também foi avaliada a reutilização da enzima após três diferentes tratamentos: lavagem com n-hexano ou água e suspensão da enzima imobilizada em água durante 24 horas. A enzima com lavagem com n-hexano permitiu reutilização de 6 ciclos mantendo 70% da atividade enquanto que com os outros dois

tratamentos houve rápida diminuição na atividade.

Kuperkar et al. (2014) avaliaram parâmetros cinéticos da síntese de propionato de isobutilo por esterificação de ácido propiônico com álcool isobutílico usando lipase imobilizada Novozym 435 em um sistema livre de solvente (SFS). Conversão mais elevada de 92,52% foram obtidas com as condições de reação: temperatura 40 °C, enzima 5% w / w, razão molar de (ácido: álcool) 1: 3, o tempo de 10 h e velocidade de agitação de 300 rpm. Avaliaram também a reutilização da enzima, obtendo 83% de conversão em 7 ciclos.

Bansode & Rathod (2014) estudaram a aplicação de ultra-som para a síntese de butirato de isoamila utilizando enzima lipase de *Cândida antarctica* para catalisar álcool isoamílico e ácido butírico num sistema isento de solvente e otimizar vários parâmetros que afetam a enzima catalisada por reação na presença do ultra-som para obter o máximo de conversão. A otimização se deu em 25 kHz de frequência com potência de 70 W, temperatura de 60°C, velocidade de agitação de 80 rpm, razão molar de 2:1 (álcool: ácido), peneiras com peso de 2g, com carga de enzima imobilizada de 2% e ciclo de trabalho de 83%. A máxima conversão (96%) se deu em 3h, em comparação com 10 h na ausência de ultra-som. O biocatalisador imobilizado, Novozym 435 tem uma capacidade de reutilização até 7 ciclos repetitivos.

2.6 Produção de Aromas a Partir de Álcoois Monoterpênicos

Vários trabalhos encontrados na literatura relatam a síntese de ésteres a partir de ácidos carboxílicos e álcoois monoterpênicos via catálise enzimática em meio orgânico e em sistemas livres de solventes.

Vários alcoóis e aldeídos terpênicos assim como seus derivados são utilizados como aromatizantes e são produtos de diversas biotransformações conhecidas (DUETZ et al., 2003; KASHI et al., 2007). Álcoois terpênicos possuem aroma floral ou cítrico, quando diluídos. A concentração destes compostos no meio é fator determinante na percepção final do aroma, muitas vezes compostos com aromas fortes e desagradáveis quando concentrados; ao serem diluídos apresentam características suaves e agradáveis. Diferentes propriedades organolépticas podem desta forma, ser atribuídas ao mesmo composto (FENAROLI, 1975). Alguns compostos monoterpênicos utilizados na indústria de aromas e fragrâncias, encontram-se relacionados no Quadro 3.

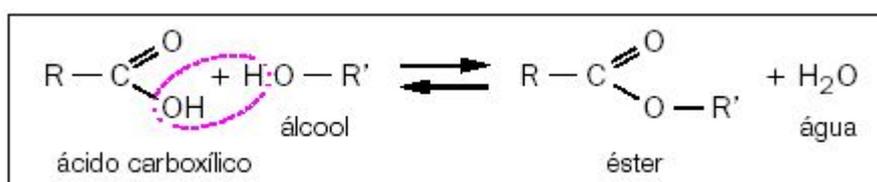
Quadro 3. Compostos monoterpênicos e suas propriedades organolépticas.

Composto	Estrutura	Propriedades organolépticas
Citronelol		Refrescante, suave, aroma de rosa, sabor amargo.
Geraniol		Aroma de rosa, doce, quente, seco.
Nerol		Refrescante, doce, aroma de rosas.
Linalol		Suave, doce, frutas cítricas, suave, floral.
Mentol+		Refrescante, menta.
Isopulegol		Menta suave, sabor amargo, aroma de ervas.
α -terpineol		Docemente floral, fragrância de violeta, aroma de frutas quando diluído.

Fonte: Heath, (1978) e Janssens et al. (1992).

Estes álcoois são utilizados como material de partida em sínteses de outras fragrâncias. Ésteres obtidos a partir de álcoois terpênicos via biotransformação podem ser amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, cosméticos e em formulações farmacêuticas.

A reação de esterificação é a reação de um ácido carboxílico com um álcool, produzindo um éster e água, conforme mostra o esquema abaixo.

Figura 1. Esquema geral da reação de esterificação

Karra-Chaâbouni et al. (1996) estudaram a produção enzimática de butirato de geranila e valerato de geranila em sistema livre de solvente. Utilizando a esterase produzida por *Mucor miehei*, em 75 horas de reação, razão molar ácido/álcool de 1:1, 37°C, 250rpm, com adição de 10% de enzima não imobilizada (g/g substratos), obtiveram 85% de conversão. Os efeitos da razão molar, da temperatura, da agitação e da adição inicial da água na produção

de butirato de geranila foram investigados pelo mesmo grupo de pesquisadores (KARRA-CHAÂBOUNI et al., 1998). Os autores chegaram à conclusão de que a esterase perde sua atividade irreversivelmente a 60°C e que a adição de água diminui a taxa de conversão depois de 75 horas de reação. A atividade da enzima aumenta linearmente com a cadeia do ácido e do álcool utilizado. Além disso, foi observado que a lipase de *Rhizopus javanicus* não possui nenhuma correlação entre atividade hidrolítica e sintética. Este exemplo mostra que a capacidade hidrolítica da lipase não pode ser utilizada para prever a capacidade da enzima em catalisar reações de esterificação.

Segundo Kyung-Ah et al. (2008) monoterpenos são encontrados na essência volátil de flores, plantas, óleos e ervas medicinais. Alguns são vulgarmente utilizados como aditivos alimentares e componentes de fragrância, e muitos são encontrados em cosméticos, sabonetes, produtos de limpeza, desinfetantes, conservantes e medicamentos. Monoterpenóides são compostos presentes na essência volátil de várias plantas e ervas medicinais, e que são usados como aditivos de sabor em alimentos, bebidas, perfumes (CARNESECCHI et al., 2001).

A síntese de acetato de geranila em n-hexano catalisado pela lipase comercial preparada a partir de *Candida antarctica* foi realizado por Bartling et al. (2001). A conversão de equilíbrio foi de 94%, razão molar dos substratos 1:1 e temperatura de 30°C. Para a remoção seletiva da água formada durante o processo de esterificação foram testadas membranas com compósito cerâmico/acetato de celulose que permitiu deslocamento de reação para os produtos atingindo 100% de conversão.

Habulin et al. (2007) estudaram a esterificação direta do ácido láurico e citronelol catalisada pela lipase imobilizada *Candida antarctica* B com dióxido de carbono supercrítico com diferentes solventes líquidos orgânicos e iônicos. A concentração mais elevada de laurato de citronelol após 1 h de desempenho de reação (substratos de 3,95 mmol / g) foi obtido em CO₂ supercrítico com acetato de metilcetona como solvente. A temperatura e pressão otimizadas para a síntese de laurato de citronelol em CO₂ supercrítico médio foi de 60°C e 10MPa.

Chiaradia et al. (2012) otimizaram a conversão de eugenol por meio da catálise enzimática utilizando lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* como catalisador e anidrido acético como agente acilante. A melhor conversão foi de 99% usando razão molar anidrido/eugenol 3:1, concentração de enzima 5,5% (m/m substratos) e 50°C após de 6 horas

de reação. Compostos obtidos por catálise enzimática ou por ação microbiana podem ser considerados “naturais”, fato que promove grande aceitação por parte do consumidor, agregando, dessa forma, maior valor aos produtos que utilizam esses aromatizantes produzidos biotecnologicamente.

Exemplos relativos à aplicação de álcoois primários como substratos para as reação de síntese catalisada por lipase pode ser encontrada na literatura (KOBBLITZ, 2003 e DALLA-VECHIA et al., 2004). No entanto, uma ampla investigação da literatura disponível nos permitiu observar a falta de informações sobre a produção de butirato de geranila, por meio de esterificação enzimática de geraniol e ácido butírico usando uma lipase comercial como catalisador.

2.7 Mecanismo Cinético de Esterificação Enzimática

O modelo Ping-Pong Bi-Bi é usualmente o mais utilizado para o estudo da cinética das reações catalisadas por lipases por representar os efeitos da inibição da enzima por espécies presentes na reação (VARMA et al., 2010; DOSSAT et al., 2002; AL-ZUHAIR et al., 2006). As taxas de uma reação enzimática são fortemente influenciadas por fatores como: concentração de substrato, concentração de enzima, pH e temperatura (DOSSAT et al., 2002; AL-ZUHAIR et al., 2006). O modelo Bi Bi descreve a generalização da reação de dois substratos e dois produtos, onde a formação do produto ocorre somente após a formação do complexo substrato-enzima, descrevendo um mecanismo especializado em que a ligação de substrato e liberação dos produtos é ordenada.

No mecanismo sequencial, todos os substratos devem se combinar com a enzima antes da reação ocorrer. Além disso, o mecanismo sequencial pode ser caracterizado como ordenado ou aleatório; por outro lado, a ordem de combinação dos substratos e da liberação não é obrigatória. De forma geral, no mecanismo da reação de esterificação, cada etapa do processo deve ser observada separadamente como um mecanismo próprio (PAROUL, 2011).

Em se tratando de um processo biológico, é fundamental considerar um fator que pode influenciar o processo global, a presença de inibidores no meio reacional. Os mesmos afetam diretamente a velocidade da reação e podem vir a ser uma das substâncias que participam da reação, quer como produto, quer como substrato. Portanto, no estudo da cinética de reações, o

fator que se mostra essencial para fornecer dados sobre a influência das concentrações iniciais e a visualização da velocidade de consumo dos substratos é o cálculo da velocidade inicial da reação, pois este se constitui no único momento em que todas as condições experimentais são conhecidas (BORZANI, 2001).

Neste tipo de mecanismo, o grupo a ser transferido é primeiro deslocado do substrato A pela enzima E para formar o produto P e uma forma modificada da enzima (F). Em seguida ocorre a transferência de F para o segundo substrato B, formando-se o produto Q e regenerando-se E (MURRAY et al., 2003). O primeiro passo é o de acilação, o primeiro substrato a ligar-se à enzima será o que fornece o grupo acila ($R-CO-$) sendo designado por agente acilante (DAGGETT et al., 1991; HEDSTROM, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, são descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais adotados durante a fase experimental deste trabalho, relacionado à otimização da conversão de reação de esterificação enzimática para obtenção de bioaromas usando como substrato álcoois primário (geraniol) e ácido butanóico em sistemas livres de solvente.

3.1 Materiais

3.1.1 Reativos

Foram utilizados neste trabalho o geraniol (97% de pureza) da VETEC, o ácido butanóico (97% de pureza) da QUIMEX e peneiras moleculares 4Å (SIGMA-ALDRICH).

3.1.2 Enzima

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a lipase comercial de *Candida antarctica* imobilizada em três suportes diferentes. A Novozyme 435 imobilizada em resina aniônica macroporous, a Lipozyme 435 imobilizada em resina acrílica e a lipase Cal B imobilizada *in situ* em suporte rígido de poliuretano. A lipase CAL B (Novozyme NZL-102) foi adquirida na forma liofilizada e imobilizada por Nyari (2013). Todas as enzimas foram adquiridas da empresa Novozymes Latin América Ltda.

O procedimento de imobilização da lipase CAL B *in situ* em suporte rígido de poliuretano (PU) foi realizada adicionando 20 % da enzima diluída (20 % (v/v) em água) ao monômero poliálcool poliéter (60 %), em seguida (40 %) de isocinato (tolueno diisocianato - TDI) em recipiente de polietileno (copo plástico) e agitado com auxílio de um bastão de vidro. Após a expansão da espuma e completa solidificação do imobilizado (± 5 min), é deixado em repouso por 24 horas (Nyari, 2013).

3.2 Determinação do tempo reacional para produção de butanoato de geranila

Para determinar o tempo de reação necessário para síntese enzimática de butanoato de geranila foi realizado um estudo preliminar na condição otimizada por Paroul et al. (2010) usando Novozyme 435, Lipozyme 435 e Cal B (PU). A mistura reacional formada por geraniol, ácido butanóico (razão molar álcool/ácido 3:1), enzima (5% m/m substratos) e peneiras moleculares (20mg x mL⁻¹ dos substratos) foi deixada em *shaker* com agitação constante de 150 rpm e temperatura de 50°C até 6 horas de reação. As alíquotas de 100 µL foram retiradas do meio reacional nos intervalos de 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 e 6 horas.

Também realizou-se um ensaio sem adição de enzima, apenas com geraniol, ácido butanóico e as peneiras moleculares.

3.3 Otimização da produção de butanoato de geranila

Para determinar as condições experimentais que otimizam a síntese de butanoato de geranila, um Delineamento Composto Central Rotacional 2³ (DCCR) foi realizado para cada enzima estudada totalizando, 17 ensaios. 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 e triplicata do ponto central sem adição de peneiras moleculares para avaliar a necessidade de utilização das mesmas.

Tabela 1. Variáveis e níveis do DCCR 2³ para produção enzimática de butanoato de geranila.

Variáveis/Níveis	Razão Molar (mol/mol) (geraniol/ácido butanóico)	Temperatura (°C)	Concentração de Enzima (% m/m substrato)
-1,68	0,36:1	16,4	0,025
-1	1:1	30	1
0	3:1	50	5,0
1	5:1	70	10
1,68	6,36:1	83,4	13,06

3.4 Procedimento experimental para a produção de butanoato de geranila

Esta etapa foi realizada preparando uma mistura reacional formada por geraniol e

ácido butanóico, nas razões molares determinadas no delineamento experimental (Tabela 1). Após a dissolução completa dos substratos, foram adicionadas as peneiras moleculares (2% em peso de substratos) e enzima, conforme a Tabela 1. Todos os experimentos foram realizados em *shaker* com agitação constante de 150 rpm. Após o término de reação (4 horas) o biocatalisador foi filtrado com papel filtro e as amostras foram mantidas a 5°C para posterior determinação de conversão da reação.

3.5 Estudo cinético para a produção de butanoato de geranila

Após otimizar as condições experimentais para a produção de butanoato de geranila utilizando as enzimas Novozym 435 e Cal B (PU), foi realizado um estudo para avaliar os efeitos da razão molar (RM), da concentração da enzima [E] e da temperatura (T) na cinética da reação. Alíquotas de 100 µL foram retiradas do meio reacional no tempo 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3 e 4 horas.

As razões molares, concentrações da enzima [E] (%) (m/m substratos) e temperaturas utilizadas no estudo são apresentadas nas Tabelas 2, 3 e 4 respectivamente.

Tabela 2. Efeito da razão molar na produção enzimática de butanoato de geranila utilizando a Novozyme 435 e Cal B (PU).

Temperatura (°C)	[E] (% m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (geraniol/ácido butanóico)
70	10	1:1; 5:1; 10:1; 15:1

Tabela 3. Efeito da concentração de enzima na produção enzimática de butanoato de geranila utilizando Novozyme 435 e Cal B (PU).

Temperatura (°C)	[E] (% m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (geraniol/ácido butanóico)
70	0; 5; 10; 15	5:1

Tabela 4. Efeito da temperatura na produção enzimática de butanoato de geranila utilizando a Novozyme 435 e Cal B (PU).

Temperatura (°C)	[E] (% m/m substratos)	Razão Molar (mol/mol) (geraniol/ácido butanóico)
25; 40; 70	10	5:1

3.6 Determinação da conversão da reação

A quantificação do butanoato de geranila foi realizada por cromatografia gasosa em equipamento Shimadzu GC-2010 equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna capilar RTX-WAX restek (30m x 250um i.d.), 0,25um de espessura de filme, detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 40°C (5min); 40-180°C (10min); 180°C (5min), temperatura do injetor 250°C, detector a 275°C, modo de injeção split, razão de split 50:1, gás de arraste H₂ (56KPa), volume injetado 0,4uL de amostra diluída em dicloro metano (1:10). A determinação da conversão das reações foi feita acompanhando a redução da área do sinal do agente limitante (PAROUL et al., 2011).

3.7 Determinação da velocidade específica para a produção de butanoato de geranila

A velocidade específica de reação foi calculada através da Equação 1 (HAGEN, 2006).

$$V = m/(mc.t) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

v: velocidade específica da reação (g.g⁻¹.h⁻¹);

m: massa da substância convertida (g);

mc: massa de catalisador (g);

t: tempo (h)

3.8 Análise Estatística

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).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo referente ao processo de produção enzimática de ésteres utilizando as lipases comerciais Novozyme 435 e Lipozyme 435 e a lipase Cal B (PU) como catalisador em sistema livre de solvente. Serão primeiramente apresentados os resultados obtidos e, em seguida, os resultados encontrados na literatura em assuntos correlatos. Tal forma de apresentação permitirá, ao final do presente documento, dispor as conclusões delineadas a partir do desenvolvimento do trabalho, embasadas pelos dados já apresentados na literatura disponível.

4.1 Determinação do tempo de reação para a produção de butanoato de geranila

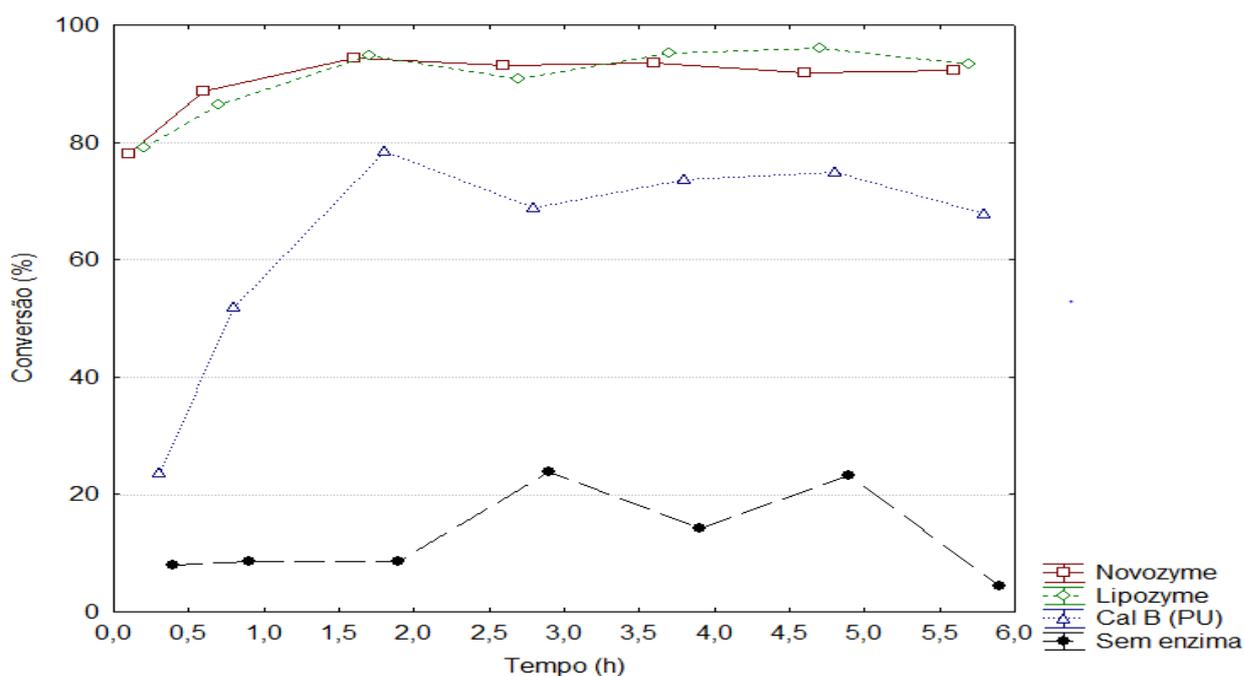
O butanoato de geranila é um éster com fórmula molecular $C_{14}H_{24}O_2$, de peso molecular 224,35, que se encontra na natureza e tem um odor frutado, semelhante ao de cereja. É usado como um agente de sabor e aroma, sintetizado utilizando lipases em sistemas com solventes (SHIEH et al., 1996) ou sistema livre de solvente (KARRA - CHAABOUNI et al., 2002). Em estudos realizados, butanoato de geranila foi produzido em rendimentos entre 85 e 99,9%, utilizando lipases livres ou imobilizadas (CLAON et al., 1993; MOLINARI et al., 1995; SHIEH et al., 1996).

Para determinar o tempo reacional necessário para obter a produção máxima de butanoato de geranila foi realizado um estudo preliminar com as enzimas Novozyme 435, Lipozyme 435 e Cal B (PU) nas condições otimizadas por Paroul et al. (2010) com temperatura 50°C, razão molar geraniol/ ácido butanóico 3:1 e concentração de enzima 5%. Segundo Shih et al. (2007) a seleção de intervalo de tempo de reação necessita ser extremamente preciso no estudo DCCR, caso contrário, a condição ideal da síntese não pode ser encontrada dentro da região experimental através da análise de estatística e gráficos de contorno.

Como pode ser observado na Figura 2, a conversão máxima foi obtida após 2 horas de reação para as três enzimas testadas. As lipases Novozyme 435 e Lipozyme 435 apresentaram maior atividade enzimática chegando à conversão acima de 90% na produção de butanoato de geranila. A lipase Cal B (PU) também demonstrou uma boa atividade enzimática com 80% de rendimento.

A reação de esterificação sem biocatalizador levou a produção máxima de 20% de butanoato de geranila após 3 horas de reação. Portanto, a partir dos resultados obtidos nessa etapa do trabalho o tempo reacional foi fixado em 2 horas de reação e como não houve diferença na atividade enzimática entre Novozyme 435 e Lipozyme 435 optou-se por usar somente a Novozyme 435 e a Cal B (PU) na sequência do trabalho.

Figura 2. Conversão de butanoato de geranila em função do tempo de reação quando utilizadas as enzimas Novozym 435, Lipozym 435, Cal B(PU) e reação sem enzima.



Resultados semelhantes foram obtidos por Paroul et al. (2010) ao avaliarem a influência das variáveis independentes (temperatura, substratos razão molar e concentração de enzima) na produção de oleato de geranila e propionato de geranila usando a enzima imobilizada comercial Novozyme 435, em sistema livre de solvente. Sendo a maior conversão de 98% para oletato de geranila e 90% de propionato de geranila depois de 1 h de reação.

Shih et al. (2007) estudaram o tempo de reação na esterificação de L-mentol com anidrido butírico para a lipase AY – 30. A conversão aumenta em 80% em 12 horas de reação, por conseguinte, o intervalo de tempo de reação de 10 – 20 horas foram escolhidas para continuar os estudos.

Kuperkar et al. (2014) estudaram o tempo de reação para a síntese de propionato de isobutil utilizando a lipase Novozyme 435 em sistema livre de solvente com temperatura de 40°C, 200 rpm, 5% de enzima e razão molar de 1:1 e observaram que a percentagem de

conversão aumentou com o tempo obtendo 82% em 8 horas de reação. Resultados estes com menor % de conversão e maior tempo reacional quando comparados aos obtidos no presente estudo.

4.2 Otimização de produção de butanoato de geranila

Visando avaliar o efeito das variáveis independentes na produção de butanoato de geranila, um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^3 completo foi realizado. As variáveis estudadas foram concentração de enzima ([E]) (% m/m em relação aos substratos), razão molar (RM) geraniol/ácido butanóico e temperatura ($^{\circ}\text{C}$). A Tabela 5 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis independentes e as conversões de butanoato de geranila para a enzima comercial Novozyme 435 e Cal B (PU). Para avaliar o efeito das peneiras moleculares usadas para absorção de água formada durante a reação foram realizados três ensaios adicionais no ponto central sem uso das mesmas. A partir da Tabela 5 pode ser observado que as maiores conversões foram obtidas nas temperaturas mais altas, excesso de álcool e maiores concentrações de enzima.

As melhores respostas em termos de rendimento (Tabela 5) para a lipase Novozyme 435 e CAL B (PU) foram obtidas nos ensaios 8 (~94%) e 10 (~93% e 87%) que correspondem a temperatura de 70 e $83,6^{\circ}\text{C}$, excesso de geraniol 5:1 e 3:1 e concentração de enzima de 10 e 5%, respectivamente.

A temperatura apresenta um dos principais papéis em sistema reacional. Em primeiro lugar em função de aumento das colisões entre substratos e biocatalisador (SHINDE & YADAV, 2015). Em segundo lugar, as enzimas possuem uma temperatura ótima de atuação, que no caso a Novozyme 435 e da Cal B (PU) encontra-se entre 40°C e 70°C (RICHETTI, 2009).

A razão molar álcool/ ácido é outro parâmetro importante em reação de esterificação uma vez que a reação é reversível. Segundo Chiaradia et al. (2012) e Azudin et al. (2013) um excesso de álcool pode afetar positivamente o processo de conversão. Kanwar et al. (2008), utilizaram a lipase *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC-4713) imobilizada em hidrogel sintético para síntese de butanoato de geranila e observaram que houve um aumento na conversão quando aumentou a concentração molar do geraniol.

Alta concentração de álcool (nucleófilo/receptor de acila) geralmente leva a níveis mais elevados de conversão devido à disponibilidade de excesso de nucleófilo para transferência do substrato. Porém, Güvenç et al. (2002) relatam que existe um limite para adição do mesmo e que o excesso do nucleófilo acima desse nível crítico pode resultar em taxas iniciais de reação mais baixas por causa da formação de ligações entre o álcool e o sítio ativo da enzima. Este comportamento pode ser observado nos ensaios 11 e 12 da Tabela 5.

Tabela 5. Matriz do Planejamento Experimental com os valores reais e codificados das variáveis independentes e a conversão de butanoato de geranila utilizando a enzima comercial Novozyme 435 e Cal B (PU).

Ensaio	Temp (°C)	RM (geraniol/ácido butanóico)	[E] %	Conversão Novozyme 435 (%)	Conversão Cal B (PU) (%)
1	-1 (30)	-1 (1:1)	-1 (1)	40,36	64,05
2	1 (70)	-1 (1:1)	-1 (1)	45,56	83,32
3	-1 (30)	1 (5:1)	-1 (1)	56,81	53,45
4	1 (70)	1 (5:1)	-1 (1)	87,69	74,54
5	-1 (30)	-1 (1:1)	1 (10)	83,70	26,64
6	1 (70)	-1 (1:1)	1 (10)	84,46	43,6
7	-1 (30)	1 (5:1)	1 (10)	91,56	85,24
8	1 (70)	1 (5:1)	1 (10)	93,95	94,12
9	-1,68(16,4)	0 (3:1)	0 (5,0)	79,31	53,96
10	1,68 (83,6)	0 (3:1)	0 (5,0)	93,51	87,34
11	0 (50)	-1,68 (0,36:1)	0 (5,0)	64,40	54,5
12	0 (50)	1,68 (6,36:1)	0 (5,0)	85,68	84,25
13	0 (50)	0 (3:1)	-1,68 (0,025)	29,5	26,07
14	0 (50)	0 (3:1)	1,68 (13,06)	90,99	86,82
15	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,0)	91,09 ^a	73,57 ^a
16	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,0)	85,98 ^a	73,84 ^a
17	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,0)	87,88 ^a	84,03 ^a
18*	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,0)	87,09 ^a	84,59 ^a
19*	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,0)	92,07 ^a	77,17 ^a
20*	0 (50)	0 (3:1)	0 (5,0)	88,45 ^a	83,86 ^a

*Sem adição de 2% de peneiras moleculares.

O aumento da concentração das enzimas de 10 para 13,06% não acarretou aumento na conversão. Uma possível explicação para este fato é a hipótese de que um excesso de enzima

no meio reacional pode não colaborar com um aumento da conversão em função da formação de agregados e uma distribuição não homogênea da enzima no caso da Cal B (PU). As moléculas de enzima localizadas na superfície externa desses aglomerados são expostas a altas concentrações de substratos, mas o transporte de massa dentro das partículas de biocatalisador pode drasticamente limitar a concentração de substratos no interior dessas partículas. Assim, menores atividades de uma fração de biocatalisador reduzem a eficiência por unidade de massa do biocatalisador e não aumenta a conversão (KARRA-CHAABOUNI et al., 2006).

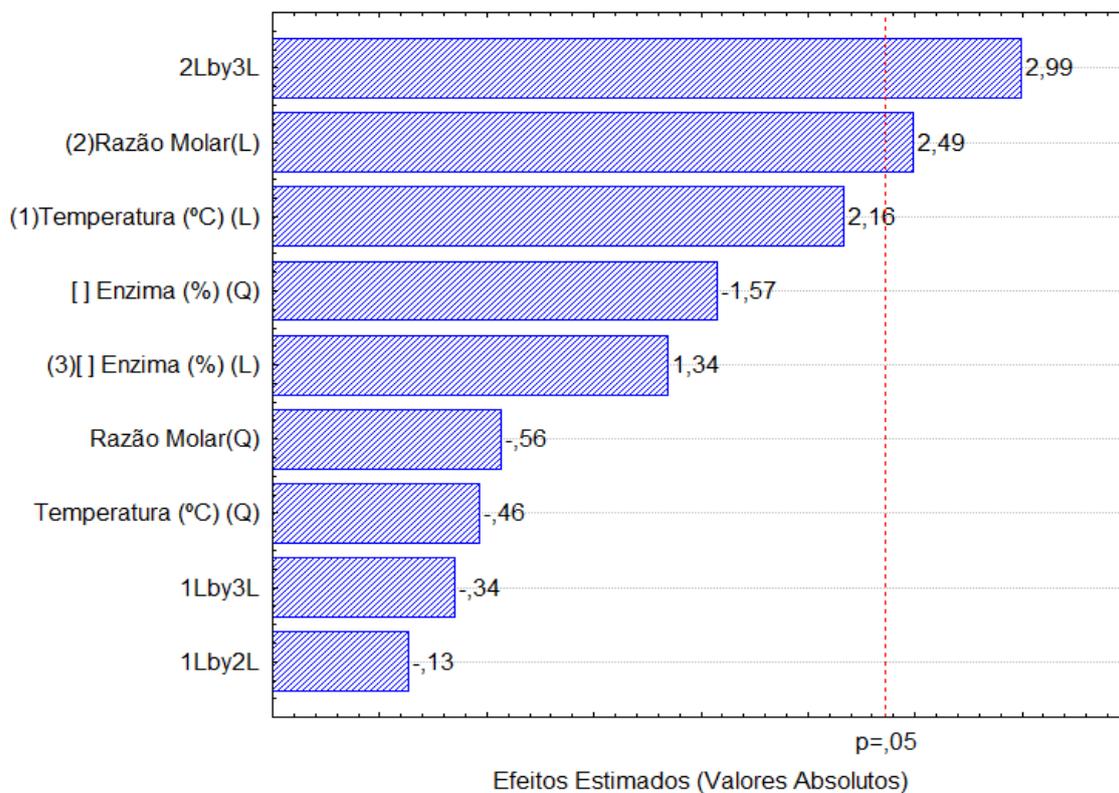
Para avaliar o efeito das peneiras moleculares, usadas para absorção de água formada durante o processo da esterificação, foi realizado um ensaio em triplicata do ponto central e realizado o teste de Tukey. Como pode ser observado (ensaios 18, 19 e 20, Tabela 5) uso das peneiras não aumentou a conversão da reação, sendo que para a Novozyme 435 a média, segundo o teste de Tukey, para os ensaios com peneiras (ensaios 15, 16 e 17, Tabela 5) é de $88,32 \pm 2,58$ e para os ensaios com peneiras (ensaios 18, 19 e 20, Tabela 5) a média é de $89,20 \pm 2,57$. Para a Cal B (PU) os resultados foram semelhantes, os ensaios com peneiras apresentaram média de $77,15 \pm 5,96$ e para os ensaios sem peneiras, $81,87 \pm 4,09$. Kanwar et al. (2008) utilizaram peneiras moleculares na síntese de butanoato de geranila catalisada pela lipase de *Pseudomonas aeruginosa* e verificaram que 1 % de peneira molecular aumenta a conversão em éster em apenas 2 % após 15 horas de reação. Segundo Adnani et al. (2010), o efeito negativo na conversão por adição de peneiras moleculares em reações de esterificação pode estar relacionado à retirada da água imprescindível para a atividade enzimática.

Os resultados das conversões em butanoato de geranila usando Novozyme 435 e CAL B (PU) (Tabela 5) foram tratados estatisticamente. Os efeitos absolutos das variáveis independentes estão apresentados na forma de Gráfico de Pareto na Figura 2 para CAL B (PU).

Depois de 2 horas de reação a temperatura (Linear), a concentração de enzima (Linear) e a razão molar (Linear) apresentaram efeitos significativos positivos para produção de butanoato de geranila usando a enzima Novozyme 435, com nível de confiança de 95%

Para enzima CAL B (PU) somente a razão molar (Linear) e interação entre razão molar e concentração de enzima apresentaram efeitos significativos positivos ($p < 0.05$) (Figura 3).

Figura 3. Gráfico de Pareto para os efeitos: razão molar, temperatura e concentração de enzima na produção de butanoato de geranila ($p > 0,05$) usando Cal B (PU).



A análise estatística dos resultados obtidos no planejamento experimental validou os resultados obtidos somente para Novozyme 435. Os efeitos das variáveis independentes estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Coeficientes de regressão para a esterificação enzimática de butanoato de geranila.

Parâmetros	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	P
Média	88,31532	2,648199	0,000000
Temperatura (L)	4,62345	1,244344	0,007497
Temperatura (Q)	-0,67104	1,370866	0,639401
Razão Molar (L)	8,18483	1,244344	0,000311
Razão Molar (Q)	-4,69953	1,370866	0,011008
[Enzima] (L)	16,60363	1,244344	0,000003
[Enzima] (Q)	-9,94152	1,370866	0,000170
Temp x RM	3,41375	1,625096	0,073782
Temp X [Enzima]	-4,11625	1,625096	0,039054
RM x [Enzima]	-5,15375	1,625096	0,015673

Os dados obtidos permitiram a obtenção de um modelo matemático codificado para a conversão enzimática de geraniol em função da temperatura, razão molar e concentração de enzima (Equação 2).

$$\text{Conversão (\%)} = 88,31 + 4,62T + 8,18*MR - 4,69*MR^2 + 16,60*[E] - 9,94*[E]^2 - 4,12*T*[E] - 5,15*MR*[E]$$

Equação 2

Onde: T – temperatura (°C); RM – razão molar (geraniol: ácido butanóico); [E] – concentração de enzima (%).

Análise de variância (ANOVA) está apresentada na Tabela 7. Verificou-se que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,97 e o teste F (F calculado (34,97) maior que o F tabelado (3,63)) validaram estatisticamente o modelo ($p < 0,05$) para a produção de butanoato de geranila na faixa investigada e permitiram a construção da superfície de resposta e curva de contorno, apresentados na figura 4 e 5, respectivamente.

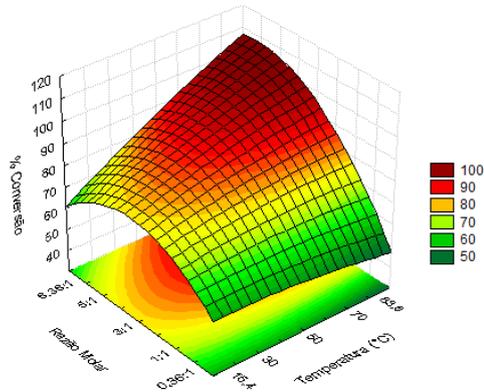
Tabela 7. Análise de variância para a produção de butanoato de geranila.

	SQ	GL	QM	F calc
Regressão	6650,20	9	738,91	34,97
Resíduo	147,92	7	21,13	
Total	6798,094	16		

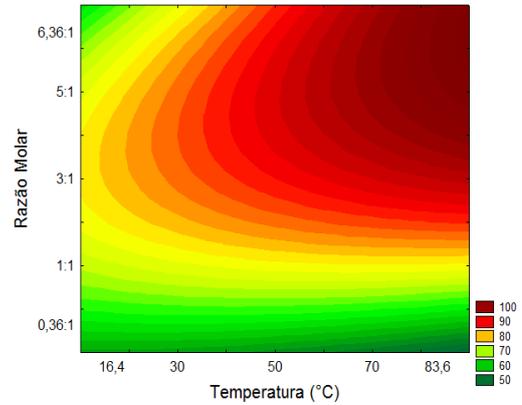
$R^2 = 0,97$ $F_{tab} = 3,63$ $p < 0,05$

O modelo da Equação 2 mostra que as variáveis: temperatura (linear), razão molar (linear) e concentração de enzima (linear) apresentam os efeitos significativos positivos ($p < 0,05$) e a interação entre a temperatura e concentração de enzima assim como a interação entre razão molar e concentração de enzima, efeitos negativos sobre a síntese de butanoato de geranila. Este modelo foi capaz de representar bem os dados experimentais de conversão de geraniol e ácido butanóico no intervalo dos fatores investigados, o qual permitiu a construção da superfície de resposta apresentada na Figura 4 e do diagrama de conversões preditas x observadas apresentado na Figura 5.

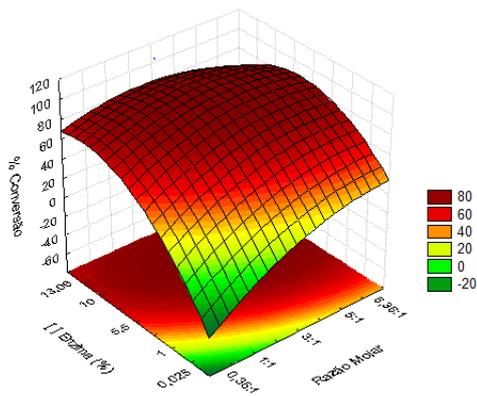
Figura 4. Superfície de resposta (a, c e d) e curva de contorno (b, d e f) para a produção de butanoato de geranila utilizando Novozym 435 (a e b) em função da razão molar e temperatura, (c e d) em função de concentração de enzima e razão molar e (e e f) em função da concentração de enzima e temperatura.



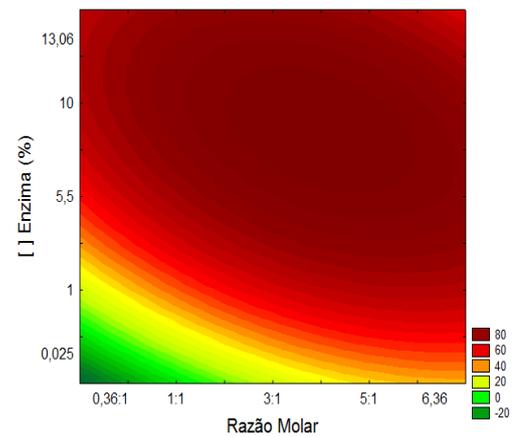
(a)



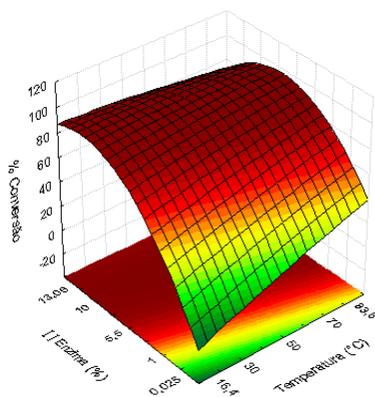
(b)



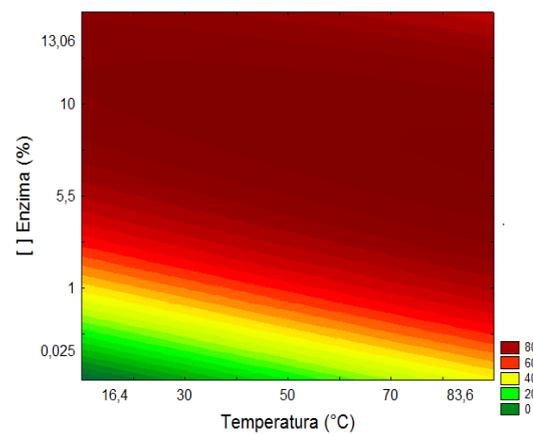
(c)



(d)

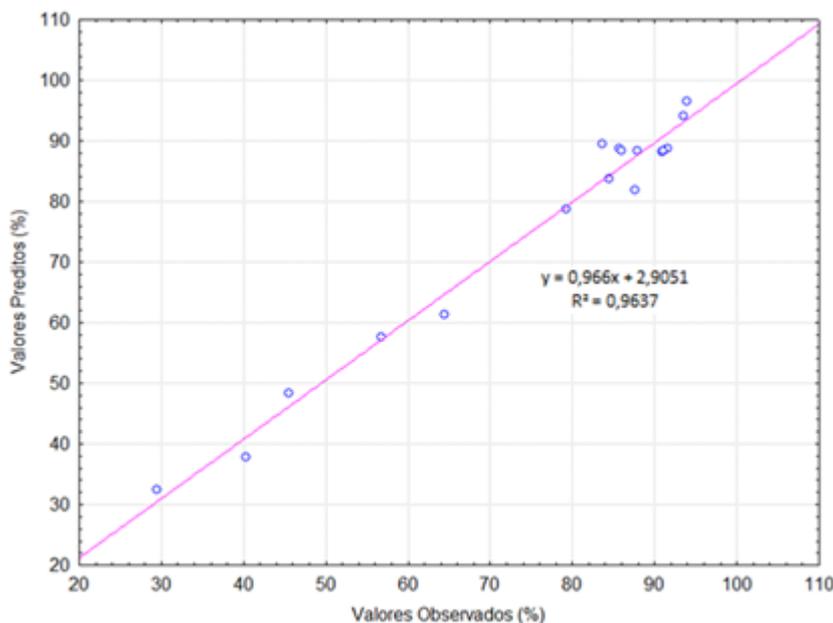


(e)



(f)

Figura 5. Diagrama de conversões previstas x conversões observadas para a produção de butanoato de geranila via esterificação enzimática.



Como pode ser observado na Figura 4, as maiores conversões foram obtidas com excesso de geraniol, maior concentração de enzima e temperatura mais altas, porém, a Figura 4(e) mostra que usando a concentração da enzima acima de 10 % a reação pode ser conduzida a temperatura ambiente o que vai permitir uma considerável economia de energia.

Existem vários relatos na literatura sobre a esterificação enzimática de álcoois monoterpênicos em sistemas com e sem solventes (BARTLING et al., 2001; MELO et al., 2005, SHIH et al., 2007; LIAW & LIU, 2010, DHAKE et al., 2011, SUN et al., 2012; VANIN et al., 2014). Shinde & Yadav (2015) estudaram os efeitos de diferentes parâmetros operacionais tais como: biocatalisador, solvente e temperatura para a transesterificação de cinamato de etilo e de geraniol em catálise enzimática e irradiação de micro-ondas. As condições otimizadas foram: 60 mg de enzima; temperatura de 65 °C; velocidade de agitação de 300 rpm e razão molar de 1: 2. Dados obtidos a partir da análise de taxas iniciais das reações apontam que a biocatálise ocorre por Ping – Pong bi-bi.

Esterificação direta de álcool terciário (α -terpineol) com anidrido acético foi realizada por Liaw & Liu (2010) usando lipases imobilizadas *Candida rugosa* type VII, Amano PS, Amano AP-6, Amano G and Lipozyme RM IM como biocatalisadores em CO₂ supercrítico e n-heptano como co-solvente. O rendimento de 53,1% de terpenil acetato foi obtido em 1,5 hora de reação à temperatura 50°C e pressão 10MPa. Dados obtidos a partir da análise de

taxas iniciais das reações também demonstraram que a biocatálise ocorre pelo mecanismo Ping-Pong bi-bi.

Outros estudos apresentados na literatura relatam a esterificação enzimática em sistema livre de solvente com diferentes ácidos graxos e álcoois. Gunvenç et al. (2002) estudaram a produção enzimática de acetato de isoamila em sistema livre de solvente e obtiveram 80% de conversão nas condições de 5% (m/m substratos) com Novozyme 435, razão molar (álcool: ácido) de 2:1, temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e 6 horas de reação. Utilizando a enzima comercial Novozyme 435. Santos et al. (2007) avaliaram a síntese de ésteres butil em sistema livre de solvente, onde a mais alta proporção obtida correspondeu a 49% utilizando ácido butanóico como agente acilante.

Castro et al. (1997) estudou a síntese de ésteres terpenóides por via esterificação enzimática, a influência do comprimento da cadeia do ácido e a estrutura dos ácidos terpênicos. O estudo foi realizado utilizando ácidos graxos de 2 a 18 átomos de carbono, sendo que as taxas de esterificação foram de 95 e 98% para ácidos com quatro ou mais átomos de carbonos. Num segundo estudo, realizou diferentes testes com álcool terpênico, usando ácido butanóico. É importante salientar, que a estrutura do álcool mostrou alta influência na velocidade de reação, uma vez que foi obtido mais de 95% de conversão para álcoois primários (citronelol) e (geraniol) e álcoois secundários (mentol) e (linalol). As condições experimentais testadas por Castro et al. (1997) para a esterificação dos álcoois primários, secundários e terciários foram realizadas utilizando a enzima Lipozyme IM como catalisador (10% em peso em relação à massa total de substratos), 45°C, 24 horas e 150 rpm com n-heptano como solvente. Os autores também realizaram experimentos em sistema livre de solvente. Como resultados, obtiveram que com a utilização de n-heptano como solvente, os álcoois terciários não são esterificados.

4.3 Estudo cinético para a produção enzimática de butanoato de geranila

Os efeitos da razão molar de substratos, temperatura e concentração de enzima foram investigados sobre a cinética de produção de butanoato de geranila. Como apresentado anteriormente, a execução de modelos experimentais com as variáveis acima mencionadas revelou a obtenção de altas conversões em 2h de reação a 70°C, substratos razão molar de 5: 1 e 10% em peso de enzima. Pode ser importante mencionar que os resultados cinéticos

posteriormente apresentados neste trabalho são, na verdade valores médios de corridas em triplicata, o que resultou em um desvio absoluto global em termos de conversão da reação de cerca de 5%. Dispersão nos dados cinéticos observados na esterificação pode ser explicada, em termos de erros experimentais associados, e o fato de que os ensaios destrutivos foram realizados sem recolha de amostras, que pode ser encarada como um importante teste de consistência interna dos resultados. Assim, o comportamento também verificado para as curvas de tempo de conversão x velocidade específica podem assegurar a confiabilidade das medições experimentais relatados no presente trabalho.

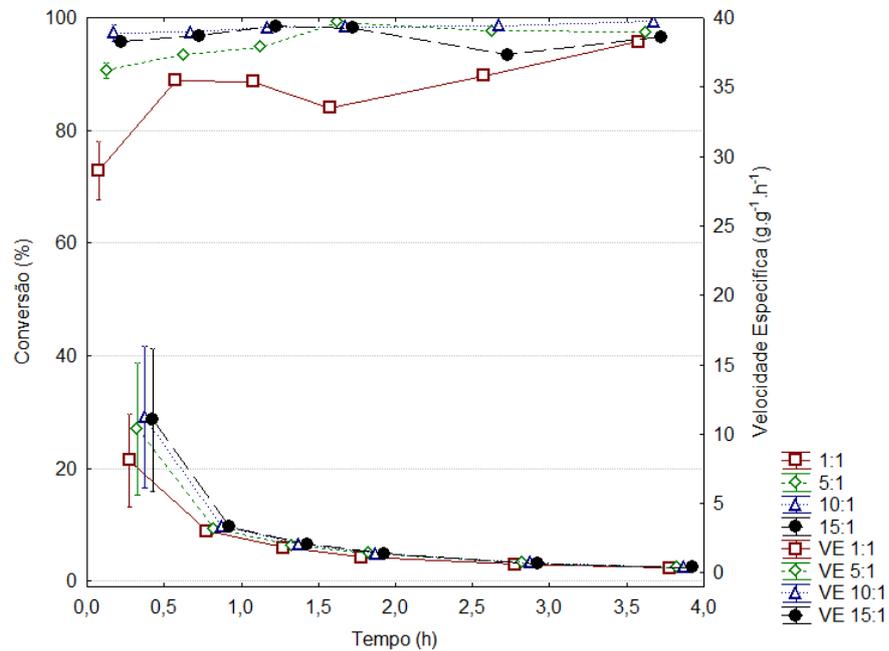
4.3.1 Efeito da razão molar (álcool: ácido) na cinética de produção enzimática de butanoato de geranila

Os experimentos para o estudo do efeito cinético da razão molar geraniol: ácido butanóico foram realizados fixando a temperatura em 70°C, concentração de enzima em 10% (m/m substratos) e agitação em 150 rpm para a Novozyme 435 e a Cal B (PU) tornando possível construir conversão contra curvas de tempo, tal como apresentado na Figura 6 (a) e (b). Ao mesmo tempo se avaliou o efeito da velocidade específica de consumo de substrato ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) ao longo da produção de butanoato de geranila, usando a Equação 1, através das cinéticas destrutivas com intervalos de tempo de 0; 0.25; 0.5; 1; 1.5; 2; 3 e 4 horas.

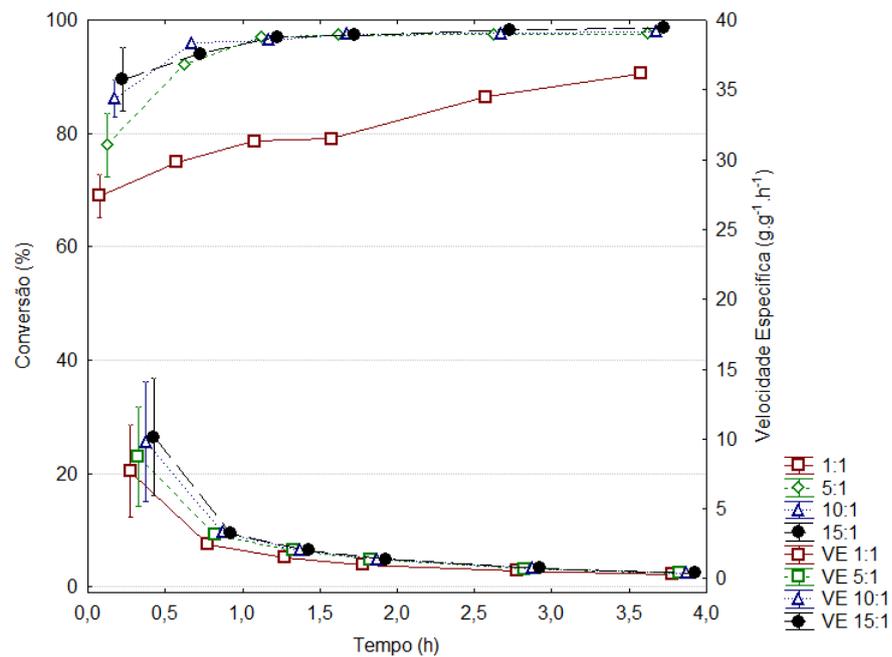
A Figura 6 apresenta as curvas em porcentagem de conversão (a razão molar geraniol: ácido butanóico em 1:1, 5:1, 10:1 e 15:1) e velocidade específica de consumo de substrato em função do tempo para Novozyme 435 e CAL B (PU), respectivamente. Onde pode-se observar (Figura 6 (a)) que em apenas 15 minutos de reação com a Novozyme 435 foram obtidas conversões de 97,6%, 96,1% e 95,3% com razões molares 5:1, 10:1 e 15:1, respectivamente. Após uma hora e meia de reação os rendimentos das reações ficaram próximos para razões molares 5:1, 10:1 e 15:1, atingindo conversões superiores a 95%.

As velocidades específicas diminuíram progressivamente com o tempo, de 28,37; 31,64 e 45,85 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ nos primeiros 5 minutos de reação até valores de 2,39; 2,43 e 2,48 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ nos tempos de 3 e 4 horas, para razões molares 1:1; 5:1 e 10:1 respectivamente (Fig. 6 (a)).

Figura 6. Cinética de produção de butanoato de geranila usando Novozyme 435 (a) e Cal B (PU) (b) para diferentes razões molares, temperatura de 70° C. concentração de 10% e 150 rpm.



(a)



(b)

Para CAL B (PU) a conversão máxima foi de 96% para razões molares de 5:1 e 10:1, após uma hora e trinta e uma hora de reação, respectivamente. As velocidades específicas diminuíram de 25,9; 24,11 e 33,8 $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ nos primeiros 5 minutos de reação até 2,26; 2,43 e

2,45 g.g⁻¹·h⁻¹ nos tempos de 3 e 4 horas, para razões molares 1:1; 5:1 e 10:1, respectivamente (Fig. 6 (b)).

Estudos anteriores demonstraram que o equilíbrio de uma reação enzimática pode ser manipulado para favorecer a elevada conversão de éster, através da seleção adequada da proporção molar entre o álcool ou a reação de ácidos ou através da remoção dos produtos a partir da mistura reacional (PAROUL, 2011). Em alguns casos, a utilização do excesso de álcool é necessária para reduzir as propriedades intrínsecas de desnaturação de ácidos em lipases. A presença de um excesso de ácido na reação, em certa medida, a lipase pode ser desativada particularmente sempre que o pH cai abaixo de 2. Considerando-se que as altas concentrações de ácido, álcool, ou ambos são fatores significativos para influenciar o equilíbrio das reações de esterificação enzimáticas (STAMATIS et al., 1999), tais fatores foram examinados neste estudo.

A razão molar álcool: ácido é um dos parâmetros mais importantes em esterificações enzimáticas (GUILLEN et al., 2012). Se a reação for reversível, o aumento na quantidade de um dos reagentes resultará em mais altas conversões, deslocando o equilíbrio químico na direção do produto. Uma alternativa de deslocamento da reação na direção da síntese é o aumento da concentração de álcool. Contudo, alta concentração de álcool poderá reduzir a velocidade da taxa da reação devido à inibição (RICHETTI, 2009). Uma outra alternativa para deslocamento de equilíbrio de uma reação é a remoção de subproduto formado, ou seja, durante a reação de esterificação a água gerada é considerada o mais importante parâmetro que precisa ser controlado.

Existem dados na literatura que sugerem a existência de um limite de concentração máxima do nucleófilo até onde o mesmo apresenta o efeito positivo para deslocamento da reação e favorecendo, dessa forma, a formação do produto (GUVENÇ et al., 2002; RICHETTI et al., 2010; CHIARADIA et al., 2011; VANIN et al., 2014). Os autores apontam a diminuição de conversão da reação de esterificação quando um grande excesso de um dos substratos está sendo usado. A possível razão para este comportamento é que em alta concentração, o álcool é ligado ao sítio ativo da enzima favorecendo a competição entre as moléculas reversível e impedindo a ligação dessas moléculas no éster. A força motriz para a ligação de álcool pode ser alta polaridade da região em torno do local ativo da enzima (ROMERO et al., 2007; PUSKAS et al., 2011; YADAV et al., 2012).

A conversão de butanoato de geranila foi mais baixa para a razão molar 1:1 (geraniol: ácido butanóico). A baixa conversão de butanoato de geranila na razão equimolar de geraniol e ácido butanóico pode ser atribuído à inibição da atividade da enzima, devido à presença de ácido em excesso no meio de reação que diminuiu de forma adversa a taxa de reação inicial (CABRAL et al., 2009).

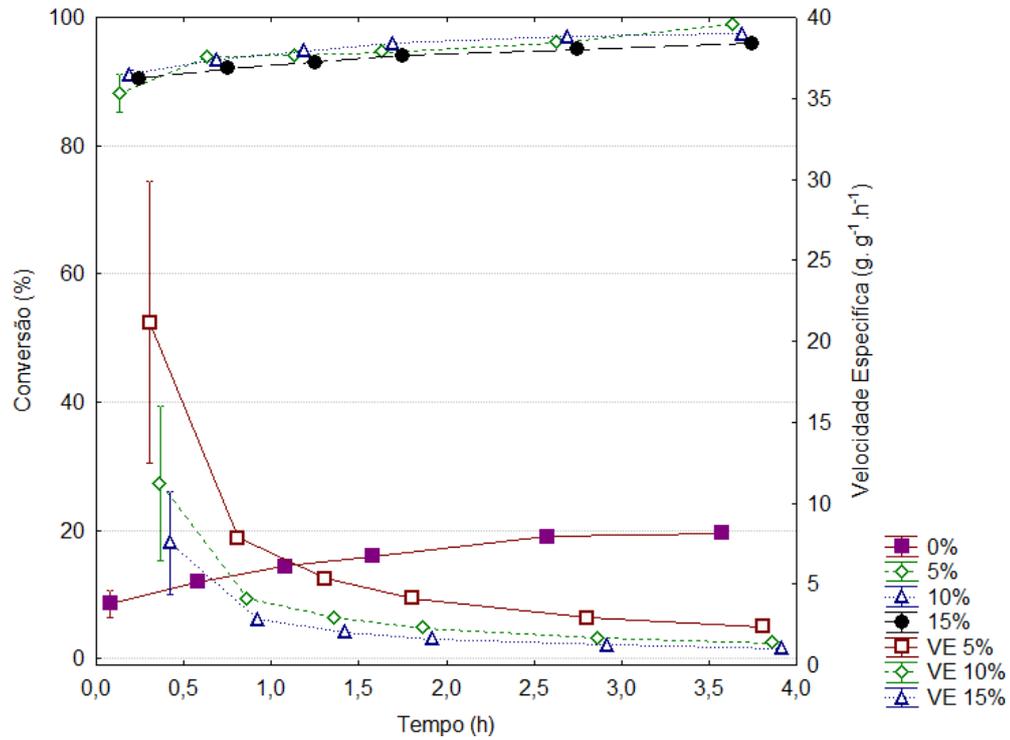
4.3.2 Efeito da concentração de enzima na cinética de produção enzimática de butanoato de geranila

O efeito cinético da concentração de enzima no sistema foi avaliado mantendo-se fixas as condições do sistema na temperatura de 70°C, razão molar geraniol: ácido butanóico de 5:1 e agitação de 150 rpm, possibilitando a obtenção das curvas cinéticas em função do tempo variando a concentração de enzima em 0, 5, 10 e 15% (m/m substratos) (Figura 7 (a) e (b)) para a Novozyme 435 e CAL B (PU), respectivamente.

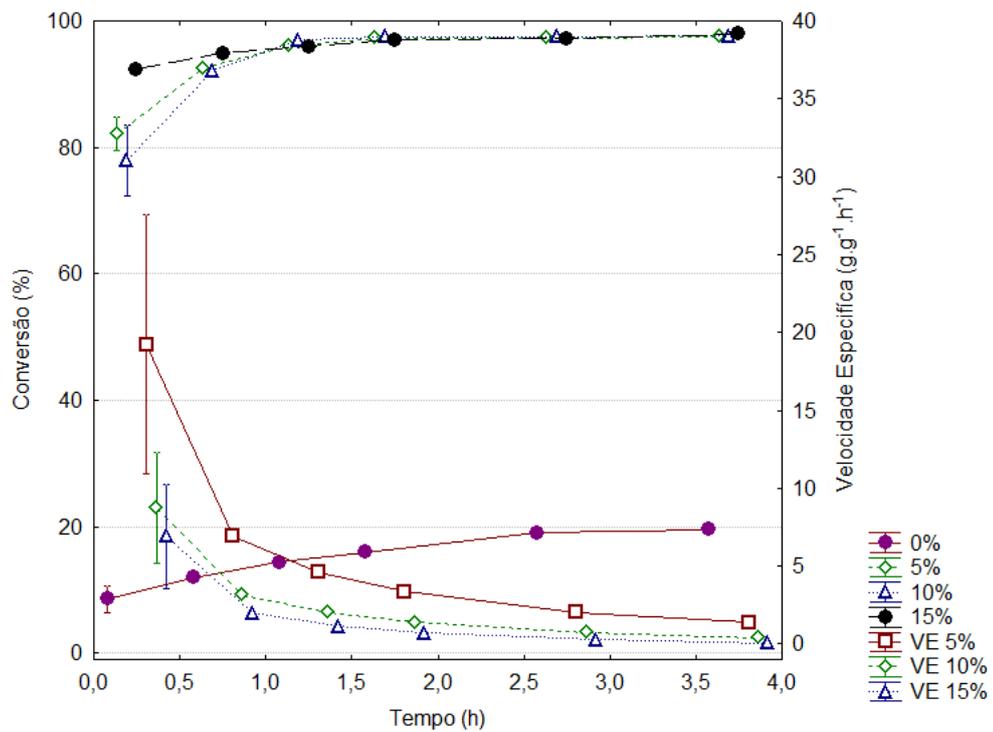
Quando é usado 15% de enzima (Figura 7 (a) e (b)) altas conversões (98%) são alcançadas em tempos curtos (30 minutos) de reação. Depois de 1 hora de reação não foi observada a correlação entre concentração de enzima e a conversão (%) chegando ao rendimento máximo de quase 100% usando 5%, 10% e 15% para as duas enzimas. Uma possível explicação para este fato é a hipótese de que um excesso de enzima no meio reacional pode não colaborar com aumento da conversão em função de formação de agregados e uma distribuição não homogênea da enzima. As moléculas de enzima localizadas na superfície externa desses aglomerados são expostas a altas concentrações de substratos, mas o transporte de massa dentro das partículas de biocatalisador pode drasticamente limitar a concentração de substratos no interior dessas partículas. Assim menores atividades de uma fração de biocatalisador reduzem a eficiência por unidade de massa do biocatalisador e não aumenta a conversão (KARRA-CHAABOUNI et al., 2006).

As velocidades específicas apresentaram o comportamento semelhante, diminuindo com o tempo de 69,41; 36,47 e 24,2 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ nos primeiros 5 minutos de reação até 4,94; 2,43 e 1,6 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ no tempo de 4 horas, para concentração de enzima de 5; 10 e 15% de Novozyme 435, respectivamente (Figura 7 (a)). A enzima CAL B (PU) apresentou comportamento semelhante (Figura 7 (b)).

Figura 7. Cinética de produção de butanoato de geranila usando (a) Novozyme 435 e (b) Cal B (PU) para diferentes concentrações de enzima, temperatura de 70°C, razão molar 5:1 e 150 rpm.



(a)



(b)

4.3.3 Efeito da temperatura na cinética de produção enzimática de butanoato de geranila

A estabilidade térmica de uma enzima é um aspecto vital de reações de bioprocessamento que operam em altas temperaturas em ambiente industrial. Uma temperatura reacional elevada é muitas vezes preferida, uma vez que promove a solubilidade em substratos e reduz a viscosidade para o qual a prescrição de transferência de massa pode ser evitada (RAHMAN et al., 2011).

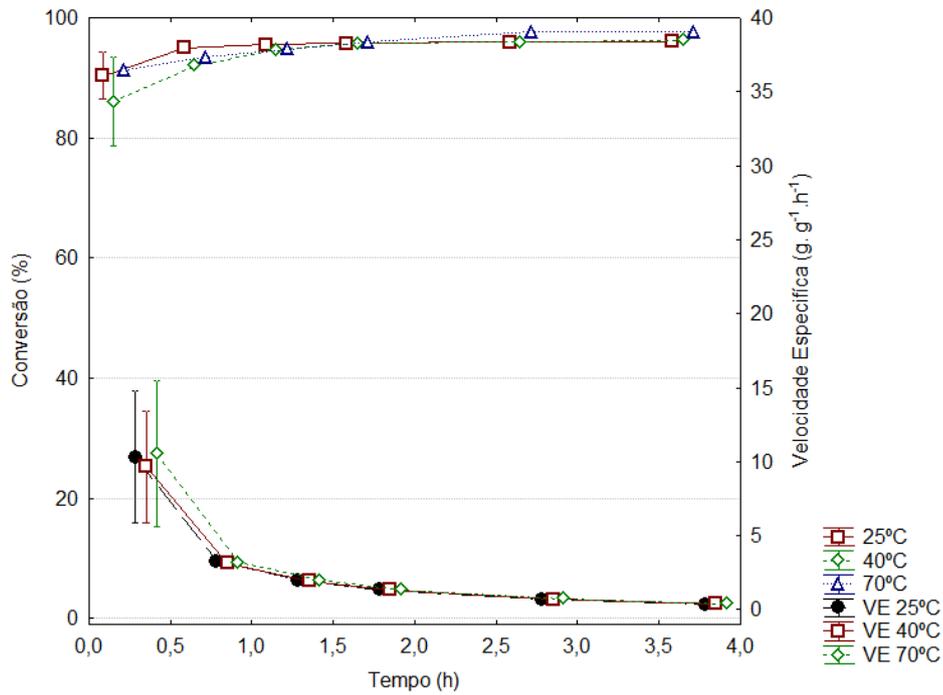
A fim de avaliar o efeito cinético da temperatura sobre a conversão de geraniol: ácido butanóico, manteve-se fixa a razão molar geraniol: ácido butanóico (5:1), concentração da enzima em 10% (m/m substratos) e agitação em 150 rpm, o que possibilitou a obtenção das curvas de conversão em função do tempo, variando a temperatura em 25, 40 e 70°C, conforme apresentado na Figura 8 (a e b) para Novozyme 435 e CAL B (PU), respectivamente

A partir da Figura 8 pode ser observado que altas conversões foram obtidas a 25°C atingindo uma conversão de 80% após 15 minutos de reação para Novozyme 435. Após uma hora a reação foi completada e atingiu uma conversão máxima de aproximadamente 95% para todas as temperaturas. As velocidades específicas de consumo do substrato diminuíram de 37,8; 42,53 e 47,82 ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) nos primeiros 5 minutos da reação para 2,4; 2,3 e 2,4 ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) nas últimas 4 horas para as temperaturas 25°C, 40°C e 70°C, respectivamente. Para a enzima CAL B (PU) apresentada na Figura 8 (b), a temperatura apresentou o efeito mais pronunciado quando comparada com a cinética da Novozyme 435. A conversão máxima (~94%) foi obtida a temperatura mais elevada (70°C) depois de 1 hora de reação.

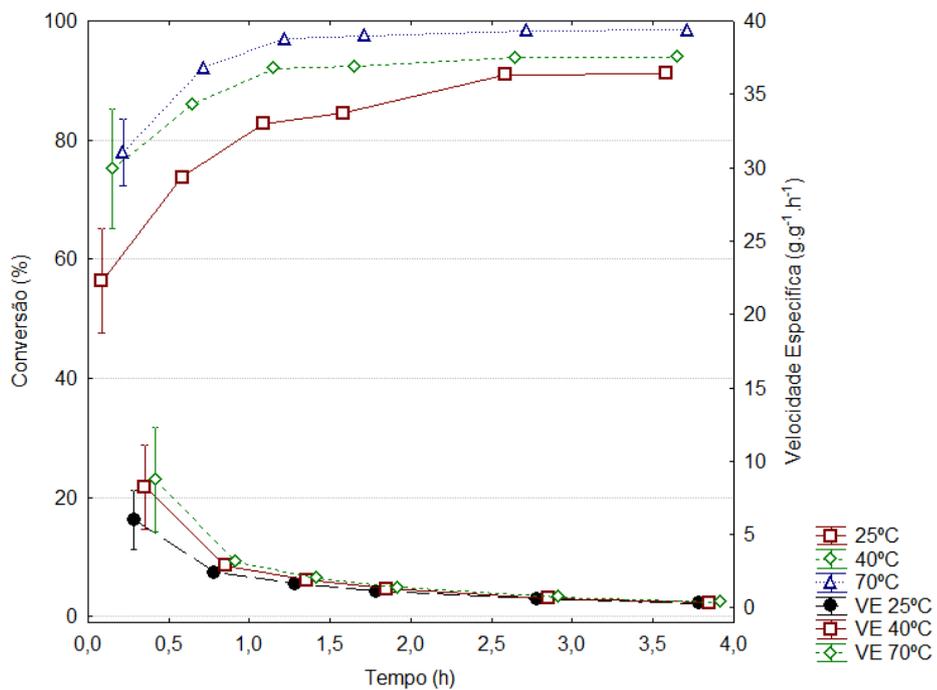
Segundo Konthanan et al. (2004), temperaturas mais elevadas tendem a tornar o substrato mais difusível e, portanto, facilmente aceitável para a enzima.

O mesmo efeito da temperatura foi observado por Paroul et al. (2010) para a produção de propionato de geranila em sistema livre de solvente. A condição experimental otimizada foi de 40°C, razão molar 3:1 (geraniol: ácido propiônico), 150 rpm e 10% de enzima, atingindo 93% de conversão em 30 minutos de reação.

Figura 8. Cinética de produção de butanoato de geranila usando (a) Novozyme 435 e (b) Cal B (PU) com diferentes temperaturas, concentração de enzima (10%), razão molar 5:1 e 150 rpm.



(a)



(b)

Paroul et al. (2011) otimizou a produção de oleato de geranila em sistema livre de solvente orgânico, utilizando a lipase comercial Novozyme 435 como catalisador. A condição

experimental otimizada foi 40°C, razão molar geraniol: ácido oleico 5:1 e 10% de enzima, com uma conversão de 93%. Após determinar os melhores parâmetros de reação, realizou-se um estudo cinético e os resultados obtidos permitiram concluir que um excesso de álcool (álcool: ácido 5:1), concentração de enzima relativamente baixa (5%) e a temperatura de 50°C proporcionaram conversões quase completas após 1 hora de reação.

Um estudo semelhante foi realizado por Karra-Chaabouni et al. (1998). Os fatores que afetam a síntese de butanoato de geranila por esterase 30,000 de *Mucor miehei* foram estudados em um sistema livre de solvente. Os efeitos da razão molar, temperatura, velocidade de agitação e adição inicial de água foram investigados. A proporção equimolar era mais interessante para a produção de éster em lote. Não houve limitações de difusão, e a reação poderia ser realizada a baixa agitação. A atividade catalítica da enzima foi irreversivelmente desativada a 60°C e a adição inicial de água diminuiu a taxa de conversão, após 75 h de reação.

Lipase microbiana produzida por *Rhizopus sp.* foi testada por Melo et al. (2005), para a síntese de butirato de citronelol e valerato de citronelol. A lipase se mostrou com melhor capacidade para catalisar a síntese de butirato de citronelol. As condições ótimas foram razão molar de 2,41: 1 (álcool: ácido) e a quantidade de lipase de 6,12% (w / w) e o rendimento alcançado 100% (conversão molar) em 48 h. Quando utilizado a lipase imobilizada a sua atividade melhorou, conduzindo a conversão de 100%, em 24 h.

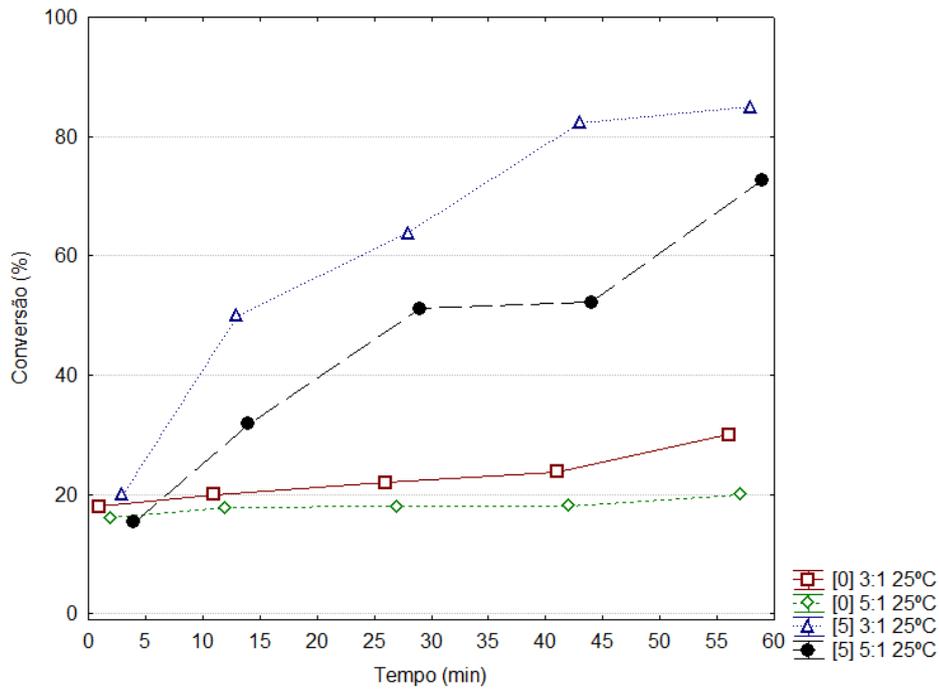
A partir dos resultados obtidos e tendo como um dos principais objetivos redução de gastos de energia durante a síntese de butanoato de geranila, optamos por realizar mais uma série de experimentos. Os ensaios foram realizados sem adição de peneiras moleculares.

A fim de avaliar o efeito cinético da razão molar e da concentração de enzima realizaram-se novamente alguns ensaios variando a razão molar (álcool: ácido) de 3:1 e 5:1 e a concentração de enzima de 0 e 5% para ambas as enzimas. Para a Novozyme 435 (Figura 9 (a)) na temperatura de 25°C e para a Cal B (PU) (Figura 9 (b)) na temperatura de 40°C, possibilitando assim a obtenção das curvas de conversão em função do tempo.

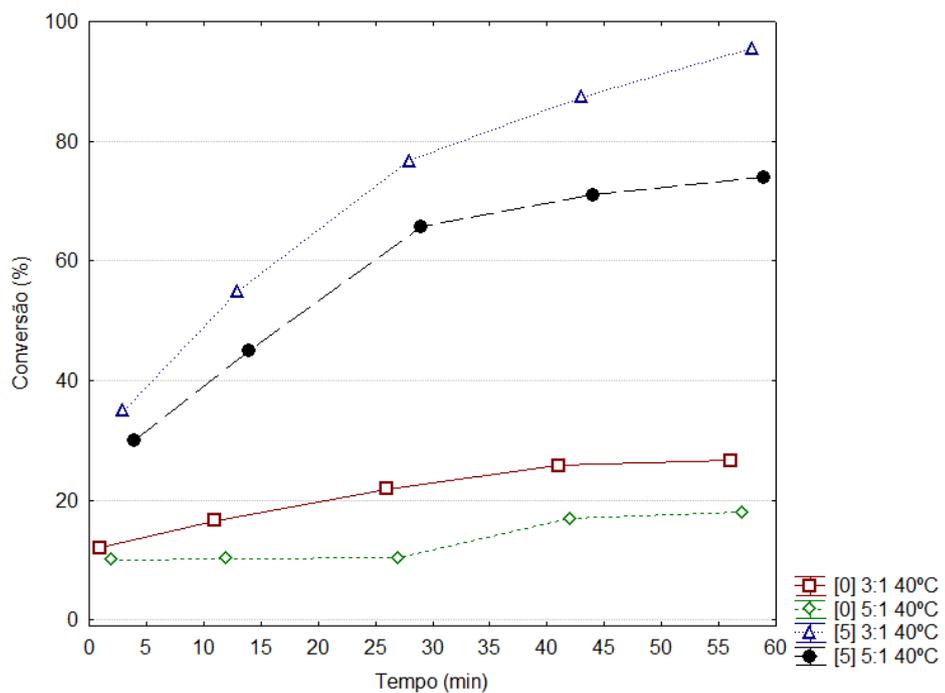
Pode ser observado a partir da Figura 9 (a) que após 30 minutos de reação atingiu - se uma conversão de 51,2% para razão molar de 5:1 (álcool: ácido) com a Novozyme 435 e que após uma hora a reação foi completa e atingiu uma conversão máxima de aproximadamente 73%. Já quando realizados experimentos com razão molar de 3:1 (álcool: ácido) em 30 minutos obteve-se 62,5% de conversão e após uma hora de reação atingiu-se uma conversão

máxima de 85% (Figura 9 (a)).

Figura 9. Cinética de produção de butanoato de geranila (a) temperatura de 25°C para a Novozyme 435 e (b) temperatura de 40°C para Cal B (PU), com concentração de enzima de 0 e 5% e razão molar (álcool:ácido) de 3:1 e 5:1 para ambas as enzimas.



(a)



(b)

Para a Cal B (PU), observa-se que nos primeiros 30 min obtém-se aproximadamente 53% de conversão e após uma hora de reação completa atingiu aproximadamente 71% para razão molar 5:1 (álcool: ácido) conforme Figura 9 (b). Também pode-se observar que altas conversões foram atingidas nos primeiros 30 minutos (~75%) e em uma hora de reação completa obteve aproximadamente 95% para a razão molar 3:1 (álcool: ácido).

Mulalee et al. (2014) estudou a estabilidade de Novozyme 435 durante a esterificação enzimática de ácido oleico com álcoois de cadeia curta (metanol e etanol) na temperatura de 45 e 50°C e observaram que a conversão inicial ligeiramente aumentava com o aumento da temperatura, mas não foi significativo. O efeito da desativação térmica da Novozyme 435 foi mais claramente observado quando a reação foi submetida à 50°C. Em outro estudo, Mulalee et al. (2013) perceberam que não houve diferença significativa na conversão da reação nas temperaturas entre 45 e 60°C.

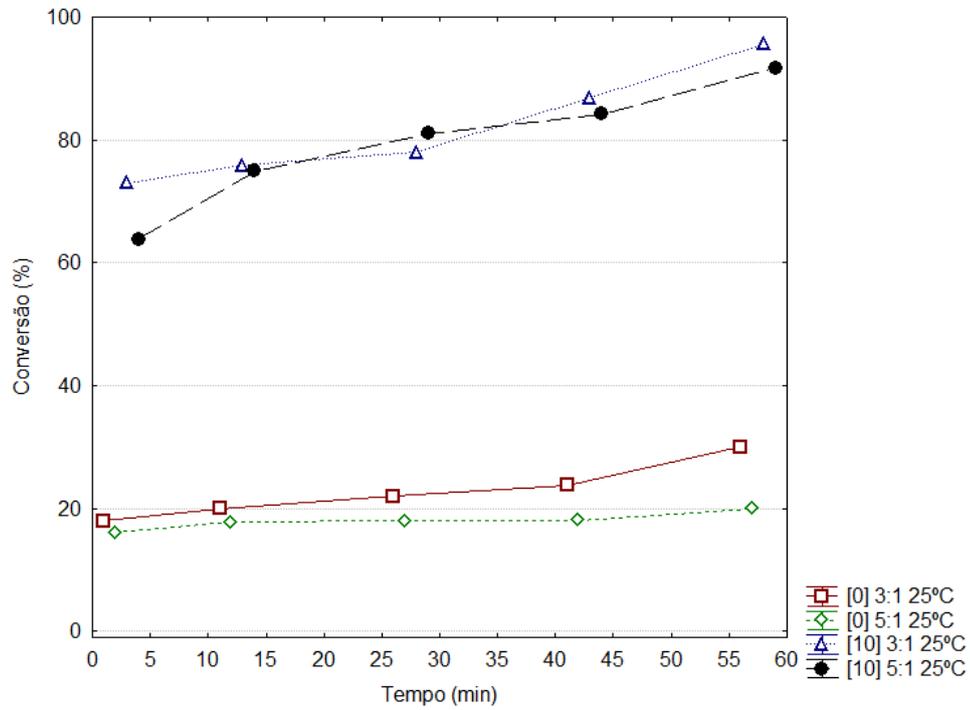
A partir dos resultados obtidos nos experimentos acima realizados, decidiu-se por refazer os experimentos com a enzima Novozyme 435 variando a temperatura de 25 a 30°C, razão molar de 5:1 e 3:1 (álcool: ácido) e concentração de enzima de 10%, cujo resultado está apresentado na Figura 10. Segundo Li et al. (2011) e Wang et al. (2015) um dos fatores chaves que afetam a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima é a temperatura. Esta pode influenciar a atividade, seletividade e estabilidade do biocatalisador, bem como a reação de equilíbrio (POHNLEIN et al., 2015; YADAV & DEVENDRAN, 2012)

Também, segundo Yadav & Devendran (2012) um aumento na % de conversão é devido ao fato que a temperatura pode reduzir a viscosidade, aumentar a solubilidade mútua, melhorar o processo de difusão de substratos e melhorar as interações catalíticas entre partículas e substratos.

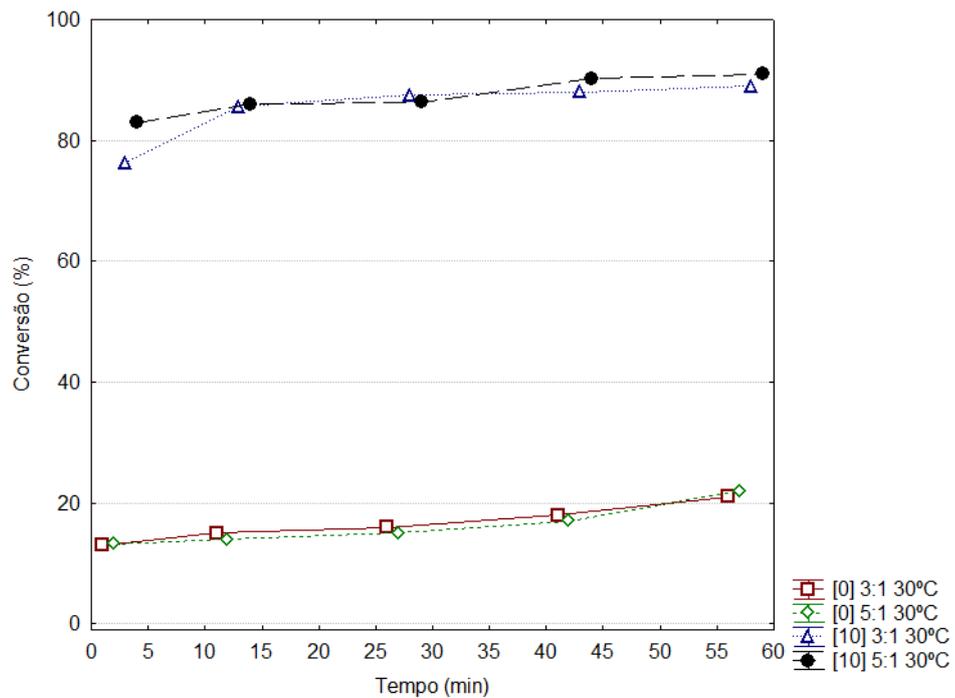
Na Figura 10 (a) pode – se observar que altas conversões (~75%) são obtidas nos primeiros 15 minutos e após uma hora de reação atinge-se 92% na razão molar (álcool: ácido) 5:1. Para a razão molar (álcool: ácido) 3:1 nos primeiros 5 min obteve-se 73% e após uma hora de reação completa tem-se 95% de conversão.

Para a temperatura de 30°C observa-se que na Figura 10 (b) nos primeiros 5 min atingiu 83% de conversão e após 1 hora 91% de conversão para a razão molar (álcool: ácido) 5:1. Porém quando utilizado razão molar (álcool: ácido) 3:1 observa-se que nos primeiros 5 min atingiu 76% e em 1 hora 89% de conversão.

Figura 10. Cinética de produção de butanoato de geranila usando Novozyme 435 nas condições de 150 rpm e razão molar (a) 3:1 e 5:1 à 25°C , (b) 3:1 e 5:1 à 30°C.



(a)



(b)

Yadav & Lathi (2004) avaliaram o efeito da temperatura na produção de citronelol laurato em meio orgânico utilizando a enzima Novozyme SP 435 e observaram que as conversões finais após 2 horas de reação foram de 62, 75, 76 e 77 % aos 30, 40, 50 e 60°C. É bem sabido que a Novozyme SP 435 é termicamente estável a 60°C e, portanto não havia desativação da enzima a 60°C.

Kuperkar et al. (2014) estudaram o efeito da temperatura na produção de propionato de isobutil variando a temperatura entre 30 e 60°C, razão molar 1:1, 5% de enzima e 200 rpm e puderam observar que a conversão aumentou de 66 para 82% com o aumento da temperatura de 30 para 40 a 50°C, otimizando em 40°C. Segundo Romero et al. (2005) trabalhando na temperatura mais baixa minimiza a energia térmica para a otimização econômica, porém a Novozyme 435 pode trabalhar mesmo a 100°C, uma vez que é uma enzima de tolerância ao calor mas, a esta temperatura elevada desnatura a enzima mais rápido com o tempo, por isso é recomendado operar em temperaturas mais baixas (KUPERKAR et al., 2014).

5 CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 Conclusão

Neste trabalho foi estudada a otimização da produção enzimática de butanoato de geranila em sistema livre de solvente orgânico, bem como a influência das variáveis de processo e cinética da reação. A metodologia analítica se mostrou eficaz na quantificação de butanoato de geranila produzido pela reação de esterificação utilizando as enzimas Novozyme 435 e Cal B (PU) como catalisadores.

O comportamento da enzima utilizada, a concentração da mesma e a razão molar dos substratos mostraram serem parâmetros 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 tempo reacional para produção de butanoato de geranila para as enzimas Novozyme 435, Lipozyme 435 e Cal B (PU) e obtiveram que em 2 horas de reação as enzimas Novozyme 435 e Lipozyme 435 apresentaram conversões superiores a 90% e a Cal B (PU) apresentou 80% neste mesmo tempo.

Para a otimização do processo foi avaliado o efeito destas variáveis para as enzimas Novozyme 435 e Cal B (PU) obtendo a melhor condição para produção de butanoato de geranila (94% em 2 horas) a 70°C, razão molar 5:1 (geraniol: ácido butanóico) e concentração da enzima de 10% (m/m substrato). Através do estudo da cinética reacional foi possível reduzir o tempo para 1 hora mantendo a conversão acima de 90%. Para a Novozyme 435, além de reduzir a temperatura para 25°C, foi possível utilizar a razão molar (álcool: ácido) 3:1. Para a Cal B (PU) reduziu-se a temperatura para 40°C, razão molar (álcool: ácido) 3:1 e concentração de enzima 5%.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineados:

- ✓ Avaliação da estabilidade operacional das enzimas Novozyme 435 e Cal B (PU);
- ✓ Avaliação da produção enzimática de butanoato de geranila em sistema livre de solvente orgânico em modo contínuo;
- ✓ Avaliação da produção enzimática de butanoato de geranila em sistema supercrítico.

6 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ADNANI, A.; BASRI, M.; MALEK, E. A.; SALLEH, A. B.; RAHMAN, M. B. A.; CHAIBAKHSHA, N.; RAHMANB, R. N. Z. R. A. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of xylitol ester by Taguchi robust design method. **Industrial Crops and Products**. v. 31, p. 350, 2010.

AKACHA, N.B.; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, 2014.

AL-ZUHAIR, K.V. JAVARAMAN, S. KRISHNAN, W. HOONG CHAN. The Effect of Acid Concentration and Water Content on the Production of Biodiesel by Lipase. **Biochem. Eng. J.** 30: 212-217, 2006.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre Aditivos Aromatizantes/ Aromas da Resolução nº 104 de 14 de maio de 1999.

ANVISA. “Resolução RDC Nº 2, de 15 de janeiro de 2007”.

ARAGÃO, V. C.; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B. D. A.; THIESEN, C.; KALIL, S. J.; BURKET, C. A. V.; BURKET, J. F. M.. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2268 – 2272, 2009.

ARMSTRONG, D.W.& YAMAZAKI, H. Natural flavours production a biotechnological approach. **Trends in Biotechnology**, v. 4(10), p. 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**, v. 32, p. 1057-1062, 2013.

BANSODE, S. R. & RATHOD, V. K. Ultrasound assisted lipase catalysed synthesis of isoamyl butyrate. **Process Bioch.**, v. 49, p. 1297-1303, 2014.

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. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 75(6), p. 676-681, 2001.

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

- BIZZO, H. R.; HOVEL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32(3), p. 588-594, 2009.
- BORZANI, W., SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial – Fundamentos, v. 1, São Paulo/SP, Ed. Edgard Blücher Ltda, p. 197 – 215, 2001.
- BRIGIDA, A. I. S.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; GONÇALVES, L. R. B. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: production, characterization and application as an industrial biocatalyst. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 101, p. 148–158, 2014.
- CABRAL, P. P.; FONSECA, M. M. R da.; DIAS, S.F. Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study. **Bioch. Eng. J.** v. 43, p. 327-332, 2009.
- CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. A. F. Síntese de ésteres terpenoides por via enzimática: Influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciê. Tecnol. Alim.**, v. 17, p. 197-205, 1997.
- CASTRO, H. F; MENDES, A. A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.
- CARNESECCHI, S.; SCHNEIDER, J.; CERALINE, B.; DURANTON, B.; GOSSE, F.; SEILER, N.; RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 298, p. 197–200, 2001.
- CLAON, P.A.; AKOH, C.C. Enzymatic synthesis of geraniol and citronellol esters by direct esterification in n-hexane. **Biotechnol. Lett.**, 15, p. 1211–1216, 1993.
- CHANG, S.W.; SHAW, J.F.; YANG, C.K.; SHIEH, C.J. Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. **Process Biochemistry**. v. 42. p. 1362–1366. 2007.
- CHARPE, T. W.; RATHOD, V. K. Biodiesel production using waste frying oil Waste Management. v. 31. p. 85–90, 2011.
- CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D. K.; AM, J. **Oil Chem. Soc.**, v. 75, p. 651, 1998.
- CHIAPPINI C.C.J. Aromas naturais produzidos por microorganismos. Revista Eletrônica de Jornalismo Científico, 2007. Disponível em: <http://www.comciencia.br/comciencia/?section=8&edicao=28&id=325>. Acesso em 08/04/2015

CHIARADIA, V.; DETOFOL, M.; CANSIAN, R.L.; DALLAGO, R.M.; OLIVEIRA, D., PAROUL, N. Produção de mentil acetato via esterificação enzimática em sistema livres de solvente. **Perspectiva**, v. 35 (131), p. 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**, v. 167, p. 742-751, 2012.

CVJETKO, M.; VORKAPIC-FURAC, J.; ZNIDARSIC-PIAZI, P. Isoamyl acetate synthesis in imidazolium – based ionic liquids using packed enzyme microreactor. *Process Bioch.*, v. 47, p. 1344-1350, 2012.

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

DE, B. K.; CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, K. J. **Am. Oil Chem. Soc.**, v. 76, p. 1501, 1999.

DAGGETT, V.; SCHRODER, S.; KOLLMAN, P. Catalytic pathway of serine proteases – classical and quantum mechanical. **J. Am. Chem. Soc.** 23: 8926-8935, 1991.

DHAKE, K. P.; DESHMUKH, K.M.; PATIL, Y.P.; SINGHAL, R.S.; BHANAGE, B. M. Improved activity and stability of *Rhizopus oryzae* lipase via immobilization for citronellol ester synthesis in supercritical carbon dioxide. **Journal of Biotechnology** v. 156 p. 46– 51, 2011.

DHAKE, K. P.; THAKARE, D.D.; BHANAGE, B. M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds *Flavour Frag. J.*, v. 28, p. 71–83, 2013.

DHEEMAN, D.S.; HENEHAN, G.T.M.; FRÍAS, J.M. Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potencial in flavour ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 102, p.3373-3379, 2011.

DOSSAT, V; COMBES, D.; MARTY, A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. *Enzyme Technol.* 30: 90-94, 2002.

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

DUETZ, W.A.; BOUWMEESTER, H.; BEILEN, J.B.; WITHOLT, B. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 61, p. 269-277, 2003.

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**, v. 1, p. 1821 – 1827, 2011.

FANI, M. Aromas e Biotecnologia. Aditivos & Ingredientes, n.82, p. 44-50, 2011.

FEHER, E.; ILLEOVA, V.; KELEMEN-HORVATH, I.; BELAFI-BAKO, K.; POLAKOVIC, M.; GUBICZA, L. Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid–alcoholbiphasic system. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 50, p. 28, 2008.

FENAROLI, G. Fenaroli´s Handbook of Flavor Ingredients. **2 ed. CRC Press.** p 46-54, 1975.

FONTEYN, F.; BLECKER, C.; LOGNARY, G.; MARLIER, M.; SEVERIN, M. **Biotechnol Lett.**, v. 16, p. 693, 1994.

GUILLEN, M.; BENAIGES, M.D.; VALERO, F. Biosynthesis of ethyl butyrate by immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase expressed in *Pichia pastoris*. **Biochem. Eng. J.** v. 65, p. 1–9, 2012.

GUBICZA, L.; KABIRI-BADR; A.; KEOVES, E.; BELAFI-BAKO, K. Large scale enzymatic production of natural flavor esters in organic solvents with continuous water removal. **Journal Biotechnol.**, v. 84, p. 193-196, 2000.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOGLU, Ü. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochem.**, v. 38, p. 379-386, 2002.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; KAPUCU, H. Mehmetoglu, Enzymatic esterification of isoamylalcohol obtained from fusel oil: optimization by response surface methodology. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 40, p. 778–785, 2007.

HABULIN, M.; SABEDER, S.; PALJEVAC, M.; PRIMOZIC, M.; KNEZ, Z. Lipase-catalyzed esterification of citronellol with lauric acid in supercritical carbon dioxide/co-solvent media. **J. of Supercritical Fluids** v. 43, p. 199–203, 2007.

HAGEN. Industrial catalysis: A practical approach. 2nd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2006

HASAN F.; AAMER A.; SHAH A.A.; HAMEED A. Industrial applications of microbial

lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, n.39, p. 235-251, 2006.

HEATH, C.M.; IMRE, R.C.; JONES, J.J.; REES, M.J.; ROBINS, K.G.; VERRALL, M.S. Whole cell biotransformation of 5-(4-(2-(2-pyridyl)methylamine) ethoxy) benzylidenethiazolidine- 2,4-dione to its benzyl derivative using a yeast reductase. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 68, p. 324-330, 1978.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chem. Rev.** 102: 4501-4523, 2002.

IKEDA, Y.; KUROKAWA, Y. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 78, p. 1099, 2001.

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: 22/04/2015.

IRIMESCU, R.; SAITO, T.; KATO, K. Enzymatic kinetic resolution of primary alcohols by direct esterification in solvent-free system. **J. Molec. Catal. B: Enzymatic.**, v. 27, p. 69-73, 2004.

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

JANSSENS, L. et al. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 195-215, 1992.

LERIN, L.; CENI, G.; RICETTI, A.; KUBIAK, G.; OLIVEIRA, V. J.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E. G.; OLIVEIRA, D. Successive cycles of utilization of Novozym 435 in three different reaction systems. **Braz. Jour. Of Chem. Eng.**, v. 28, p. 181 – 188, 2011.

LI, H. H.; HE, Y.-H.; GUAN, Z. Protease-catalyzed direct aldol reaction. **Catal Commun.** v. 12, p. 580–582, 2011.

LI, C.; SUN, J.; FU, C.; YU, B.; LIU, S.Q.; LI, T.; HUANG, D. Synthesis and evaluation of odour-active methionyl esters of fatty acids via esterification and transesterification of butter oil. **Food Chem.**, v. 145, p. 796–801, 2014

LIAW, E. T. & LIU, K.J. Synthesis of terpinyl acetate by lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide. **Bioresour. Technol.** v. 101(10), p. 3320-4, 2010.

LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 44, n° 3, p. 335-353, 2006.

KANWAR, S. S.; GEHLOT, S.; VERMA, M. L.; GUPTA, R.; KUMAR, Y.; CHAUHAN, G. S. Synthesis of geranyl butyrate with the poly(acrylic acid-co-hydroxy propyl methacrylate-cl-ethylene glycol dimethacrylate) hydrogel immobilized lipase of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-4713. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 110, p. 2681, 2008.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1-15, 2012.

KARRA-CHAÂBOUNI, M.; PULVIN, S.; TOURAUD, D.; THOMAS, D. Enzymatic synthesis of geraniol esters in a solvent-free system by lipases. **Biotechnol. Lett.** v. 18(9), p. 1083-1088, 1996.

KARRA-CHAÂBOUNI, M.; PULVIN, S.; TOURAUD, D.; THOMAS, D. Parameters Affecting the Synthesis of Geranyl Butyrate by Esterase 30,000 from *Mucor miehei*. **JAOCs**, v. 75, no. 9, 1998.

KARRA-CHAÂBOUNI, M.; PULVIN, S.; THOMAS, D.; TOURAUD, D.; KUNZ, W. Role of water activity on the synthesis of geranyl butyrate by a *Mucor miehei* esterase in a solvent-free system. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, p. 1951–1955, 2002.

KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GHAMGHI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI, Y. Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Process Biochem.** v. 41, p. 1692-1698, 2006.

KASHI, F.J.; FOOLADI, J.; BAYAT, M. Application of Biotransformation in Flavor and Fragrance Industry. **Pakistan J. Biol. Sci.** v. 10, p. 1685-1690, 2007.

KEMPLER, G. M. Production of flavor compounds by microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 29-51, 1983.

KOBLITZ, M. G. B. Purificação e caracterização de Lipase de *Rhizopus* sp. e sua aplicação na síntese de monoacilgliceróis. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, SP, 2003.

KONTHANAN, H.; TENKANEN, M.; FAGERSTROM, R.; REINIKAINEN, T. **J Biotechnol**, v. 108, p. 51, 2004.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D. Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 279–286, 2004.

KRISHNA, S. H.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. J. Enzymatic synthesis

of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **J. Biotechnol.**, v. 87, p. 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**, v. 23, p. 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.

KUPERKAR, V. V.; LADE, G. V.; PRAKASH, A.; RATHOD, V. Synthesis of isobutyl propionate using immobilized lipase in a solvent free system: Optimization and kinetic studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 143-149, 2014.

KYUNG-AH, S.; HYUNMI, K.; HEI-YOUNG, K.; HEE-JEONG, A.; SOO-JIN, P.; SOO, K. B.; JAE-GOOK, S.; KWANG-HYEON, L. The monoterpenoids citral and geraniol are moderate inhibitors of CYP2B6 hydroxylase activity. **Chemico-Biological Interactions.**, v. 174, p. 141–146, 2008.

MACEDO, G.A.; LOZANO, M. M. S. ; PASTORE, G.M. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp. **Journal of Biotechnology**, v.6 (1), p. 72-75, 2003.

MALAMAN, F.S.; MORAES, L.A.; WEST, C.; FERREIRA, N.J.; OLIVEIRA, A.L. Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): Relationship between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit. **Food Chemistry**, n.124, p.85-92, 2011.

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**, v. 46, p. 2311–2316, 2011

MARTINS, A. B.; SILVA, A. M. da; SCHEINA, M. F.; GARCIA-GALANB, C.; AYUBA, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105 p. 18–25, 2014.

MARZZOCO, A.& TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. 2° ed. Editora Guanabara Koogan

S.A. Rio de Janeiro, RJ, p. 59-61, 1999.

MEDEIROS, J.; KALIL, S.J.; COSTA, F.; NAKASHIMA, E.B.; CABRAL, A.S.; ZAVICKIS, F.P.; SILVA, J.A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Estudo da Influência da Concentração de Substrato, pH e Temperatura na Determinação da Atividade Enzimática da Inulinase. *Anais ENPROMER*, p.350-351, 1999.

MEDEIROS, A.B.P.; ROSSI, S.C.; SOCCOL C.R. Cell culture for flavor production. *Handbook of Fruity and Vegetable Flavors*, cap. 6, p.95-100, 2010.

MELO, L.L.M.M.; PASTORE, G.M.; MACEDO, G.A. Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus* sp.. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3181–3185, 2005.

MOLINARI, F.; MARIANELLI, G.; ARAGOZZINO, F. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 967–973, 1995.

MULALEE, S., CHANPRASERT, J., KERDPOKSUP, P., SAWANGPANYA, N., PHISALAPHONG, M. Esterification of oleic acid and bioalcohols using immobilized lipase. **Adv Mat Res**, v. 724-725, p.1154-1157,2013.

MULALEE, S.; SRISUWAN, P.; PHISALAPHONG, M. Influences of operating conditions on biocatalytic activity and reusability of Novozym 435 for esterification of free fatty acids with short-chain alcohols: a case study of palm fatty acid distillate. **Journal of Chem. Eng.** 2014.

MURALIDHAR, R. V.; CHIRUMAMILLA, R.R.; RAMACHANDRAN, V.N.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Resolution of (RS)-proglumide using lipase from *Candida cylindracea*. **Bioorg. Med. Chem.**, v.10, p. 1471-1475, 2002.

NYARI N. L. D., Estudo da Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B em Poliuretano. Dissertação de Mestrado da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI, Erechim, RS. 2013.

OZYLMAZ, G. & GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.64, n.3-4, p.140-145, 2010.

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

Technology and Biotechnology, v. 85, p. 1636-1641, 2010.

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L.P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, DE D. Erratum to: Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification. **Bioprocess Biosyst Eng.**, v. 34, p. 331–337, 2011.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C.R.; DUSSAP, C.G. Production of aroma compounds. In: Current developments in Solid-state Fermentation. **India: Springer. Asiatech publishers**, Inc, 2008.

PASTORE, G.M. & UENOJO, M. Isolamento e Seleção de Microorganismos Pectinolíticos a partir de Resíduos Provenientes de Agroindústrias para Produção de Aromas Frutais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.509-515, 2006.

POHNLEIN, M.; HAUSMANN, R.; LANG, S.; SYLDATK, C. Enzymatic synthesis and modification of surface-active glycolipids. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** v. 117, p. 145-155, 2015.

POLONA, Z.; PLAZI, N.; PLAZI, I. Modelling and experimental studies on lipase-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a microreactor. **Process Biochem.**, v. 44 p. 1115–1121, 2009.

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

PUSKAS, J.E. CHIANG, C.K. SEN, M.Y. Green cationic polymerizations and polymer functionalization for biotechnology. In: Mathers RT. Meier MAR. Editors. Green polymerization methods: renewable starting materials. Catalysis and waste reduction. **Weinheim: Wiley-VCH.**, V. 47, p. 313, 2011.

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

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries, a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52(1), p. 207-219, 2009.

RICHETTI, A. Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

RICHETTI, A., LEITE, S.G.F., ANTUNES, O.A.C., DE SOUZA, A.L.F., LERIN, L.,

TREICHEL, H., OESTREICHER, E.G. AND OLIVEIRA, D. Optimization of 2-ethylhexyl palmitate production using Lipozyme RM IM as catalyst in a solvent-free system. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 160, No. 8, p. 2498, 2010.

RICHETTI, A., LEITE, S.G.F., ANTUNES, O.A.C., DE SOUZA, A.L.F., LERIN, L., DALLAGO, R. M., EMMERICH, D., DI LUCCIO, M., TREICHEL, H., OLIVEIRA, J.V. AND OLIVEIRA, D. Assessment of process variables on 2-ethylhexyl palmitate production using Novozym 435 as catalyst in a solvent-free system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, p. 331, 2010.

ROMERO, M.D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in n-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 42-48, 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**, v. 127, p. 269–277, 2007.

SANTOS, J. C., BUENO, T., ROS, P. C. M., CASTRO, H. F. Lipase-catalyzed synthesis of butyl esters by direct esterification in solvent-free system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 956–961, 2007.

SARROUH, B.; SANTOS, T.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-to-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. **Bioprocessing & Biotechniques**, S:4, p. 1-10, 2012.

SAUPIA, H. S. M.; TEJOA, B. A.; BASRIA, M.; SALLEHG, A. B.; RAHMAN, R. N. A.; RAHMAN, M. N. A.; ABDULMALEKA, E. Improved enzymatic galactose oleatesynthesis in ionic liquids. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 76 p. 37–43. 2012.

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**, v. 26, p. 463-472, 2004.

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

SERRA, S., FUAGTI. C., BRENNNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends Biotechnol**, 23(4), p. 193-198, 2005.

SIQUEIRA, P.B. Caracterização bioquímica e compostos bioativos de macaúba (*Acrocomia*

aculeata (Jacq.) Lodd ex Mart.) Tese doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SHANLEY, A. Enzymes Usher in a New Era. *Chem. Eng.*, v. 105, n. 7, p. 63-65, 1998.

SHARMA, R.; CHISTY, Y.; BANERJEE, U. C. Production purification, characterization and application of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.

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**. v. 100, p. 1223–1228, 2007.

SHIEH, C.J.; AKOH, C.C.; YEE, L.N. Optimized enzymatic synthesis of geranyl butyrate with lipase AY from *Candida rugosa*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 51, p. 371–374, 1996.

SHINDE, S. D.; GANAPATI D.; YADAV, G.D. Insight into microwave-assisted lipase catalyzed synthesis of geranyl cinnamate: optimization and kinetic modeling. **Appl Biochem Biotechnol.** v. 175, p. 2035–2049, 2015.

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

SOROUR, N.; KARBOUNE, S.; SAINT-LOUIS, R.; KERMASHA S. Enzymatic synthesis of phenolic lipids in solvent-free medium using flaxseed oil and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid. **Process Biochem**, v. 47, p. 1813–9, 2012.

STAMATIS, H.; SERETI, V. and KOLISIS, F.N. Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists’ Society.**, v. 76, p. 1505 - 1510, 1999.

SUN, J.; YU B.; CURRAM, P.; LIU, S.Q.. Optimisation of flavour ester biosynthesis in an aqueous system of coconut cream and fusel oil catalysed by lipase. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2714–2720, 2012.

TAN, T.; CHEN, B-Q.; YE, H. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl palmitate by lipase immobilized on fabric membranes in the batch reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 41-45, 2006.

TAN, H.S.G. et al. Lipase catalysed synthesis of natural aroma-active 2-phenylethyl esters in coconut cream. **Food Chemistry**, v.124, n.1, p. 80-84, 2011.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A

review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182-196, 2010.

VANIN, A.B.; ORLANDO, T.; PIAZZA, S.P; PUTON, B.M.S.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, D.; PAROUL, N. Antimicrobial and antioxidant activities of clove essential oil and eugenyl acetate produced by enzymatic esterification, **Appl Biochem Biotechnol**, v. 174, p. 1286–1298, 2014.

VARMA, M. N., MADRAS, G. Kinetics of enzymatic synthesis of geranyl butyrate by transesterification in various supercritical fluids. **Biochem. Eng. J.**49: 250-255, 2010.

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.

ZHANG, D.-H.; BAI, S.; SUN, Y.. Lipase-catalyzed regioselective synthesis of monoester of pyridoxine (vitamin B6) in acetonitrile. **Food Chem**, v. 102, p. 1012–1019, 2007.

YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 27, p. 113, 2004.

YADAV, G. D. & DEVENDRAN, S. Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous medium. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 496 – 502, 2012.

YADAV, G. D.; THORAT, P. A. Microwave assisted lipase catalyzed synthesis of isoamyl myristate in solvent-free system. **J Mol Catal B Enzym**, v. 83, p. 16–22, 2012.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, J de C. Revisão Aspectos da Produção Industrial de Enzimas. **Revista Citino**, v. 1, p. 30-36, 2011.

WANG, Y.; ZHANG, D.; CHEN, N.; ZHI, G. Synthesis of benzyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 256–261, 2015.