

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES –
URI - CAMPUS ERECHIM

DEPARTAMENTO DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SUELEN PALOMA PIAZZA

**PRODUÇÃO DE CINAMATO DE BENZILA VIA CATÁLISE
ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Erechim/RS

2019

SUELEN PALOMA PIAZZA

**PRODUÇÃO DE CINAMATO DE BENZILA VIA CATÁLISE
ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Departamento das Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI – Campus Erechim, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadores: Dra. Natalia Paroul

Dr. Marcelo Luis Mignoni

Erechim/RS

2019

P584p Piazza, Suelen Paloma

Produção de cinamato de benzila via catálise enzimática e avaliação das propriedades biológicas /Suelen Paloma Piazza - 2019.
65 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.

“Orientação: Natalia Paroul; Marcelo Luis Mignoni”

1. Ácido cinâmico 3. Cinamato de benzila 4. Antioxidante I. Título

C.D.U.: 661.12

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

SUELEN PALOMA PIAZZA

PRODUÇÃO DE CINAMATO DE BENZILA VIA CATÁLISE
ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Departamento das Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI – Campus Erechim, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Erechim, 25 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Natalia Paroul
URI Erechim

Prof. Dr. Marcelo Luis Mignoni
URI Erechim

Prof. Dra. Jamile Zeni
URI Erechim

Prof. Dra. Helen Treichel
UFFS Erechim

Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir que tudo isso acontecesse, me dando força para superar as adversidades e colocando pessoas muito especiais no meu caminho.

À minha família, em especial minha mãe Lia, avó Nair, irmão Anderson e tia Silvana pelo apoio incondicional e por estarem sempre ao meu lado me incentivando e acreditando em mim.

Ao Odair, por ter me escutado inúmeras vezes, pela paciência, confiança e companhia, além das incontáveis caronas até a URI.

Aos meus orientadores Natália Paroul e Marcelo Mignoni por todos os ensinamentos, conversas e apoio, sem a ajuda de vocês a construção deste trabalho não teria sido possível.

A todos os professores pela disposição e ensinamentos, em especial ao professor Rogério Cansian por todas as ideias e conhecimentos repassados.

As meninas da central de materiais, Rosi, Vera, Greice e Helena por toda ajuda e disponibilidade de sempre.

Aos bolsistas de iniciação científica Maria Eduarda, popular Duda, Willian e Paulo por sempre estarem dispostos a ajudar e terem colaborado na realização da pesquisa.

Aos meus amigos, colegas de mestrado e “pessoal da salinha” pelas longas conversas, diversas cuias de chimarrão e tererê e pela companhia diária no almoço, com certeza levarei todos vocês para sempre em meu coração.

As minhas amigas de longa data, (Pati, Carla, Tai, Kati, Sheila, Anny), que apesar do pouco tempo disponível sempre encontraram uma brecha para matarmos a saudade e nos contarmos as novidades.

A URI – Campus de Erechim pela infraestrutura e a CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na para conclusão do mestrado, meu muito obrigada.

LISTA DE ABREVIATURAS

- [E] – concentração enzimática
- AA % – porcentagem de atividade antioxidante
- Abs – absorbância
- AE – atividade de esterificação
- ANOVA – análise de variância
- BHT – hidroxitolueno butilato
- CC – cromatografia em coluna
- CL₅₀ – concentração letal mediana
- DCCR – delineamento central composto rotacional
- DL₅₀ – dose letal mediana
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- EUA – Estados Unidos da América
- HCl – ácido clorídrico
- IC₅₀ – metade da concentração inibitória máxima
- LB – meio de cultura Luria Bertani
- NaOH – hidróxido de sódio
- rpm – rotação por minuto
- U – unidade
- UV – ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esterificação de Fischer	19
Figura 2. Esterificação a partir de um cloreto de ácido e álcool	19
Figura 3. Esterificação a partir de um anidrido ácido e um álcool.....	20
Figura 4. Reação de transesterificação entre um éster e um álcool.....	21
Figura 5. Reação de transesterificação entre um éster e um ácido.....	21
Figura 6. Reação de transesterificação entre dois ésteres.....	21
Figura 7. Reação de esterificação para a produção de cinamato de benzila.....	26
Figura 8. Efeito da razão molar na produção de cinamato de benzila.....	36
Figura 9. Conversão em cinamato de benzila em diferentes concentrações enzimáticas	36
Figura 10. Cinética da produção de cinamato de benzila à temperatura de 60°C, concentração de enzima de 2,36 e 1,18 mg.mL ⁻¹ e razão molar 1:3.....	37
Figura 11. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de cinamato de benzila em função da concentração de enzima e temperatura.....	40
Figura 12. Cinética da produção enzimática do cinamato de benzila	42
Figura 13. Estabilidade operacional da enzima NS 88011 na produção de cinamato de benzila	44
Figura 14. Cromatogramas da mistura reacional antes (a) e após (b) a reação de esterificação e o padrão de cinamato de benzila (c)	45
Figura 15. Cromatograma do éster isolado por cromatografia em coluna	46
Figura 16. Atividade antioxidante do éster cinamato de benzila.....	47
Figura 17. Curva concentração-resposta da mortalidade (%) de <i>A. salina</i> à diferentes concentrações de ácido cinâmico	50
Figura 18. Curva concentração-resposta da mortalidade (%) de <i>A. salina</i> à diferentes concentrações do éster cinamato de benzila	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência natural e característica aromática de ésteres aromáticos.....	16
Tabela 2. Diferentes ésteres de ácido cinâmico obtidos via catálise enzimática.....	25
Tabela 3. Variáveis e níveis estudados no delineamento central composto rotacional 2 ² (DCCR) para a produção de cinamato de benzila.....	31
Tabela 4. Matriz do Delineamento Central Composto Rotacional 2 ² com valores reais e codificados e a resposta em termos de conversão em cinamato de benzila	38
Tabela 5. Coeficiente de regressão das variáveis para a produção de cinamato de benzila ...	39
Tabela 6. Análise de Variância (ANOVA) para a produção do éster cinamato de benzila.....	40
Tabela 7. Valores experimentais, preditos e desvio relativo para a produção de cinamato de benzila.....	41
Tabela 8. Constante de desativação térmica e tempo de meia vida da lipase NS 88011 na temperatura de 58,8 °C	43
Tabela 9. Porcentagem de neutralização do DPPH para o cinamato de benzila	47
Tabela 10. Mortalidade média de <i>A. salina</i> em diferentes concentrações de ácido cinâmico	49
Tabela 11. Mortalidade média de <i>A. salina</i> em diferentes concentrações de cinamato de benzila	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 ÉSTERES AROMÁTICOS	15
2.1.2 Aspectos econômicos.....	18
2.2 OBTENÇÃO DE ÉSTERES.....	18
2.2.1 Produção de ésteres a partir de ácidos carboxílicos e seus derivados	18
2.3 BIOCATALÍSE ENZIMÁTICA PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES	22
2.3.1 Uso de solventes na esterificação enzimática	22
2.4 ÉSTERES DE ÁCIDO CINÂMICO.....	23
2.4.2 Cinamato de benzila	26
2.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	27
2.5.1 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	27
2.5.2 Atividade antioxidante	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Materiais.....	29
3.1.1 Substratos.....	29
3.1.2 Enzima	29
3.2 Métodos	29
3.2.1 Determinação da atividade de esterificação.....	29
3.2.2 Reação de esterificação	30
3.2.3 Determinação da conversão em cinamato de benzila.....	31
3.2.4 Determinação do tempo reacional para produção de cinamato de benzila	31
3.2.5 Determinação da constante de desativação térmica (k_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$).....	31
3.2.6 Estabilidade operacional da enzima	32
3.2.7 Isolamento do éster	32

3.2.8 Determinação da atividade antioxidante.....	33
3.2.9 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Maximização da produção enzimática de cinamato de benzila	35
4.2 Avaliação cinética da produção de cinamato de benzila.....	42
4.3 Constante de desativação térmica (k_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$).....	43
4.4 Estabilidade operacional da lipase NS 88011.....	43
4.5 Identificação do éster.....	45
4.6 Isolamento do éster através de fracionamento cromatográfico	46
4.7 Atividade Antioxidante	46
4.8 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	48
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
6 REFERÊNCIAS	53

RESUMO

Ésteres aromáticos são substâncias orgânicas de grande relevância para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. A maneira convencional de obter estes ésteres é a catálise ácida, porém este processo pode gerar impactos ambientais. O presente trabalho teve como objetivo a produção de cinamato de benzila via catálise enzimática utilizando a lipase imobilizada NS 88011 e avaliar as suas propriedades biológicas. A condição que levou a maximização da conversão em éster foi razão molar 1:3 (100 μmol ácido cinâmico: 300 μmol álcool benzílico), temperatura de 58,8 °C e concentração de enzima 4,45 mg.mL^{-1} em um tempo de 32 horas, à 125 rpm e utilizando n-heptano como solvente, atingindo 97,6% de conversão. O estudo da estabilidade enzimática mostrou que a enzima se mantém ativa e gerando rendimentos acima de 60% até o 13º ciclo (416 horas), apresentando um promissor tempo de meia vida. Na determinação da atividade antioxidante do éster observou-se um IC_{50} de 149,77 mg.mL^{-1} , demonstrando que houve uma melhoria na atividade antioxidante após o processo de esterificação. Quanto a toxicidade contra à *Artemia salina* obteve-se um DL_{50} de 0,07 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o éster e DL_{50} de 436,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o ácido cinâmico, demonstrando que o cinamato de benzila possui maior toxicidade do que o ácido cinâmico.

Palavras-chave: ácido cinâmico, cinamato de benzila, antioxidante, toxicidade, NS 88011.

ABSTRACT

Aromatic esters are organic substances of great relevance for the pharmaceutical, cosmetics and food industry. The conventional way to obtaining these esters is from the acid catalysis, however this process can generate environmental impacts. The main objective of the present work was the production of benzyl cinnamate by enzymatic catalysis using the immobilized lipase NS 88011 and to evaluate its biological properties. The condition that took the maximization of ester conversion was 1:3 molar ratio (100 μmol cinnamic acid: 300 μmol benzyl alcohol), temperature of 58.8 °C and enzyme concentration 4.45 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ at time of 32 hours at 125 rpm and using n-heptane as solvent, reaching 97.6% of conversion. The enzyme stability study showed that the enzyme remains active and yields above 60% until the 13th cycle (416 hours), presenting an promising half-life. In the determination of the antioxidant activity of the ester, an IC_{50} of 149.77 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ was observed, showing that there was an improvement in antioxidant activity after the esterification process. As for toxicity against to *Artemia salina*, an LD_{50} of 0.07 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was obtained for the ester and DL_{50} of 436.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for cinnamic acid, showing that benzyl cinnamate had higher toxicity than than cinnamic acid.

Keywords: cinnamic acid, benzyl cinnamate, antioxidante, toxicity, NS 88011.

1 INTRODUÇÃO

Ésteres aromáticos são compostos químicos de extrema importância para diversos segmentos industriais devido as propriedades que apresentam, sendo amplamente aplicados como fármacos. São geralmente obtidos através da esterificação de Fischer a qual se baseia na reação entre um álcool e um ácido carboxílico, na presença de um catalisador ácido, contudo, também podem ser preparados a partir de outras fontes, como anidridos ácidos ou cloretos de ácido carboxílico (CAVALCANTE, 2015).

A obtenção de ésteres via catálise enzimática é uma alternativa promissora devido às condições brandas utilizadas, à alta eficiência catalítica e a especificidade que as enzimas apresentam. Por esses motivos essa tecnologia vem sendo empregada na produção de produtos naturais para aplicação em diversos segmentos industriais. Todavia, devido ao alto custo de algumas enzimas torna-se necessária à sua reutilização, mas para que isso seja possível a enzima deve estar confinada em um suporte que permita sua recuperação do meio reacional e sua reutilização em outros ciclos reacionais (MARTINS, 2011; BILAL, 2018).

O ácido cinâmico é um composto encontrado naturalmente em diversas plantas e que pode ser aplicado na formulação, principalmente, de aromatizantes e cosméticos, no entanto a sua baixa solubilidade e seu alto ponto de fusão limitam a sua utilização (SUN e TIAN, 2018). Para contornar esse problema pode se fazer uso de ésteres derivados do ácido cinâmico, como o cinamato de benzila que é um sólido branco com baixo ponto de fusão (34 °C), que pode ser encontrado na natureza (própolis) ou obtido a partir do processo de esterificação entre o ácido cinâmico e o álcool benzílico (BATHIA et al, 2007a).

São muitos os relatos sobre as propriedades biológicas apresentadas por ésteres, contudo as atividades biológicas de um éster dependem da natureza química dos reagentes de partida (DUBEY, 2000; SOUZA, 2016). Dessa forma, estes podem apresentar atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante ou até mesmo pesticida e inseticida, sendo muito atrativos para aplicação em diversos produtos.

O cinamato de benzila é conhecido por possuir a capacidade de proteção contra radiação UV, tendo sido amplamente utilizado na formulação de protetores solares, podendo ser um composto promissor e de grande interesse para atuar como antioxidante e antimicrobiano, porém observa-se a falta de relatos na literatura sobre o estudo diretamente ligado a suas propriedades biológicas.

Neste contexto inseriu-se a proposta do presente trabalho que foi a produção de cinamato de benzila e avaliação das suas atividades biológicas. Para ser possível atingir o objetivo geral, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Otimizar a produção de cinamato de benzila utilizando a lipase NS 88011.
- Realizar o estudo de reuso da enzima e obter a constante de desativação térmica (k_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$).
- Avaliar a atividade antioxidante do éster e seus precursores.
- Avaliar a toxicidade do éster e do ácido cinâmico frente à *Artemia salina*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico será apresentada uma breve revisão do estado da arte no qual o presente trabalho se insere, iniciando pela importância dos ésteres, seguido pelas formas de obtenção, enfatizando os benefícios e o uso da catálise enzimática para a síntese desses compostos, finalizando com as propriedades biológicas que os mesmos possam apresentar.

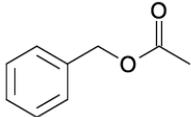
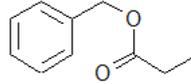
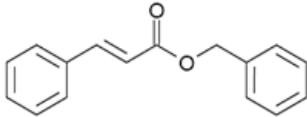
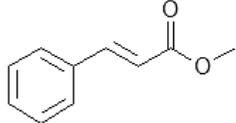
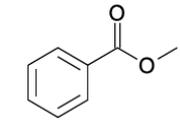
2.1 ÉSTERES AROMÁTICOS

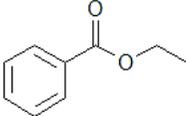
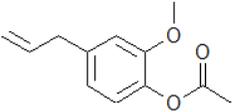
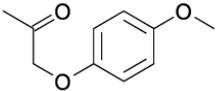
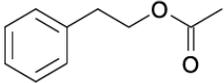
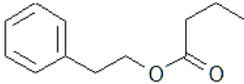
Ésteres são compostos orgânicos derivados dos ácidos carboxílicos e podem ser preparados através da reação de álcoois com ácidos, cloretos de ácidos ou anidridos em presença de um catalisador, são voláteis e estão amplamente distribuídos na natureza estando associados ao odor agradável exalado por flores e frutas, sendo encontrados também na gordura animal e nos óleos vegetais (triglicerídeos) (CAVALCANTE et al., 2015; VILAS BÔAS et al., 2017; SOUZA, OLIVEIRA e VALÉRIO, 2018).

Os ésteres aromáticos, são assim conhecidos por possuírem um anel aromático em sua estrutura molecular, sendo que os principais ésteres aromáticos são os de benzila, cresila, anisila, eugenila, cinamila, feniletila, benzoatos e ésteres cinâmicos, estes podem ser encontrados na natureza ou sintetizados em laboratório, sendo a que biocatálise enzimática é uma boa alternativa para sua obtenção (SÁ et al., 2017). A Tabela 1 apresenta a ocorrência e características aromáticas de alguns desses ésteres.

Esses compostos podem ser considerados um dos componentes mais importantes e versáteis na indústria. Os ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos como ácidos benzoicos, ácido salicílico, e ácido cinâmico possuem maior valor na indústria de perfumaria e aromas, como é o caso do salicilato de benzila, muito utilizado como fixador de perfume e na formulação de protetores solar, também são amplamente conhecidos por suas propriedades analgésicas, como por exemplo o salicilato de bornila que possui efeito antinociceptivo periférico e anti-inflamatório (SIVAKUMAR, PANGARKAR e SAWANT, 2002; MONTE, 2014).

Tabela 1. Ocorrência natural e característica aromática de ésteres aromáticos

Éster aromático	Estrutura química	Aroma/Fragância	Ocorrência Natural	Referências
Acetato de benzila		Cereja, abricó, morango	Cravo (<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunberg), Camomila (<i>Matricaria chamomilla</i>)	McGinty et al. (2012a) Oliveira et al. (2014)
Butirato de benzila		Frutado, ameixa	Cajazeira (<i>Spondias mombin</i> L.)	McGinty e Api (2012) Meneses et al. (2018)
Cinamato de benzila		Balsâmico doce	Lignina, Bálsamo do Peru, Própolis	Bathia et al. (2007a) Wang et al. (2015)
Cinamato de metila		Morango, balsâmico frutado	Morango	Bathia et al. (2007b) Nunes et al. (2017)
Benzoato de metila		Cereja	Ylang-ylang (<i>Canaga Odorata</i>)	Tan et al. (2015) Maruyama (2010)

Benzoato de etila		Frutado doce	Goiaba Serrana (Feijoa), Cajá	Zhu (2018) Narain et al. (2004)
Acetato de eugenila		Cravo, canela	Cravo-da-Índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Musthafa et al. (2016)
Acetato de <i>p</i> -anisila		Floral frutado	Baunilha	McGinty, Letizia e Api (2012b)
Acetato de 2-feniletila		Rosas	Jasmim, damasco rosa	Kuo et al (2014)
Butirato de 2-feniletila		Floral, Rosas	Óleo de menta	Li et al (2014) McGinty, Letizia e Api (2012c)

Fonte: A autora.

2.1.2 Aspectos econômicos

Alguns dos compostos que vêm dominando o mercado mundial de aditivos são os aromas, flavorizantes, melhoradores de sabor, acidulantes e emulsificantes, sendo que a indústria de aromas se destaca por corresponder à cerca de 55% dos bilhões de dólares do mercado químico global, movimentando 3,85 bilhões de dólares em 2015 e tendo como previsão uma taxa de crescimento anual composta (GRAS) de 6,2% entre 2016 e 2024 (POLLAK, 2011; MATTOS e SPEZIALI, 2017; RODRIGUES et al., 2017; SALES, 2018).

De acordo com o Banco Nacional do Desenvolvimento (BNDES) (2014), o segmento de aromas, fragrâncias e sabores é composto por produtos de alto valor agregado, quando comparado a outros segmentos, além de agregar valor à matéria-prima e ser atrativo para investimentos. Ainda para Speziali (2012), este setor não representa somente um mercado multibilionário, mas também uma fonte de desenvolvimento científico e inovação constante. As pesquisas realizadas envolvendo fragrâncias que são normalmente publicadas em artigos, revisões, livros e patentes, nos mostram a importância desses produtos tanto para indústria quanto para a área acadêmica. Devido à essa importância, cada vez mais as empresas estão procurando produzir produtos inovadores, usando processos mais ecológicos, eficientes e de baixo custo, buscando novas moléculas saborosas ou produtos químicos perfumados, moléculas com propriedades físico-químicas para compor formulação de perfumes e novos aromas que afetem positivamente o psicológico do cliente (MATTOS e SPEZIALI, 2017).

2.2 OBTENÇÃO DE ÉSTERES

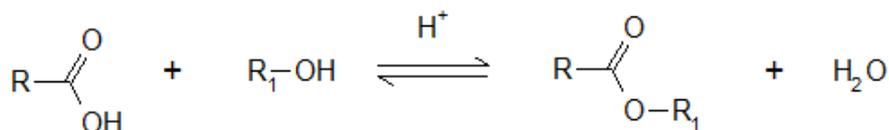
Uma das reações fundamentais da química orgânica é a reação de síntese de ésteres a partir da esterificação de álcoois com uma fonte versátil de doadores de acila, normalmente com um ácido carboxílico, porém também pode ser usada uma série de outros substratos, tais como, anidridos ácidos, cloretos de ácidos, amidas, nitrilas, hidrocarbonetos insaturados, éteres e ésteres (ASLAM, TORRENCE e ZEY, 2000; IWASAKI, MAEGAWA e MASHIMA, 2012). A seguir estão apresentadas algumas das formas de obtenção de ésteres.

2.2.1 Produção de ésteres a partir de ácidos carboxílicos e seus derivados

A esterificação de Fischer (Figura 1) é uma reação lenta e reversível (rendimento cerca de 60%) onde ocorre uma substituição nucleofílica do grupamento acila catalisada por ácido

mineral, normalmente ácido sulfúrico ou clorídrico concentrado, que permanece dissolvido no meio reacional e deve ser removido no final da reação por meio de lavagem aquosa alcalina (FELTRE, 1977; CAVALCANTE, 2015).

Figura 1. Esterificação de Fischer



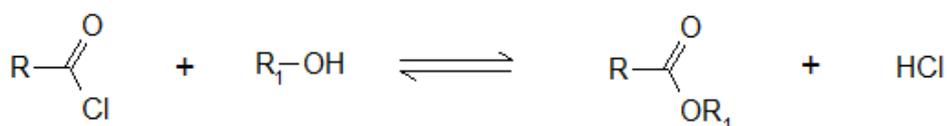
Fonte: Adaptado de Aslam, Torrence e Zey (2000).

A síntese direta de ésteres possui a vantagem de ser uma síntese de uma só operação, sendo assim o conhecimento sobre o equilíbrio da reação permite melhorar a sua utilidade, podendo fazer uso de excesso do álcool ou ácido a fim de deslocar o equilíbrio no sentido do produto resultante, aumentando assim o rendimento da reação (MORINSON, 1996). Outra forma de melhorar o rendimento é através da remoção de água à medida em que se forma no meio reacional (por destilação simples, destilação de uma mistura azeotrópica com benzeno ou peneiras moleculares) (SILVA, 1998).

Esterificação de cloretos de ácidos

Devido a esterificação direta muitas vezes ser lenta e incompleta pode se fazer uso do “artifício” de empregar um derivado do ácido carboxílico que seja mais reativo do que o próprio ácido, por exemplo a reação de um cloreto de acila com um álcool é satisfatória e é normalmente utilizada quando se deseja converter um álcool de alto custo em um éster. A reação geralmente é feita em piridina (Figura 2), que forma um sal com o HCl produzido, impedindo assim, que a solução se torne ácida (FELTRE, 1977; ALLINGER et al., 1976).

Figura 2. Esterificação a partir de um cloreto de ácido e álcool



Fonte: Adaptado de Aslam, Torrence e Zey (2000).

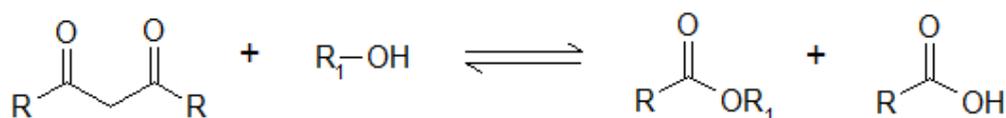
Para obter ésteres de forma mais rápida e completa a partir de derivados do ácido carboxílico, a reação pode ser realizada sob “condições de *Schotten-Baumann*” – onde ocorre a adição de NaOH aquoso ao meio reacional, visando consumir prontamente o HCl formado para deslocar o equilíbrio no sentido dos produtos (ISENMANN, 2018; BLAU e HALKET, 1993).

A grande vantagem deste método é que os substratos de difícil esterificação como fenóis e álcoois terciários também podem ser esterificados (ASLAM, TORRENCE e ZEY, 2000). Como as desvantagens, podemos citar altas cargas de rejeitos inorgânicos que devem ser separados do meio no final da reação o que envolve várias etapas de purificação, causando maior impacto ambiental e aumentando o custo de produção.

Esterificação de anidridos ácidos

O comportamento químico dos anidros ácidos em reações de esterificação é semelhante aos cloretos ácidos, porém a reação é mais lenta e reversível (Figura 3).

Figura 3. Esterificação a partir de um anidrido ácido e um álcool



Fonte: Adaptado de Aslam, Torrence e Zey (2000).

A vantagem de uso dos anidridos de ácidos como doadores do agrupamento acila é que a velocidade da reação de esterificação é mais rápida do que a reação reversa entre éster e ácido carboxílico recém-formados o que aumenta o rendimento da reação. Além disso, quando comparamos essa reação com a reação entre álcool e cloreto de ácido, o subproduto gerado é o ácido carboxílico (ácido fraco) ao invés de HCl (MORRISON, 1996).

Geralmente este método de esterificação é utilizado somente quando a reação ácido-álcool não pode ser efetuada, devido aos altos custos do anidrido (ASLAM, TORRENCE e ZEY, 2000).

Transesterificação

O termo transesterificação é usado para descrever uma classe de reações orgânicas onde um éster é transformado em outro através da troca de grupos alcoxi ou grupos acila, esta reação é reversível e ocorre mais rapidamente na presença de um catalisador (ácido ou base) (ASLAM, TORRENCE e ZEY, 2000; GERIS et al., 2007).

São conhecidos três tipos de transesterificação (ASLAM, TORRENCE e ZEY, 2000):

1- Alcoólise: neste processo o éster reage com um álcool (Figura 4).

Figura 4. Reação de transesterificação entre um éster e um álcool



Fonte: Adaptado de Aslam, Torrence e Zey (2000).

2- Acidólise: neste processo o éster reage com um ácido (Figura 5).

Figura 5. Reação de transesterificação entre um éster e um ácido



Fonte: Adaptado de Aslam, Torrence e Zey (2000).

3- Intercâmbio éster-éster: neste processo ocorre uma troca entre dois ésteres (Figura 6).

Figura 6. Reação de transesterificação entre dois ésteres



Fonte: Adaptado de Aslam, Torrence e Zey (2000).

Sabe-se que os processos de esterificação são de extrema importância para a produção de ésteres de interesse comercial, principalmente na área de solventes, essências, polímeros e para intermediários químicos em indústrias farmacêuticas, de herbicidas e pesticidas, contudo devido as desvantagens apresentadas pela catálise ácida, como a utilização de elevados níveis de energia na reação e a dificuldade de separação dos produtos, houve um aumento no interesse

por processos biocatalíticos, os quais utilizam lipases como catalisadores, sendo esta uma opção para a substituição de ácidos inorgânicos fortes na realização destas reações (ZAGO, 2010; GRAESER, 2013).

2.3 BIOCATÁLISE ENZIMÁTICA PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES

A biocatálise aplicada na produção de ésteres é uma alternativa ligada a *Green chemistry*, útil e promissora que foi eleita como uma das principais áreas de pesquisas emergentes para a manufatura sustentável (SÁ et al, 2017; SOUZA et al., 2017). Quando comparado à um processo químico tradicional, os processos enzimáticos são altamente eficientes e enantiosseletivos, geralmente reduzem o tempo de processo, o número de etapas e os resíduos gerados, além de ganhos energéticos já que as reações ocorrem as temperaturas bem mais amenas (WOHLGEMUTH, 2010; CHOI, HAN e KIM; 2015).

Porém, Martins et al. (2011), aponta que um fator importante é o custo da própria enzima, o que é uma desvantagem para o processo biotecnológico em comparação com a síntese química, exigindo assim que a enzima seja reutilizada várias vezes, mantendo sua atividade o maior tempo possível. O uso de enzimas imobilizadas, que estão fisicamente confinadas em um suporte para manter sua atividade enzimática, é uma alternativa a isso, pois este estado “imobilizado” permite a exploração repetida e contínua das enzimas para fins industriais, biotecnológicos e farmacêuticos (BILAL et al., 2018).

Várias estratégias podem ser realizadas para recuperar a atividade enzimática de sistemas imobilizados após cada ciclo de reação como, por exemplo, lavar a enzima com água ou um solvente orgânico, para eliminar qualquer substância adsorvida no suporte (MARTINS et al., 2011).

2.3.1 Uso de solventes na esterificação enzimática

A utilização de enzimas em meio aquoso foi extensamente usada em processos catalíticos, por vários anos. Porém, seu uso tornou-se limitado, pelo fato de muitos substratos serem pouco solúveis em água, o que demandava grande volume reacional e procedimentos de separação complexos. O uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas superou esse problema e o desenvolvimento de novos métodos de imobilização permitiu que várias reações pudessem se tornar viáveis. A adição de quantidade moderada de solvente orgânico é uma forma direta de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e de tornar a reação possível (AYRES-BARROS, 2002; GOMES et al., 2004) com alta proporção; é possível o uso de

substratos não-polares e em muitos casos as lipases são termodinamicamente mais ativas (VOULGARIS et al., 2015). Desta forma, reações como a esterificação e as interesterificações tornam-se viáveis industrialmente (SHARMA et al., 2001). A escolha do solvente orgânico também deve considerar que o mesmo não deve afetar fortemente a camada de hidratação da enzima, necessária para manter sua conformação nativa (VOULGARIS et al., 2015). Em contrapartida, nos solventes orgânicos, a ausência de água ou mesmo sua presença em quantidade traço, elimina a competitiva reação de hidrólise, reação preferencial das lipases, que pode provocar a degradação do produto de interesse em reações de esterificação e transesterificação (GANDHI et al., 2000).

2.4 ÉSTERES DE ÁCIDO CINÂMICO

De acordo com Adolpho (2012), o ácido cinâmico vem sendo largamente utilizado como precursor na síntese de ésteres cinâmicos para a aplicação nos setores de perfumaria, cosmética e medicamentos. No setor alimentício e farmacêutico, se destaca o éster cinamato de metila, que possui aroma frutífero adocicado, sendo o composto majoritário do aroma de morango e possuindo ação antibacteriana (PERRETO et al., 2014; NUNES, 2016).

Diversos autores vêm utilizando solventes orgânicos para realizar reações de esterificação dos ácidos aromáticos, aumentando assim a solubilidade dos substratos e tornando possível a formação do produto desejado. Zanetti et al. (2016), utilizou o solvente n-heptano para a produção de cinamato de geranila a partir do ácido cinâmico e geraniol, demonstrando que o uso do solvente contribui para a síntese do éster. A síntese de ésteres de ácido cinâmico utilizando enzima em meio com solvente orgânico também foi estudada por Jakovetić et al. (2013a), obtendo como resultado que o uso do solvente isooctano contribuiu de forma positiva na conversão em ésteres.

Estudos realizados por Dubey (2000), mostraram que o éster cinamato de etila é ativo contra os microrganismos *Scopulariopsis brevicaulis*, *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia pachydermatis* sendo adequado para o uso em cosméticos. Wang et al. (2016), otimizou a produção de cinamato de etila via catalise enzimática, os resultados mostraram um alto rendimento, chegando a 99% de conversão utilizando como solvente o isooctano, 30 mg.mL⁻¹ da enzima Lipozyme e razão molar 1:3 (ácido:álcool) em um tempo de 24 horas.

Segundo Souza (2016), a produção do éster cinamato de geranila vem sendo amplamente estudada por este apresentar indícios de propriedades antioxidantes e

antimicrobianas, apesar de sua aplicação ser pouco conhecida, possui patente registrada sob nº US20030036489 A1 (THE PROCTER e GAMBLE COMPANY, 2003) como ingrediente para perfume. Além de ter apresentado, em estudos realizados, eficácia como agente antibacteriano frente a bactérias patógenas em meio hospitalar e em alimentos.

Ainda para a aplicação na indústria farmacêutica, de cosméticos e alimentos, tem-se o éster cinamato de benzila, podendo este ser um composto promissor. Segundo Viegas e Correia (2014), o Bálsamo de Perú, uma resina aromática que pode ser obtida da árvore *Myroxylon pereirae*, possui em sua constituição o éster cinamato de benzila, sendo que este bálsamo está presente em mais de 200 componentes utilizados em pastelaria, bebidas e chás aromatizantes, além de estar presentes em produtos cosméticos e capilares.

A Tabela 2 apresenta dados de esterificação enzimática do ácido cinâmico com diferentes álcoois.

Tabela 2. Diferentes ésteres de ácido cinâmico obtidos via catálise enzimática

Substratos/ Razão molar	Enzima	Concentração de enzima	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Rendimento	Referência
Álcool etílico e ácido cinâmico (1:1)	Lipase pancreática porcina imobilizada	20 mg	Dimetilsulfóxido	65 °C	27	55 mM	Sharma, Chauhan e Kanwar (2011)
Álcool etílico e ácido cinâmico (15:1)	Novozym 435	75 mg	Isooctano	55 °C	96	30,7 %	Jakovetić et al. (2013a)
Álcool butílico e ácido cinâmico (15:1)	Novozym 435	75 mg	Isooctano	55 °C	96	45 %	Jakovetić et al. (2013a)
Álcool butílico e ácido cinâmico (7,5 mL:100 mg)	Novozym 435	2,5 % (m/m)	*	60 °C	360	97 %	Guyot et al. (1997)
Álcool benzílico e ácido cinâmico (3:1)	Lipozyme	30 mg.mL ⁻¹	Isooctano	40 °C	24	97,3%	Wang et al. (2015)
Álcool etílico e ácido cinâmico (3:1)	Novozym 435	7,5 g/cm ³	Terc-butanol	55 °C	3	12 mmol/dm ³ /h	Jakovetić et al. (2013b)

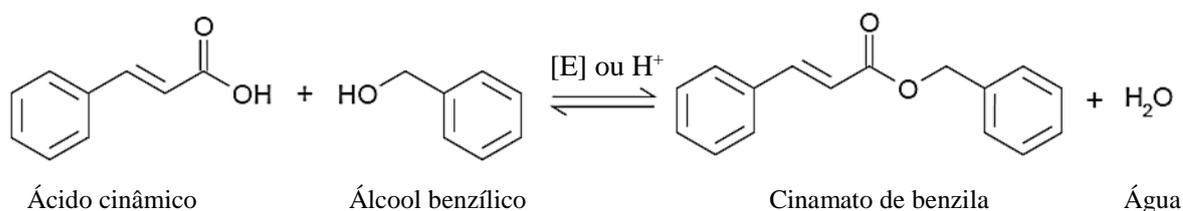
Fonte: A autora.

2.4.2 Cinamato de benzila

O éster cinamato de benzila é um sólido branco ou amarelo pálido, de odor balsâmico doce (BATHIA et al., 2007a; ZHANG et al., 2016) encontrado na natureza, sendo que há relatos de sua presença na própolis e nas folhas e galhos da *Oxalis pes-caprae* (Bermuda buttercup) (DELLAGRECA et al., 2007; ALIBONI et al., 2011, WANG et al., 2015).

Seu uso mundial está na faixa de 10 a 100 toneladas métricas por ano, podendo ser obtido através da extração de recursos naturais ou via reação de esterificação do ácido cinâmico e álcool benzílico, na presença de uma catalisador e aquecimento (BATHIA et al, 2007a), como mostra a Figura 7:

Figura 7. Reação de esterificação para a produção de cinamato de benzila



Fonte: Adaptado de Wang et al. (2015).

Este éster foi aprovado como um *flavor* pela *Food and Drugs Administration* (FDA), dos Estados Unidos, e o Conselho da Europa o incluiu na lista de substâncias que podem ser utilizadas em gêneros alimentícios (BATHIA et al, 2007a).

Sahinler e Kaftanoglu (2005), determinaram a composição da própolis de três províncias da Turquia, encontrando em sua composição cerca de 9,37% de cinamato de benzila. Estudos também mostraram que a atividade antibacteriana na própolis é resultado da complexa ação de várias estruturas aromáticas e outros compostos, dentre eles o cinamato de benzila.

Além da ação antibacteriana, o mesmo pode ser utilizado como antioxidante devido as suas propriedades redox, sendo relatado também a sua atividade anti-inflamatória, antirradiação ultravioleta e antifúngica (WANG et al., 2015).

2.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Para saber as atividades biológicas de um éster é fundamental a realização de bioensaios, dessa forma os ensaios toxicológicos complementam os ensaios biológicos (MACIEL, PINTO e VEIGA-JUNIOR, 2002).

2.5.1 Toxicidade frente à *Artemia salina*

A toxicidade de um composto pode ser definida como a capacidade que ele possui de instalar um estado patológico após a sua ingestão ou interação com um organismo (SOUZA, 2008). Bioensaios frente à *Artemia salina* são utilizados como indicador de toxicidade aguda, sendo essenciais para estudos de substâncias que possam apresentar possível atividade biológica (POMPILHO; MARCONDES e OLIVEIRA, 2014). Além disso, este é um ensaio utilizado para pesquisas bioguiadas no isolamento de agentes antitumorais e pesticidas (GUISALBERTI, 2008).

Diversos autores vêm estudando a correlação entre a toxicidade contra à *Artemia salina* com as atividades biológicas de diversos compostos. Krishnaraju et al. (2006) avaliou os extratos aquosos de 118 plantas indianas, e concluiu que a partir da triagem preliminar foi possível identificar plantas medicinais com atividade farmacológica contra a *A. salina*, sendo possível observar uma relação entre a letalidade de artêmias e a bioatividade de plantas. Pimenta et al. (2003), observaram através do bioensaio contra *A. salina* que as acetogeninas da Família Annonaceae são potenciais agentes pesticidas e antitumorais.

2.5.2 Atividade antioxidante

Uma das principais causas do envelhecimento precoce e de doenças como câncer, aterosclerose, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas é o estresse oxidativo. Os antioxidantes são as moléculas que previnem o dano celular causado pela oxidação de outras moléculas, eles podem interferir na reação em cadeia dos radicais livres, doando um átomo de hidrogênio ou um elétron a esses radicais (FRANKEL, WATERHOUSE e KINSELLA, 1993; YOSHIKAWA e NAITO, 2002).

Alguns compostos antioxidantes como o ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides e compostos fenólicos naturais têm sido apontados para a remoção de radicais livres e proteção da integridade estrutural de células e tecidos, contudo a eficácia de um antioxidante pode ser influenciada por uma série de fatores incluindo suas características estruturais, concentrações,

temperatura, tipo do substrato e estado físico do sistema (VENKATESWARLU et al., 2006; SHAHIDI e ZHONG, 2015).

Há diversos relatos de propriedades biológicas de derivados do ácido cinâmico, devido a isso, o potencial antioxidante destes compostos vem sendo estudado, Freitas et al. (2016), avaliou a atividade antioxidante do diéster p-metoxicinâmico e concluiu que este composto possui atividade antioxidante significativa, inibindo a produção de espécies intracelulares de oxigênio reativo, com efeito semelhante ao Trolox (um antioxidante comercial com propriedade antioxidante conhecida).

Considerando os diversos relatos da atividade antioxidante atribuída aos derivados do ácido cinâmico, evidencia-se a necessidade de ampliar os estudos desses compostos com o intuito de encontrar novos compostos ativos que possam ser aplicados industrialmente com o intuito de trazer benefícios aos consumidores.

Dessa forma o presente trabalho traz uma forma alternativa para a obtenção de cinamato de benzila utilizando baixas concentrações da enzima NS 88011, diferente das condições já apresentadas na literatura atualmente, as quais utilizam altíssimas cargas enzimáticas. Além disso, foi possível demonstrar a atividade antioxidante e a toxicidade do éster em comparação a seus precursores.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico serão descritos os materiais, procedimentos experimentais e metodologias de análises utilizadas na fase experimental do presente trabalho para a obtenção do éster cinamato de benzila via catálise enzimática, a partir do ácido cinâmico e álcool benzílico.

3.1 Materiais

3.1.1 Substratos

Para a realização do presente estudo foram utilizados os seguintes substratos: álcool benzílico SIGMA-ALDRICH[®], ácido cinâmico SIGMA-ALDRICH[®], n-heptano VETEC[®], padrão cinamato de benzila (99% de pureza) SIGMA-ALDRICH[®], n-hexano CHEMIS[®], acetato de etila VETEC[®], cloreto de metileno QUÍMICA MODERNA[®], ácido oleico SYNTH[®], álcool etílico QUIMEX[®], hidróxido de sódio VETEC[®], dimetilsulfóxido SIGMA-ALDRICH[®], bicarbonato de sódio NUCLEAR[®], sílica gel 60 FLUKA[®], 2,2-difenil-1-picril-hidrazil SIGMA-ALDRICH[®], cloreto de sódio (comercial) SALAZIR[®].

3.1.2 Enzima

A enzima utilizada para o estudo da produção de cinamato de benzila foi a Lipase NS 88011 (*Candida antarctica*), imobilizada em uma resina polimérica hidrofóbica (NOVOZYMES[®]).

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação (AE) da lipase NS 88011 foi determinada através do consumo de ácido oleico na reação entre o ácido oleico e o etanol (razão molar 1:1 (v/v)), segundo a metodologia descrita por Ferraz (2012), com algumas modificações. Inicialmente um ensaio em branco (sem enzima) foi realizado, para determinar a acidez do meio reacional. A reação foi iniciada pela adição da enzima (aproximadamente 0,1 g) em 5 mL da mistura reacional e conduzida em frascos fechados em agitador orbital à 40 °C, 150 rpm, durante 40 minutos. Em seguida alíquotas de 500 µL foram retiradas e 15 mL de uma mistura acetona:etanol (1:1) (v/v) foram adicionados para interromper a reação.

A quantidade de ácido oleico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,05 mol.L⁻¹ até o meio atingir pH 11. Uma unidade de atividade da lipase foi definida como a

quantidade de ácido oleico (em μmol) convertido para grama de enzima por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$AE (U.g^{-1}) = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \times m \times V_c}$$

Equação (1)

Onde:

V_a : volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos (mL)

V_b : volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (mL)

M: molaridade da solução de NaOH

V_f : volume final do meio reacional (mL)

t: tempo (minutos)

m: massa do extrato enzimático (g)

V_c : volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL)

3.2.2 Reação de esterificação

A síntese do cinamato de benzila foi realizada a partir do preparo de uma mistura reacional contendo ácido cinâmico e álcool benzílico nas condições de temperatura e concentração de enzima pré-estabelecidas pelo Delineamento Central Composto Rotacional 2² (DCCR) (Tabela 3), a razão molar utilizada foi fixada em 1:3 (100 μmol ácido e 300 μmol de álcool), sendo determinada por testes preliminares, onde a razão molar foi variada em 1:1, 1:3 e 1:5; e o tempo reacional foi fixado em 48 horas previamente definido em um estudo cinético. O delineamento experimental foi realizado com triplicata no ponto central para avaliar o erro associado com o processo, além de estimar os efeitos quadráticos (MENDONÇA, 2012). Para auxiliar na análise estatística dos dados fez-se uso do software Statistica[®] 5.0 (Statsoft Inc., EUA), utilizando um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Os substratos foram adicionados em Erlenmeyers de 50 mL e diluídos em 10 mL de n-heptano, à 50°C sob agitação magnética, após a total dissolução a enzima foi adicionada à mistura reacional. Todos os experimentos foram conduzidos em agitador orbital com agitação constante de 125 rpm durante 48 horas em diferentes temperaturas. Após o término do tempo reacional o biocatalisador foi separado da mistura reacional pelo método de filtração simples e

a mesma foi acondicionada sob refrigeração (aproximadamente $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$) para posterior determinação da conversão.

Tabela 3. Variáveis e níveis estudados no delineamento central composto rotacional 2² (DCCR) para a produção de cinamato de benzila

Variáveis/Níveis	Concentração de enzima (mg.mL ⁻¹)	Temperatura (°C)
-1,41	0,36	50,20
-1	0,94	53,00
0	2,36	60,00
1	3,77	67,00
1,41	4,36	69,80

3.2.3 Determinação da conversão em cinamato de benzila

As análises de conversão da reação foram realizadas em cromatógrafo gasoso GC-2010 da marca Shimadzu com injetor automático e detector de ionização de chama (FID). As análises foram realizadas utilizando a coluna capilar de polietilenoglicol (PEG) Rtx-Wax (30 m x 0,25 mm), 0,25 μm de espessura de filme, com tempo total de análise de 35 minutos, com a seguinte programação de temperatura: inicial em $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, aumentando de $40\text{-}200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) permanecendo por 25 minutos. A temperatura do detector e injetor foi de $220\text{ }^{\circ}\text{C}$, modo de injeção Split 1:50 e gás de arraste: N_2 ($30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), H_2 ($40\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) e ar sintético ($400\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). A amostra foi diluída em cloreto de metileno numa proporção de 1:10 (v/v, amostra:solvente).

3.2.4 Determinação do tempo reacional para produção de cinamato de benzila

O estudo cinético foi realizado na condição maximizada (razão molar 1:3 (ácido:álcool); temperatura de $58,8^{\circ}\text{C}$ e concentração de enzima $4,45\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) definida a partir do delineamento experimental realizado, alíquotas de $100\text{ }\mu\text{L}$ foram retiradas do meio reacional em diferentes tempos, até 48 horas e posteriormente analisadas em cromatógrafo gasoso para determinação da conversão.

3.5.5 Determinação da constante de desativação térmica (k_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$)

A determinação da constante de desativação térmica (k_d) da lipase NS 88011 foi calculada na temperatura da condição de maximização ($58,8\text{ }^{\circ}\text{C}$) de acordo com o modelo

cinético de Arrhenius (Equação 2), considerando que a enzima segue uma cinética de primeira ordem (FICANHA, 2017).

$$A = A_0 e^{(-k_d \cdot t)}$$

Equação (2)

Onde:

A : atividade final

A₀ : atividade inicial

t : tempo (horas)

k_d : constante de desativação

O tempo de meia vida da enzima, tempo necessário para ocorrer a redução de 50% da atividade inicial, foi calculado pela Equação 3.

$$t_{1/2} = -\frac{\ln 0,5}{k_d}$$

Equação (3)

Onde:

t_{1/2} : tempo de meia vida

k_d : constante de desativação

3.2.6 Estabilidade operacional da enzima

Os ciclos de reuso da enzima foram determinados a partir da reação de esterificação realizada na condição de maximização obtida após a realização do delineamento experimental. Após cada reação as enzimas foram separadas do meio reacional através de uma filtração simples e então lavadas duas vezes com 10 mL de n-hexano, após o procedimento, as mesmas permaneceram durante 24 horas em dessecador a temperatura ambiente, sendo então novamente utilizadas em uma nova batelada.

3.2.7 Isolamento do éster

Para isolamento do éster formado durante a reação de esterificação empregou-se a cromatografia em coluna (CC) empacotada com sílica gel 60 (70-230 mesh). Como fase móvel foi usada uma mistura de solventes formada por hexano e acetato de etila em diferentes razões (9:1; 8:2; 7:3) de acordo com a metodologia utilizada por Jakovetić et al. (2013a).

Inicialmente foram adicionados 2 mL da mistura reacional na coluna e em todo o processo de separação recolheram-se frações de aproximadamente 10 mL. O acompanhamento da separação foi realizado por cromatografo gasoso conforme a metodologia descrita anteriormente no item 3.2.3.

3.2.8 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do cinamato de benzila e seus precursores foi fundamentada no método espectrofotométrico que se baseia na medida da extinção da absorção do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) à 515 nm (VANIN et al., 2014).

A determinação da atividade antioxidante consistiu na incubação, durante 30 minutos, de 500 µL de uma solução etanólica, contendo o composto diluído, com 500 µL de uma solução etanólica de DPPH 0,1 mmol.L⁻¹. Para a preparação da solução controle utilizou-se 500 µL de etanol mais 500 µL da solução etanólica de DPPH, para a solução denominada “branco” foi utilizado somente etanol.

O percentual de captação do radical DPPH foi calculado em termos de porcentagem de atividade antioxidante (AA%), conforme a Equação 4:

$$AA\% = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] \div Abs_{controle}\}$$

Equação (4)

Onde:

Abs_{amostra} : absorbância da amostra

Abs_{branco} : absorbância do branco

Abs_{controle} : absorbância do controle

A leitura espectrofotométrica foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível (Pró-Análise® UV-1600), após a avaliação da faixa de concentração ideal, calculou-se a quantidade do composto necessária para capturar 50% do radical DPPH (IC₅₀) por análise de regressão linear.

3.2.9 Toxicidade frente à *Artemia salina*

A avaliação da toxicidade do cinamato de benzila e do ácido cinâmico frente à *Artemia salina* foi realizada de acordo com a adaptação da metodologia descrita por Meyer et al. (1982). Inicialmente 0,1 g de cistos de *Artemia salina* foram adicionados em um litro de uma solução salina composta por 10 g.L⁻¹ de sal marinho e 0,7 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio, após a solução

contendo os cistos foi incubada à 24 °C durante 24 horas, sob aeração e iluminação artificial, para que ocorresse a eclosão dos ovos.

Soluções contendo diferentes concentrações do éster (0,5 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram preparadas em água salina contendo 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO). Para uma placa de petri foi transferido um volume de 10 mL das soluções e então adicionados 50 náuplios de *Artemia salina*. Após 24 horas foi feita a contagem dos náuplios vivos e mortos. Frente aos dados de mortalidade foi obtido o valor de DL_{50} (dose letal de amostra para 50% da população) a partir da regressão linear.

Testes somente com a solução de água salina e água salina contendo 0,1% de DMSO também foram realizados para confirmar que a mortalidade dos náuplios se deu em decorrência da toxicidade do composto e não devido à falta de alimentação.

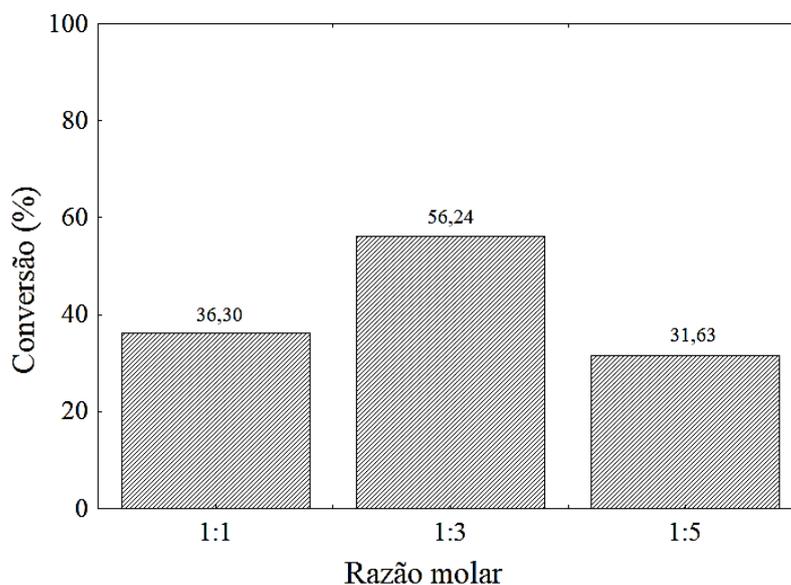
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos na maximização da produção, identificação e isolamento do éster cinamato de benzila, além de relatar sua atividade antioxidante e toxicidade e comparar com a de seu ácido precursor.

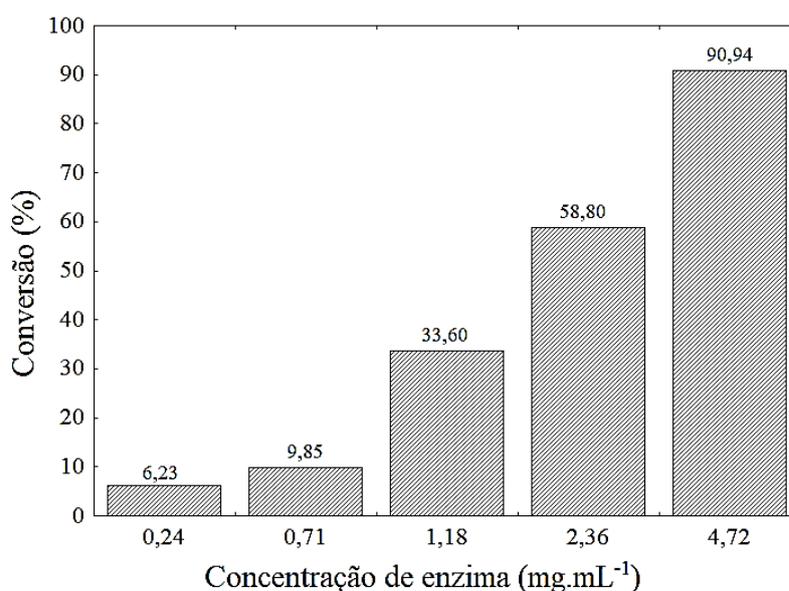
4.1 Maximização da produção enzimática de cinamato de benzila

Para a condução dos experimentos optou-se pela utilização do solvente n-heptano por apresentar bons resultados em estudos da esterificação de ácido cinâmico utilizando a lipase NS 88011 (ZANETTI et al., 2016). Aragão et al. (2009) estudou o efeito de solvente para a produção de ésteres utilizando lipases e também evidenciou que o solvente n-heptano leva à bons rendimentos da reação. Sun e Tian (2018) observaram que o solvente n-heptano foi eficaz para a produção de cinamato de benzila utilizando catalise enzimática, e atribui esse fato ao solvente ser apolar e possuir alto valor de log P (4,0), o que pode contribuir com o aumento da atividade enzimática.

A partir da execução de testes preliminares baseados na literatura (WANG et al., 2015), a razão molar para condução dos experimentos foi fixada em 1:3 (ácido:álcool). Os testes consistiram na realização da reação de esterificação nas razões molares de 1:1; 1:3 e 1:5 (ácido:álcool), sendo evidenciado o maior rendimento na condição 1:3 (Figura 8), o resultado obtido se assemelha aos dados encontrados por Wang et al. (2015), que estudou a produção de cinamato de benzila nas razões molares de 1:1; 1:3; 1:6 e 1:9 (ácido:álcool), onde a conversão máxima também foi obtida na razão molar 1:3. Esta condição se mostra como sendo a melhor pois o excesso do álcool benzílico desloca o equilíbrio termodinâmico no sentido do produto, aumentando a produção de cinamato de benzila. Já para condições com maior excesso de álcool (razão molar 1:5), a diminuição do rendimento pode ocorrer devido à uma inibição da lipase causada pelo álcool (WANG et al., 2015). Madalozzo (2011), também evidenciou esse efeito ao testar diferentes razões molares na produção de ésteres etílicos, obtendo maiores conversões na proporção 1:3 (ácido oleico:etanol), sendo que em condições onde o excesso de álcool era muito alto houve um menor rendimento, sendo explicado pela ação prejudicial do etanol à enzima. Essa ação ocorre devido ao caráter polar do álcool que leva à uma interação hidrofílica com a camada de água presente na enzima, a retirada dessa água, que é essencial em sua estrutura, faz com que a mesma perca parcialmente sua atividade (KHAN, JADHAV e RATHOD, 2016; TANG et al., 2017; MANAN et al., 2018).

Figura 8. Efeito da razão molar na produção de cinamato de benzila

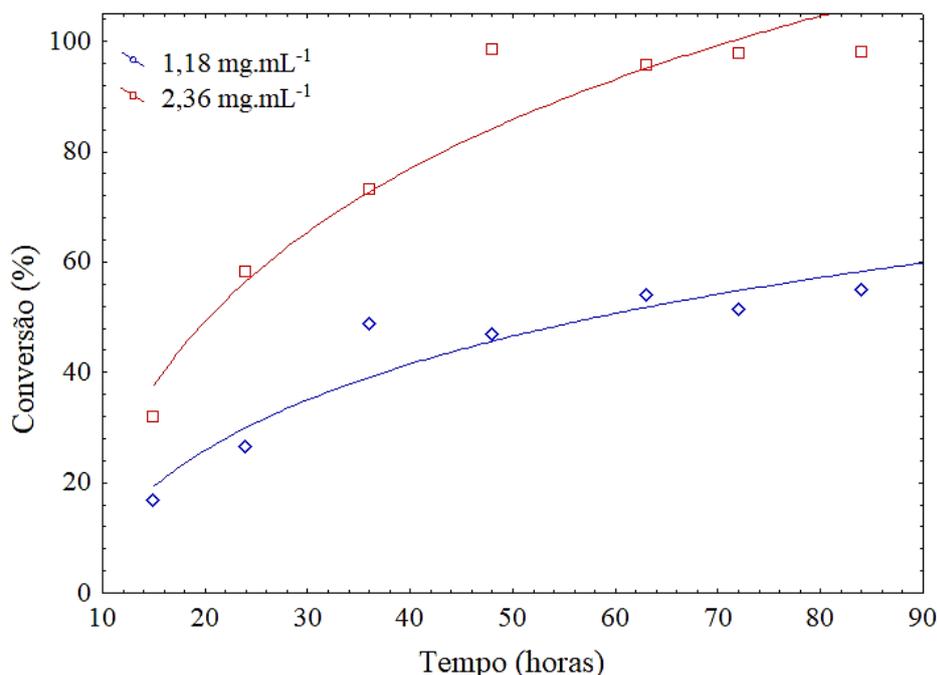
Para a definição do intervalo de concentração enzimática a ser trabalhada, alguns ensaios fixando a razão molar em 1:3, temperatura em 60 °C e tempo de 24 horas foram realizados, as concentrações de enzima escolhidas foram 0,24; 0,71; 1,18; 2,36 e 4,72 mg.mL⁻¹ e as conversões obtidas podem ser observadas na Figura 9.

Figura 9. Conversão em cinamato de benzila em diferentes concentrações enzimáticas

Analisando a Figura 9 percebe-se que as conversões mais expressivas obtidas em 24 horas foram nas concentrações de enzima de 1,18; 2,36 e 4,72 mg.mL⁻¹, correspondendo, respectivamente, as conversões de 33,6%; 58,80% e 90,94%. Com o propósito de avaliar o tempo para aumentar a conversão em éster optou-se por realizar uma cinética de 84 horas nas

concentrações de enzima de 1,18 e 2,36 mg.mL^{-1} , essas concentrações foram escolhidas com objetivo avaliar qual o tempo de máxima produção do éster em menores concentrações enzimáticas, visando a redução do custo do processo. A Figura 10 apresenta a conversão obtida após 84 horas de reação.

Figura 10. Cinética da produção de cinamato de benzila à temperatura de 60°C, concentração de enzima de 2,36 e 1,18 mg.mL^{-1} e razão molar 1:3



A cinética mostrou que após 48 horas de reação não há aumento na conversão em cinamato de benzila, tendo conversão acima de 90% na concentração de enzima de 2,36 mg.mL^{-1} e conversão próxima à 40% na concentração de 1,18 mg.mL^{-1} . Dessa maneira definiu-se o tempo reacional em 48 horas e as variáveis independentes escolhidas para serem estudadas foram a concentração de enzima e a temperatura.

Após a definição da razão molar e do tempo de reação, um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) ²² foi conduzido com o objetivo de encontrar a melhor condição de produção do éster em função da temperatura e concentração de enzima.

A Tabela 4 apresenta a matriz do DCCR ²² com os valores reais e codificados e as respostas em termos de conversão em cinamato de benzila, utilizando 10 mL de solvente (n-heptano) em um tempo de 48 horas.

Tabela 4. Matriz do Delineamento Central Composto Rotacional 2² com valores reais e codificados e a resposta em termos de conversão em cinamato de benzila

Ensaio	Concentração de enzima (mg.mL ⁻¹)	Temperatura (°C)	Conversão (%)
1	-1 (0,94)	-1 (53)	19,8
2	1 (3,77)	-1 (53)	87,8
3	-1 (0,94)	1 (67)	6,5
4	1 (3,78)	1 (67)	62,8
5	-1,41 (0,36)	0 (60)	12,7
6	1,41 (4,36)	0 (60)	97,4
7	0 (2,36)	-1,41 (50,13)	40,1
8	0 (2,36)	1,41 (69,87)	29,2
9	0 (2,36)	0 (60)	75,5
10	0 (2,36)	0 (60)	71,5
11	0 (2,36)	0 (60)	79,5

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4 é possível observar que o maior rendimento foi obtido no ensaio 6 (97,4%) para a concentração de enzima de 4,36 mg.mL⁻¹ e temperatura de 60 °C. O aumento do rendimento com o aumento da temperatura pode ser atribuído a esterificação ser uma reação endotérmica, fazendo com que o aumento da temperatura gere colisões mais energéticas dos substratos contribuindo para a formação do cinamato de benzila (SUN e TIAN, 2018), porém temperaturas muito altas podem levar a desativação térmica induzida pela temperatura, já que as lipases são vulneráveis ao calor (SHINTRE, GHADGE e SAWANT, 2002).

O aumento na produção do éster com o aumento da concentração de enzima pode ser relacionado com a quantidade de sítios ativos, quanto maior a quantidade de enzima maior a quantidade de sítios ativos disponíveis para a formação do complexo acil-enzima (NOVAES et al., 2018).

Sun e Tian (2018), ao estudar a produção de cinamato de benzila observaram que o rendimento aumentou com o aumento das variáveis, sendo que o rendimento máximo pôde ser obtido em temperaturas de 40-50 °C e concentrações de enzimas maiores de 20 mg.mL⁻¹.

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente e o efeito das variáveis encontram-se na Tabela 5, após 48 horas de reação o efeito da concentração de enzima e da temperatura

apresentaram, respectivamente, efeito significativo positivo e negativo, à nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). Sendo assim maiores níveis de concentração de enzima levam à maiores conversões.

Tabela 5. Efeito das variáveis para a produção de cinamato de benzila

Parâmetro	SS	DF	MS	F	P
(1) Concentração de enzima (L)*	7445,54	1	7445,539	332,3350	0,000002
Concentração de enzima (Q)*	602,60	1	602,603	26,8975	0,002042
(2) Temperatura (L)*	361,25	1	361,254	16,1247	0,006994
Temperatura (Q)*	2391,15	1	2391,150	106,7301	0,000048
Erro	134,42	6	22,404		
Total SS	10448,30	10			

* efeitos significativos à nível de $p < 0,05$.

SS: soma dos quadrados; DF: grau de liberdade; MS: média dos quadrados.

Os dados estatísticos permitiram a obtenção de um modelo matemático empírico codificado para a produção de cinamato de benzila em função da concentração de enzima e da temperatura (Equação 5).

$$\text{Conversão (\%)} = 75,5 + (30,55 \times E) - (10,37 \times E^2) - (6,72 \times T) - (20,6 \times T^2)$$

Equação (5)

Onde:

E: concentração de enzima

T: temperatura

A concentração de enzima e temperatura ótimas para a produção de cinamato de benzila foram calculadas a partir da derivada parcial do modelo empírico obtido, sendo assim a máxima conversão pode ser alcançada quando os níveis forem 1,47 e -0,16 para a concentração de enzima e temperatura, respectivamente, correspondendo à de $4,45 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $58,8^\circ\text{C}$.

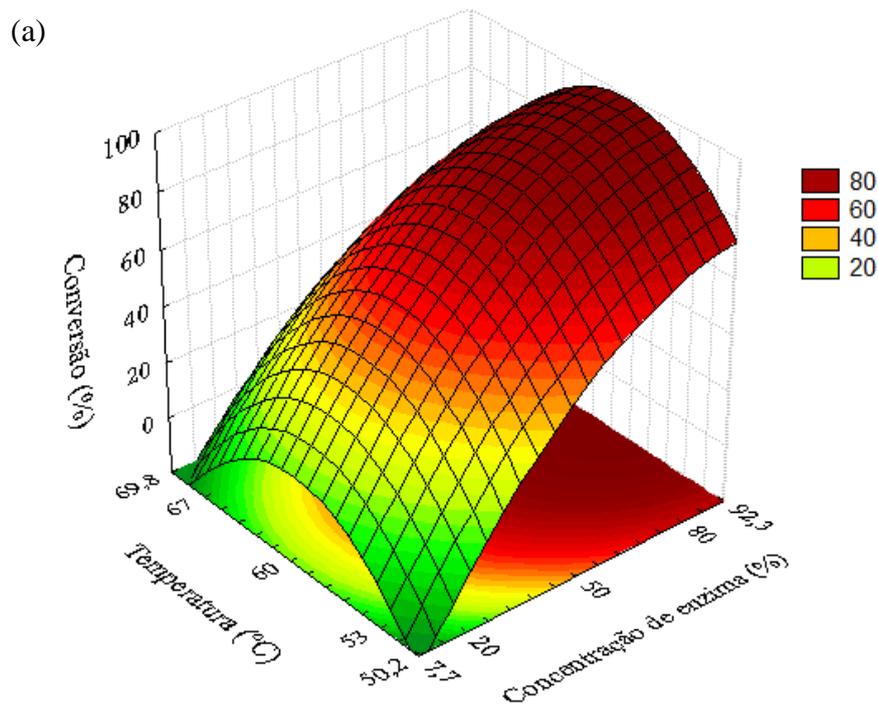
Para a realização da Análise de Variância (ANOVA) levou-se em consideração somente os parâmetros que apresentaram efeito significativo para a produção do éster de interesse, sendo que os resultados se encontram apresentados na Tabela 6.

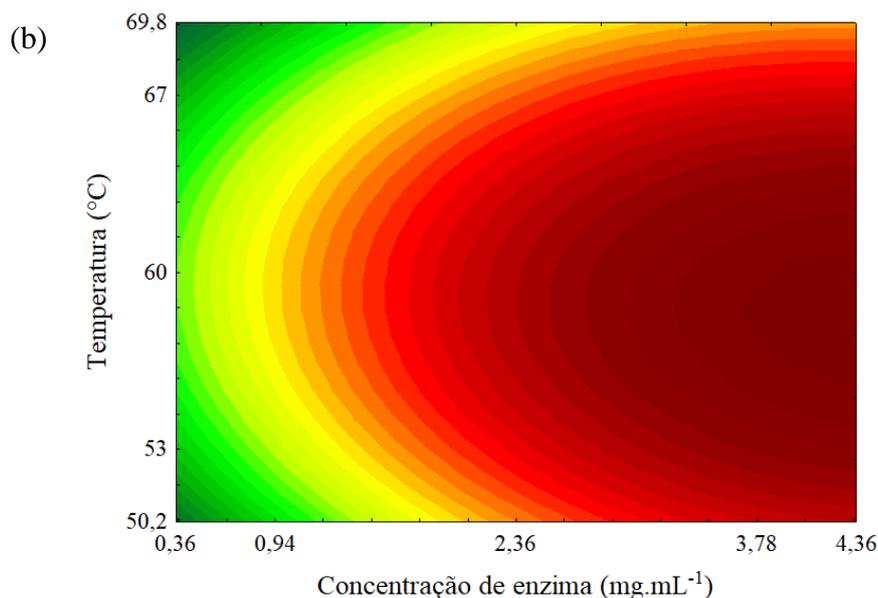
Tabela 6. Análise de Variância (ANOVA) para a produção do éster cinamato de benzila

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	10313,88	4	2578,47	115,09
Resíduo	134,42	6	22,40	
Total	10448,30	10		

R = 0,99; F_{tabelado} = 4,53

A partir da ANOVA verificou-se que o coeficiente de correlação R obtido foi de 0,99 e sendo que o F calculado foi 25,4 vezes maior que o F tabelado. Esses resultados validaram estatisticamente o modelo empírico para a produção de cinamato de benzila nas condições estudadas ($p < 0,05$), permitindo a construção da superfície de resposta e da curva de contorno, que se encontram na Figura 11 (a e b).

Figura 11. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de cinamato de benzila em função da concentração de enzima e temperatura



Como pode ser observado na Figura 11, maiores conversões em cinamato de benzila são alcançadas quando utilizadas maiores concentrações de enzima em temperaturas próximas à 60 °C.

Afim de analisar a qualidade do modelo empírico gerado, os desvios relativos entre os valores experimentais e os preditos pelo modelo foram calculados e estão apresentados na Tabela 7. O valor máximo de desvio relativo apresentado foi de 14,1%, no ensaio 8 e para o ensaio 6 onde obteve-se a maior conversão, o desvio relativo foi de apenas 0,5%, demonstrando uma boa capacidade preditiva do mesmo.

Tabela 7. Valores experimentais, preditos e desvio relativo para a produção de cinamato de benzila

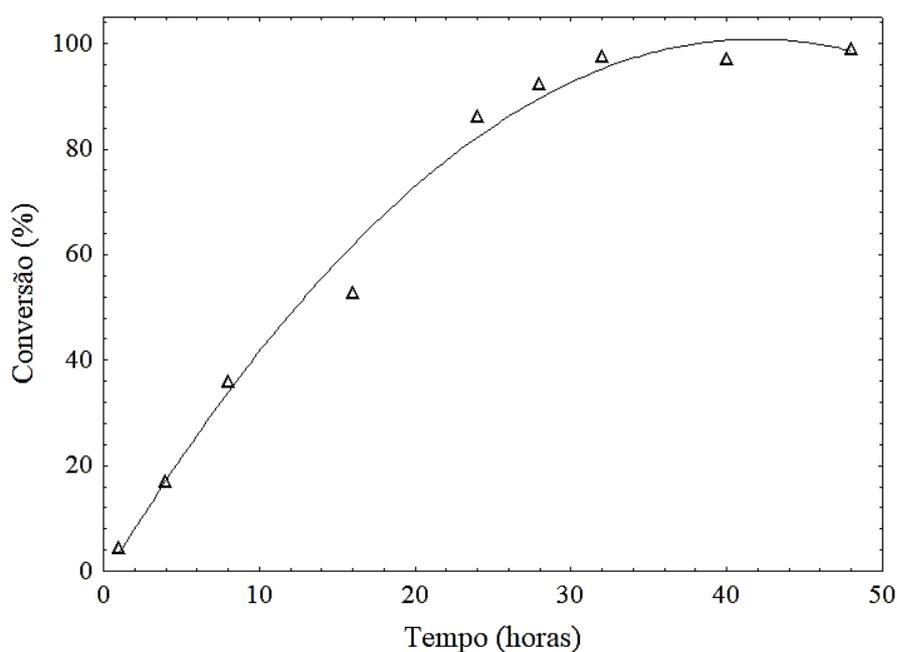
Ensaio	Conversão Experimental (%)	Conversão Predita (%)	Desvio Relativo (%)
1	19,8	20,7	4,5
2	87,8	81,8	6,9
3	6,5	7,26	11,0
4	62,8	68,4	0,8
5	12,7	11,8	7,5
6	97,4	98,0	0,5
7	40,1	44,0	9,8
8	29,2	25,1	14,1
9	75,5	75,5	0,0
10	71,5	75,5	5,7
11	79,5	75,5	5,1

4.2 Avaliação cinética da produção de cinamato de benzila

Afim de reduzir o tempo reacional uma cinética foi realizada na condição maximizada obtida através do modelo empírico, sendo a razão molar 1:3 (ácido:álcool), temperatura 58,8 °C, 4,45 mg.mL⁻¹ de enzima, solvente n-heptano, durante 48 horas. Os resultados estão apresentados na Figura 12 e ao analisa-la percebe-se que conversões acima de 90% são alcançadas a partir das 28 horas, sendo que após as 32 horas a conversão em éster chega a 97,6% e após esse período a produção encontra-se estabilizada.

Dessa forma, a condição máxima para a produção de cinamato de benzila foi definida como sendo razão molar 1:3 (ácido:álcool), temperatura de 58,8 °C, 4,45 mg.mL⁻¹ de enzima (NS 88011), solvente n-heptano, durante 32 horas.

Figura 12. Cinética da produção enzimática do cinamato de benzila



Zhang et al. (2016) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar a produção de cinamato de benzila a partir do ácido cinâmico e álcool benzílico utilizando a lipase comercial Lipozyme em meio contendo isoctano. A condição ótima foi alcançada ao utilizar a razão molar 1:2,6 (ácido:álcool), temperatura de 40°C e 31 mg.mL⁻¹ de enzima, durante 27 horas chegando à 97,7% de conversão. A produção do éster cinamato de benzila também foi estudada por Wang et al. (2015), onde a maior conversão obtida foi de 97,3% utilizando 30 mg.mL⁻¹ da lipase Lipozyme e solvente isoctano em um tempo de 24 horas, razão molar 1:3 (ácido:álcool) à temperatura de 40 °C.

Sun e Tian (2018), utilizaram a lipase comercial Novozym 40086 e solvente isooctano para a produção de cinamato de benzila e obtiveram como resultado 96,2% de conversão em 11,3 horas, temperatura de 46,4 °C, razão molar 1:3 (ácido:álcool).

Percebe-se que os resultados dos autores anteriormente citados se assemelham aos encontrados no presente trabalho, contudo pode-se salientar que a concentração de enzima aqui utilizada é consideravelmente menor e altos rendimentos também foram encontrados, este é um fator importante a ser considerado, visto que as enzimas possuem um alto valor, e a sua redução pode diminuir consideravelmente o custo do processo.

4.3 Constante de desativação térmica (k_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$)

O uso de enzimas em processos industriais requer uma compreensão da estabilidade operacional da enzima, por isso a constante de desativação térmica e o tempo de meia vida são parâmetros básicos a serem conhecidos antes de projetar um processo (MALLA e GUMMADI, 2018). Para demonstrar esses parâmetros a atividade enzimática da lipase foi medida no tempo 0 e após 32 horas de reação à 58,8 °C (condição maximizada), os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Constante de desativação térmica e tempo de meia vida da lipase NS 88011 na temperatura de 58,8 °C

Atividade enzimática (U.g ⁻¹)	Constante de desativação térmica (k_d) (h ⁻¹)	Tempo de meia vida ($t_{1/2}$) (h)
1678,78	0,0014	505,95

A atividade da enzima no tempo 0 foi de 1754,02 U.g⁻¹.

O alto tempo de meia vida da enzima sugere que esta pode ser utilizada durante cerca 505,95 horas mantendo até 50% de sua atividade enzimática inicial, demonstrando que a lipase NS 88011 possui condições de ser empregada industrialmente na produção de cinamato de benzila devido à sua alta eficiência e considerável tempo de meia vida.

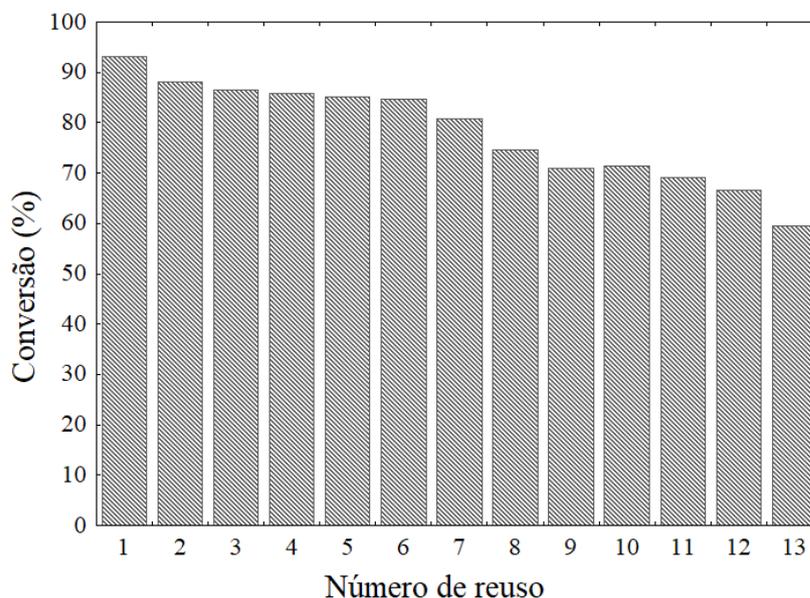
4.4 Estabilidade operacional da lipase NS 88011

A atividade residual de uma enzima imobilizada é um dos fatores mais importantes para aplicações industriais, por isso, investigar a estabilidade e reutilização da enzima imobilizada fornece informações importantes para avaliar a economia do processo (KIM et al., 2018).

Para confirmar a capacidade de reuso da enzima e o tempo de meia vida obtido experimentalmente (item 4.3) foi realizada a avaliação da estabilidade operacional da enzima. Os ensaios foram conduzidos nas condições de maximização da produção de cinamato de

benzila descritas anteriormente no item 4.2 e os resultados em termo de conversão estão apresentados na Figura 13.

Figura 13. Estabilidade operacional da enzima NS 88011 na produção de cinamato de benzila



*Cada ciclo corresponde a 32 horas.

Foi possível observar através dos ciclos de reuso da enzima, que foram obtidas conversões acima de 80% até o 7º ciclo, mantendo a atividade acima de 60% até o 13º (ciclo, correspondendo a 416 horas reacionais. Os resultados obtidos confirmam a boa estabilidade operacional da lipase NS 88011 nas condições estudadas.

Dalla Costa (2018), obteve resultados semelhantes, sendo que para a produção de oleato de ascorbila utilizando a lipase NS 88011 e solvente terc-butanol, a enzima manteve 50% de sua atividade inicial até o 14º ciclo. Wang et al. (2015) avaliou a estabilidade operacional da enzima Lipozyme TLIM na produção de cinamato de benzila utilizando isooctano, e obteve como resultado a perda de mais de 50% da conversão após 4 ciclos, dessa maneira a enzima utilizada para a síntese de cinamato de benzila no presente trabalho apresentou uma maior capacidade de reuso, uma característica importante para a aplicação do processo industrialmente, pois gera grande economia com catalisador.

Sun e Tian (2018) avaliaram o reuso da lipase NS 40086 na produção de cinamato de benzila em meio contendo isooctano e os resultados demonstraram conversões acima de 80% até o 9º ciclo de 11,3 horas, resultados também semelhantes ao encontrados no presente trabalho, visto que foi alcançado mais de 80% de conversão no 7º ciclo de 32 horas.

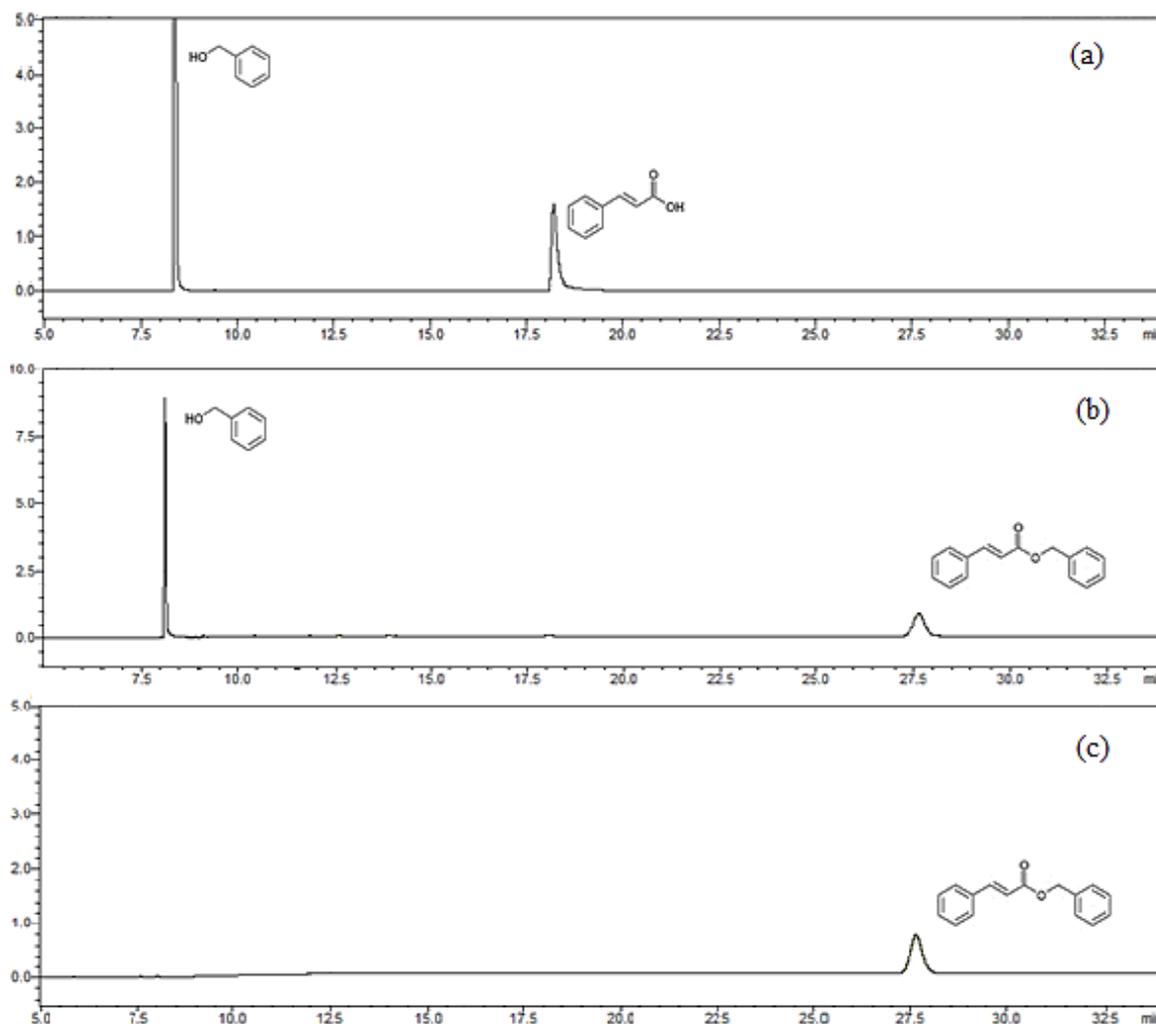
Os resultados aqui encontrados são bastante promissores, em virtude da lipase NS 88011 ser uma fração B imobilizada da *Candida antarctica*, mesma fração que a comercialmente conhecida lipase Novozyme 435 é obtida, porém a NS 88011 é imobilizada em um suporte de

baixo custo (SÁ, 2018), fator muito relevante visto a importância da utilização de uma matéria-prima com menores custos para que o processo possa ser utilizado em escala industrial visando a obtenção do produto de interesse.

4.5 Identificação do éster

O perfil cromatográfico da mistura reacional antes (a) e após a reação de esterificação (b) e do padrão de cinamato de benzila (c) estão apresentados na Figura 14 (a, b e c), respectivamente, onde é possível observar a redução quase completa da banda do ácido cinâmico (tempo de retenção: 17,6) e aparecimento de uma nova banda (tempo de retenção: 27,5) que confere com o tempo de retenção da banda apresentada pelo padrão de cinamato de benzila (Figura 14 (c)), confirmando a obtenção do produto desejado.

Figura 14. Cromatogramas da mistura reacional antes (a) e após (b) a reação de esterificação e o padrão de cinamato de benzila (c)

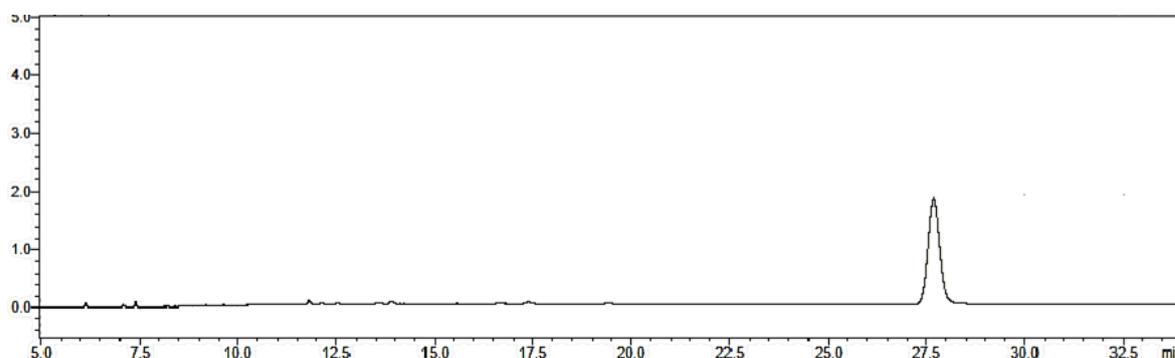


4.6 Isolamento do éster através de fracionamento cromatográfico

A técnica de cromatografia em coluna tem sido muito empregada na separação de substâncias contidas em misturas complexas, encontrando-se presente em processos de purificação e separação na indústria petroquímica, farmacêutica e de química fina, dessa maneira é muito importante o conhecimento e adequado controle de determinados parâmetros como a força e polaridade do solvente ou mistura de solventes a ser utilizado (OLIVEIRA, 2005).

Para que fosse possível a separação do éster contido na mistura reacional foram empregadas fases móveis de hexano:acetato de etila nas proporções 9:1; 8:2 e 7:3 (v/v). A fase considerada como ideal para a separação do composto de interesse foi a fase de composição 9:1 (hexano:acetato de etila (v/v)). Foi possível identificar a presença do éster na 7^a, 8^a e 9^a frações recolhidas, sendo que foi utilizado 100 mL de cada fase móvel e as amostras fracionadas a cada 10 mL. A Figura 15 apresenta o cromatograma da 7^a parte do fracionamento, onde pode ser observado o que o tempo de retenção do composto isolado confere com o tempo de retenção apresentado pelo padrão de cinamato de bezila (Figura 14 c), confirmando a obtenção e isolamento do éster de interesse.

Figura 15. Cromatograma do éster isolado por cromatografia em coluna



4.7 Atividade Antioxidante

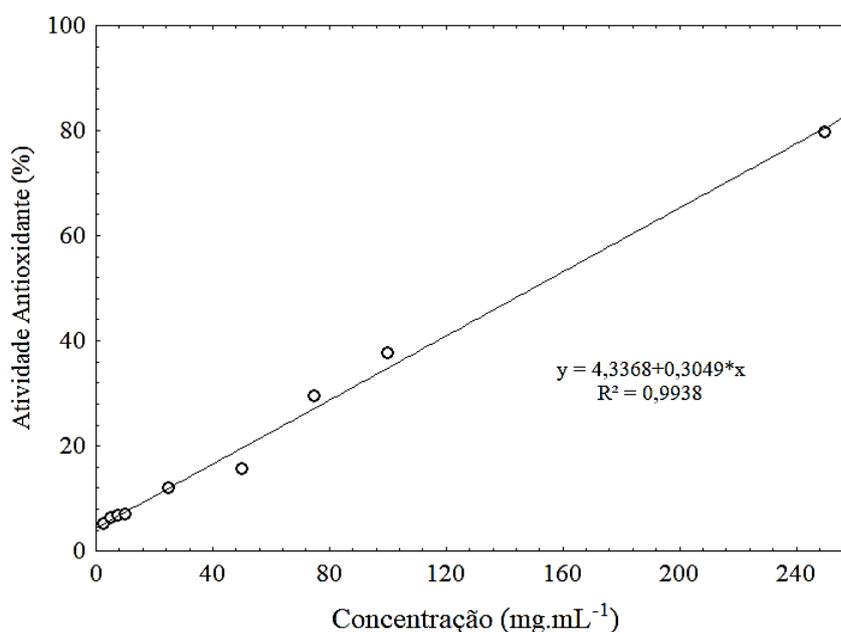
Os resultados da determinação da atividade antioxidante do cinamato de benzila estão apresentados na Tabela 8.

Ao avaliar a capacidade antioxidante dos precursores do éster (ácido cinâmico e álcool benzílico) foi possível constatar para ambos que a maior concentração testada não se mostrou eficiente para capturar 50% dos radicais livres (200 mg.mL⁻¹ para o ácido cinâmico e 200 µL.mL⁻¹ para o álcool benzílico), desta forma seus dados não serão apresentados neste capítulo.

Tabela 9. Porcentagem de neutralização do DPPH para o cinamato de benzila

Concentrações (mg.mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante (%)
2,5	5,1
5	6,2
7,5	6,7
10	7,0
25	11,9
50	15,6
75	29,4
100	37,6
250	79,6

Após evidenciar a faixa de concentração com aumento linear em relação a atividade antioxidante, determinou-se o IC₅₀ a partir da equação da reta obtida graficamente como mostra a Figura 16.

Figura 16. Atividade antioxidante do éster cinamato de benzila

A Figura 16 nos mostra que a capacidade antioxidante aumenta linearmente com o aumento da concentração do éster, sendo que a maior capacidade antioxidante obtida foi de 79,6% para a concentração de 250 mg.mL⁻¹.

A correlação entre a atividade antioxidante e a concentração de cinamato de benzila ($y = 0,3048x + 4,3501$) com $R^2 = 0,9938$ forneceu um IC_{50} de $149,77 \text{ mg.mL}^{-1}$. Pode-se considerar que a capacidade antioxidante aumentou após a esterificação, visto que não foi possível determinar a concentração de álcool benzílico e ácido cinâmico capaz de inibir 50% dos radicais livres, contudo essa concentração é alta se comparado aos antioxidantes por excelência como o ácido ascórbico e o BHT ($IC_{50} = 0,002 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $IC_{50} = 0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente) (CANSIAN et al., 2010).

Jakovetić et al. (2013a), a fim de elucidar a influência da esterificação na atividade antioxidante, testaram a capacidade antioxidante do ácido cinâmico e seus ésteres, constatando que todos os ésteres sintetizados apresentaram maior capacidade antioxidante do que o próprio ácido cinâmico, porém a atividade ainda é muito baixa comparada com outros antioxidantes fenólicos naturais.

4.8 Toxicidade frente à *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade *in vitro* contra a *Artemia salina* é um bioensaio rápido e de baixo custo e têm sido uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de toxicidade, podendo ser utilizado na triagem de novos fármacos antiespasmódicos e antimaláricos (LHULLIER, HORTA e FALKENBERG, 2006; HOCAYEN et al., 2012; MARTIN et al., 2018).

A atividade citotóxica do ácido cinâmico e de seus derivados é conhecida por mais de séculos, e estudos revelaram que o ácido cinâmico é um importante agente antiproliferativo, inibindo a síntese de DNA de células de crescimento (DE et al., 2011).

Os resultados obtidos no ensaio de toxicidade do ácido cinâmico e do cinamato de benzila encontram-se apresentados na Tabela 9 e 10, respectivamente, onde é possível constatar que o aumento da mortalidade aumenta com o aumento da concentração do composto em ambos os casos, chegando à 100% de náuplios mortos com a concentração de $3500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o ácido cinâmico e a 96,8% na concentração de $0,75 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cinamato de benzila.

Tabela 10. Mortalidade média de *A. salina* em diferentes concentrações de ácido cinâmico

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Mortalidade (%)
30	8,53
75	16,14
225	33,63
300	38,20
420	48,55
480	52,48
600	54,87
1000	56,14
2000	71,28
2450	84,50
2800	88,40
3500	100

Tabela 11. Mortalidade média de *A. salina* em diferentes concentrações de cinamato de benzila

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Mortalidade (%)
0,005	12,90
0,01	19,62
0,025	26,39
0,05	40,32
0,075	47,69
0,1	58,59
0,25	65,63
0,5	92,15
0,75	96,81

Os dados apresentados na Tabela 9 e 10 foram tratados a partir da aplicação de escala logarítmica para determinar da DL_{50} , e se encontram na Figura 17 e 18.

Figura 17. Curva concentração-resposta da mortalidade (%) de *A. salina* à diferentes concentrações de ácido cinâmico

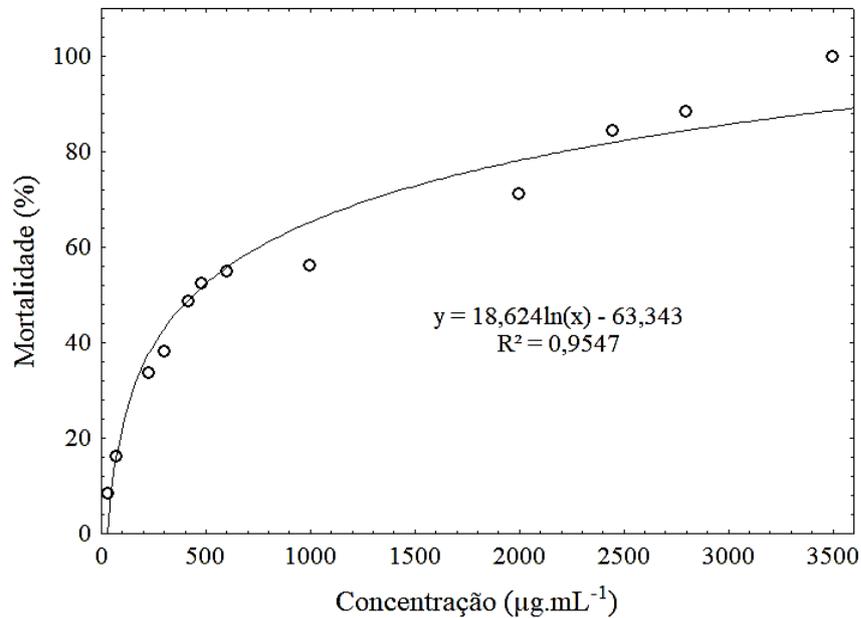
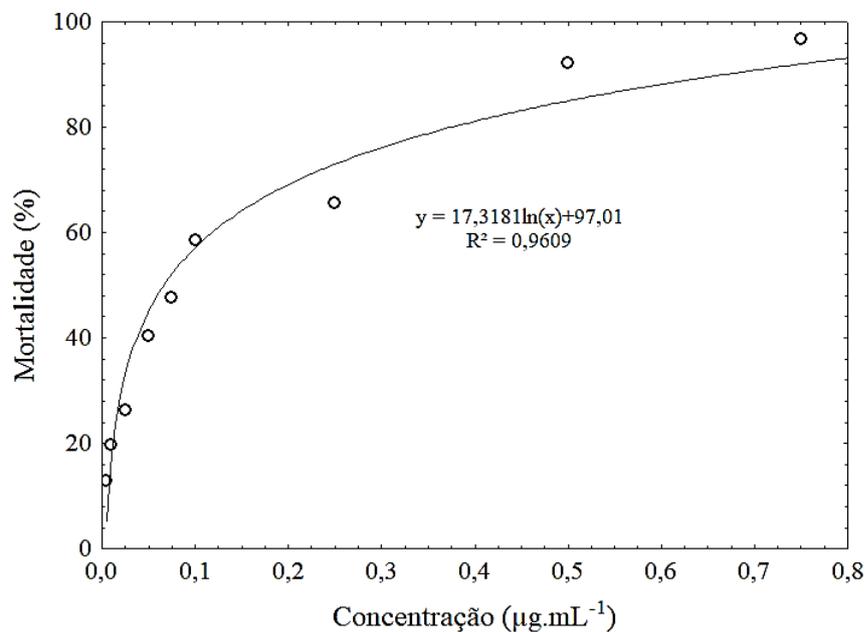


Figura 18. Curva concentração-resposta da mortalidade (%) de *A. salina* à diferentes concentrações do éster cinamato de benzila



A correlação entre a mortalidade e o logaritmo da concentração de ácido cinâmico e cinamato de benzila, respectivamente, apresentaram valores de $DL_{50} = 439,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $DL_{50} = 0,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando que a toxicidade aumenta consideravelmente (6280 vezes) após a esterificação. Amarante et al. (2011), considerou um composto com baixa toxicidade quando o

mesmo apresentar DL_{50} superior à $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, moderada entre 100 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e muito tóxico quando inferior à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Muitos estudos tem mostrado que a toxicidade de um composto frente à *A. salina* apresenta correlação com a atividade citotóxica contra tumores humanos, McLaughlin, Roger e Anderson (1998) relataram que este bioensaio levou à descoberta de uma nova classe de agentes antitumorais ativos (*Annonaceous acetogenins*), estando relacionada também com a atividade contra o *Typanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de chagas (ALVES et al., 2000; ZANI et al., 1995), com a atividade viruscida, antifúngica e antimicrobiana (MacRAE et al., 1988).

A toxicidade oral do cinamato de benzila em ratos Osborne-Mendel foi estudada, e demonstrou que após 19 semanas de ingestão de concentrações de 0,1 a 10000 ppm, não houve morte ou sinais clínicos adversos, não havendo nenhuma alteração microscópica ou macroscópica nos tecidos (HAGAN et al., 1967, BAR e GRIEPENTROG, 1967).

Fukiwara et al. (2017) avaliaram a atividade larvicida do éster cinamato de metila contra o *Aedes aegypti* e evidenciaram que este apresentou atividade significativa ($CL_{50} = 35,4 \mu\text{g/mL}$), sendo assim, devido ao potencial tóxico apresentado pelo éster, este pode ser objeto de estudo em pesquisas referentes a avaliação de sua capacidade citotóxica e de sua utilização para controle biológico de organismos transmissores de doenças.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia de superfície de resposta se mostrou eficaz na maximização da produção de cinamato de benzila, possibilitando a obtenção de um modelo matemático empírico para a produção do éster em função da concentração de enzima e da temperatura. A partir do modelo matemático foi possível obter os níveis ótimos de temperatura e concentração de enzima para que se obtenha maiores rendimentos, sendo estes, respectivamente, 58,8 °C e 4,45 mg.mL⁻¹. Através do estudo cinético da reação foi possível reduzir o tempo de 48 para 32 horas, levando à uma conversão de 97,6%.

A lipase NS 88011 demonstrou eficácia para catalisar a reação, apresentado um excelente tempo de meia vida e proporcionado altos rendimentos (acima de 60%) após os treze ciclos de reuso estudados. Dessa forma a enzima empregada para a realização desta pesquisa pode ser considerada um biocatalisador promissor a ser utilizado na produção do éster em escala industrial, tendo como principais características a alta eficiência do processo para a obtenção de um produto de alta qualidade além de trabalhar em condições brandas e sem a geração de subprodutos.

Quanto a atividade antioxidante, observou-se um aumento na capacidade de captura de radicais livres após a esterificação, sendo que o IC₅₀ apresentado pelo cinamato de benzila foi de 149,77 mg.mL⁻¹ não sendo possível encontrar as concentrações de inibição do ácido cinâmico e álcool benzílico.

A toxicidade do ácido cinâmico apresentou o valor de DL₅₀ (439,6 µg.mL⁻¹) maior do que o encontrado para o cinamato de benzila (0,07 µg.mL⁻¹), a alta toxicidade apresentada pelo éster pode caracterizá-lo como um potencial agente pesticida e inseticida natural, além do mesmo poder apresentar atividades citotóxicas, dessa maneira o mesmo pode ser objeto de estudo na busca de novos fármacos e agentes controladores de pragas.

Tendo em vista os aspectos mencionados, foi possível encontrar a condição para maximizar a produção de cinamato de benzila de forma eficiente e promissora fazendo uso uma menor quantidade de enzima e obtendo altos rendimentos, além deste biocatalisador apresentar uma excelente capacidade de reuso. Dessa maneira foi possível evidenciar um processo alternativo e com ótimos resultados que podem ser aplicados no escalonamento da produção enzimática do cinamato de benzila.

6 REFERÊNCIAS

ADOLPHO, L. O. **Derivados do ácido clorogênico, cafeico e cinâmico: obtenção, avaliação da atividade antimicrobiana e de inibição enzimática**. 2012. 145 fl. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2012.

ALIBONI, A., D'ANDREA, A., MASSANISSO, P., 2011. Propolis specimens from different locations of central Italy: chemical profiling and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) quantitative analysis of the allergenic esters benzyl cinnamate and benzyl salicylate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 282–288, 2011.

ALLINGER, N. L. **Química Orgânica**. Editora Guanabara, 1976.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, J. R., A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.

AMARANTE, C.B.; MULLER, A. H.; POVOA, M. M. DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.

ARAGÃO, V. C.; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B. D. A.; THEISEN, C.; KALIL, S. J.; BURKERT, 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.; GILLIES, B.; YAMAZAKI, H. **Natural Flavors Produced by Biotechnological Processing**. In: TERANISHI, R.; BUTTERY, R. G.; SHAHIDI, F. Flavor Chemistry – Trends and Developments. ACS Symposium Series 388. American Chemical Society. Washington, DC. 1989. p. 105-120.

ASLAM, M.; TORRENCE, G. P.; ZEY, E. G. Esterification. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. John Wiley e Sons, 2000.

AYRES-BARROS, M.R. Biocatálise em solventes orgânicos. **Boletim de Biotecnologia**, v.72, p. 2-13, 2002.

BAR, V.F.; GRIEPENTROG, F. Die Situation in der gesundheitlichen Beurteilung der Aromatisierungsmittel für Lebensmittel. **Medizin Ernähr**, v. 8 ,p. 244-251, 1967.

BATHIA, S. P.; WELLINGTON, J. C.; LALKO, J.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on benzyl cinnamate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 40-48, 2007a.

BATHIA, S. P.; WELLINGTON, J. C.; LALKO, J.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on benzyl cinnamate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 113-119, 2007b.

BILAL, M.; RASHEED, T.; ZHAO, Y.; IQBAL, H. M. N.; CUI, J. “Smart” chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 278-290, 2018.

BLAU, K.; HALKET, J. **Handbook of derivates for chromatography**. Baffins Lane: John Wiley, 1993.

BNDES – Banco Nacional do Desenvolvimento (2014). Potencial de diversificação da indústria Brasileira. Relatório 4 – Aromas, sabores e fragrâncias. Disponível em: <https://www.bndes.gov.br/wps/wcm/connect/site/285ccbcc-e4a0-45f4-9acd-02e53de2bc66/39_chamada_publica_FEPprospec0311_Relatorio_Final.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=ROOTWORKSPACE.Z18_7QGCHA41LORVA0AHO1SIO51085-285ccbcc-e4a0-45f4-9acd-02e53de2bc66-lz-N3Qc>. Acesso em: 05 de nov. 2018.

CALVALCANTE, P. M. M.; SILVA, R. L.; FREITAS, J. J. R.; FREITAS, J. C. R.; FREITAS FILHO, J. R. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, v. 26, p. 319-329, 2015.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; PAROUL, N.; TONIAZZO, G.; ZOBORALSKI, F.; PRICHOA, F. C.; KUBIAK, G. B.; LERIN, L. A. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de canela-sassafrás (*Ocotea odorífera* (VELL.) ROWHER). **Perspectiva**, v. 34, n. 127, p. 123-133, 2010.

CAVALCANTE, P. M. M.; SILVA, R. L.; FREITAS, J. J. R.; FREITAS, J. C. R.; FREITAS FILHO, J. R. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, v. 26, p. 319-329, 2015.

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1443-1454, 2015.

DALLA COSTA, K. A. **Síntese enzimática e encapsulamento de oleato de ascorbila**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim, 2018.

DE, P.; BALTAS, M.; BELVAL, F.B. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents – A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1672-1703, 2011.

DELLAGRECA, M., PREVITERA, L., PURCARO, R., ZARRELLI, A. Cinnamic ester derivatives from oxalis pes-caprae (*Bermuda Buttercup*). **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1664–1667, 2007.

DUBEY, N. K.; TIWARI, T. N.; MANDIN, D.; ANDRIAMBOAVONJY, H.; CHAUMONT, J-P. Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). **Fitoterapia**, v. 71, p. 567-569, 2000.

FELTRE, R. **Química Orgânica**. São Paulo: Editora Moderna, 1977

FERRAZ, L. R, SANTOS, D. O.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 243-252, 2012.

FICANHA, A. M. M. **Imobilização da lipase *Candida antartica* (CAL B) em sílica xerogel e aerogel obtidos pela técnica sol-gel na presença dos aditivos polietilenoglicol e líquidos iônicos**. 2017. 123 fl. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim, 2017.

FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L.; KINSELLA, J.E. The inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **The Lancet**, v. 341, pp. 1103-1104, 1993.

FREITAS, C. A. S; VIEIRA, I. G. P.; SOUSA, P. H. M.; MUNIZ, C. R.; GONZAGA, M. L. C.; GUEDES, M . I. F. Carnauba wax p-methoxycinnamic diesters: Characterisation, antioxidant activity and simulated gastrointestinal digestion followed by in vitro bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1293-2000, 2016.

FRIERI, M., KUMAR, K.e BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 398, p. 369-378, 2016.

FUJIWARA, G. M.; ANNIES, V.; OLIVEIRA, C. F.; LARA, R. A.; GABRIEL, M. M.; BETIM, F. C. M.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; MARQUES, F. A.; ZANIN, S. M. W. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 238-244, 2017.

GANDHI, N.N.; PATIL, N.S.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B.; WANGIKAR, P.P.; MUKESH, D. Lipase-catalyzed esterification. **Catalysis Reviews-science and Engineering**, v. 42, p. 439-480, 2000.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja – reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1369-1373, 2007.

GOMES, F.M.; DA SILVA, M. B; CASTRO, H.F. Avaliação das condições reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila empregando lipase de *Candida rugosa*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, 2004.

GRAESER, V. **Esterificação não catalítica de ácido láurico com etanol anidro: cinéticas e conversão de equilíbrio**. 2013. 83 fl. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

GUISALBERTI, E. L. Detection and isolation of bioactive natural products. In: S.M. COLEGATE, e R. J. MOLYNEUX, **Bioactive natural products: detection, isolation and structural determination**. NW: CRC Press, 2008.

GUYOT, B.; BOSQUETTE, B.; PINA, M.; GRAILLE, J. Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 6, p. 529-532, 1997.

HAGAN, E. C.; HANSEN, W. H.; FITZHUGH, O. G.; JENNER, P. M.; JONES, W. I.; TAYLOR, J. M.; LONG, E. L.; NELSON, A. A.; BROUWER, J. B. Food flavourings and compounds of related structure II. Subacute and chronic toxicity. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 5, p. 141-157, 1967.

HOCAYEN, P. A. S.; CAMPOS, L. A.; POCHAPSKI, M. T.; MALFATTI, C. R. M. Avaliação da toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio de bioensaio com *Artemia salina*. **INSULA Revista de botânica**, n. 41, p. 23-31, 2012.

ISENMANN, A. F. **Princípios da síntese orgânica**. Timóteo: Edição do autor, 2018.

IWASAKI, T.; MAEGAWA, Y.; MASHIMA, K. Esterification. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. John Wiley e Sons, 2012.

JAKOVETIĆ, S. M.; JUGOVIĆ, B. Z.; GVOZDENOVIĆ, M. M. BEZBRADICA, D. I.; ANTOV, M. G.; MIJIN, D. Z.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. D. Synthesis of Aliphatic Esters of Cinnamic Acid as Potential Lipophilic Antioxidants Catalyzed by Lipase B from *Candida antarctica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1560-1573, 2013a.

JAKOVETIĆ, S. M.; LUKOVIĆ, N. D.; BOŠKOVIĆ-VRAGOLOVIĆ, N. M.; BEZBRADICA, D. I.; PICAZO-ESPINOSA, R.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. D. Comparative Study of Batch and Fluidized Bed Bioreactors for Lipase-Catalyzed Ethyl Cinnamate Synthesis. **Industrial e Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 16689–16697, 2013b.

JIN, Z.; NTWALI, J.; HAN, S-Y.; ZHENG, S-P.; LIN, Y. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 159, p. 108-114, 2012.

KHAN, N.; JADHAV, S.; RATHOD, V. K. Enzymatic synthesis of n-butyl palmitate in a solvent-free system: RSM optimization and kinetic studies. **Biocatalysis e Biotransformation**, v. 34, p. 99-109, 2016.

KIM, H.; KIM, T.; CHOI, N.; KIM, B. H.; OH, S-W.; KIM, E-H. Synthesis of diethylhexyl adipate by *Candida antarctica* lipase-catalyzed esterification. **Process Biochemistry**, 2018.

KRISHNARAJU, A. V.; RAO, T. V. N.; SUNDARARAJU, D.; VANISREE, M.; TSAY, H-S.; SUBBARAJU, G. V. Biological Screening of Medicinal Plants Collected from Eastern Ghats of India Using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **International Journal of Applied Science and Engineering**, v.4, n. 2., p. 115-125, 2006.

KUO, C.-H.; CHEN, G.-J.; CHEN, C.-I.; LIU, Y.-C.; SHIEH, C.-J. Kinetics and optimization of lipase-catalyzed synthesis of rose fragrance 2-phenylethyl acetate through transesterification. **Process Biochemistry**, v.49, p. 437-444, 2014.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2; p. 158-163, 2006.

LI, C.; SUN, J.; LI, T.; LIU, S-Q.; HUANG, D. Chemical and enzymatic synthesis of a library of 2-phenethyl esters and their sensory attributes. **Food Chemistry**, v. 154, p. 205-210, 2014.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHVARRIA, Á. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MacRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Studies on the pharmacological activity of amazonian *Euphorbiaceae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 143-72, 1988.

MADALOZZO, A. D. **Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae***. 2011. 149 fl. Dissertação (Mestrado em Ciência Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

MALLA, S.; GUMMADI, S. N. Thermal stability of xylose reductase from *Debaryomyces nepalensis* NCYC3413: deactivation kinetics and structural studies. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 71-79, 2018.

MANAN, F. M. A.; ATTAN, N.; ZAKARIA, Z.; KEYON, A. S. A.; WAHAB, R. A. Enzymatic esterification of eugenol and benzoic acid by a novel chitosan-chitin nanowhiskers supported *Rhizomucor miehei* lipase: Process optimization and kinetic assessments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 108, p. 42-52, 2018.

MARTIN, B. S. S.; SILVA, J. P. G. S.; KASPER, A. A. M.; CASTRO, C. F.; BARATA, L. E. S. Controle alternativo de *Bemisia tabaci* biótipo b e toxicidade preliminar do concentrado de limonoides obtidos do resíduo industrial de sementes de *Capara guianensis*. **Global Science and technology**, v. 11, n. 3, p. 187-201, 2018.

MARTINS, A. B.; GRAEBIN, N. G.; LORENZONI, A. S. G.; FERNADEZ-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.

MARUYAMA, S. A. **Benzoatos lamelares como catalisadores heterogêneos para a produção de benzoato de metila**. 2010. 76 fl. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos materiais) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

MATTOS, L. H. S.; SPEZIALI, M. G. Patent landscape: Technology development behind science in the flavor and fragrances (FeF) area. **World Patente Information**, v. 51, p. 57-65, 2017.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on benzyl butirate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 407-411, 2012a.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on p-anisyl acetate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 502-506, 2012b.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on p-anisyl acetate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 398-401, 2012c.

MCGINTY, D.; VITALE, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on benzyl acetate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 5363-5384, 2012.

MCLAUGHLIN, J. L., ROGERS, L. L., ANDERSON, J. E. (1998). The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513-524, 1998.

MELO, L. L. M. M. **Síntese enzimática dos ésteres de aroma butirato e valeriato de citrônella por lipase de *Rhizopus* sp.** 2004. 106 fl. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Campinas. Campinas, 2004.

MENDONÇA, L. A. **Desempenho do delineamento composto central em experimentos com alto coeficiente de variação**. 2012. 80 fl. Dissertação (Pós-Graduação em Estatística Aplicada e Biometria) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2012.

MENESES, A. C.; SÁ, A. G. A.; LERIN, L. A.; CORAZZA, M. L.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; OLIVEIRA, D. Benzyl butyrate esterification mediated by immobilized lipases:

Evaluation of batch and fed-batch reactors to overcome lipase-acid deactivation. **Process Biochemistry**, 2018.

MEYER, B.N. et al. Brine Shrimp: A Convenient Gera! Biosay for Active Plant Constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MONTE, L. O. **Efeito antinociceptivo do salicilato de borneol em camundongos**. 2014. 66 fl. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos bioativos) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2014.

MORINSON, R. T. **Química Orgânica**. Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

MUSTHAFA, K. S.; HMOTEH, J.; THAMJARUNGWONG, B.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Antifungal potential of eugenyl acetate against clinical isolates of *Candida* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 19-29, 2016.

NARAIN, N.; ALMEIDA J. N.; GALVÃO, M. S.; MADRUGA, M. S.; E.S. BRITO. Compostos Voláteis dos Frutos de Maracujá (*Passiflora edulis* forma Flavicarpa) e de cajá (*Spondias mombin* L.) obtidos pela técnica de headspace dinâmico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 212-216, 2004.

NASCIMENTO, L. G. **Preparação de ésteres nitrocinâmicos e avaliação da sua atividade antimicrobiana**. 2017. 117 fl. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos bioativos) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2017.

NOVAES, F. J. M.; ITABAINA JUNIOR, I.; SUTILI, F. K.; MARRIOTT, P. J.; BIZZO, H. R.; AQUINO NETO, F. R.; SOUZA, R. O. M. A.; REZENDE, C. M. Lipase-catalysed esters synthesis of cafestol and kahweol. **Food Chemistry**, v. 259, p. 226-233, 2018.

NUNES, N. M. **Termodinâmica de interação entre ácido cinâmico e cinamato de metila e albumina do soro bovino**. 2016. 59fl. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2016.

NUNES, N. M.; PACHECO, A. F. C.; AGUDELO, A. J. P.; SILVA, L. H. M.; PINTO, M. S.; HESPANHOL, M. C.; PIRES, A. C. S. Interaction of cinnamic acid and methyl cinnamate with bovine serum albumin: A thermodynamic approach. **Food Chemistry**, v. 237, p. 525-531, 2017.

OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. C. J.; SANTOS, A. P. B.; SILVA, B. V.; LACHTER, E. R.; PINTO; A. C. Síntese de ésteres de aromas de rotas: um experimento para cursos de graduação dentro de um dos princípios da química verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, p. 152-167, 2014.

OLIVEIRA, J. S. **Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (Bixa orellana L.)**. 2005. 215 fl. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

PERETTO, G.; DU, W.-X., AVENA-BUSTILLOS, R. J.; SARREAL, S. B. L.; HUA, S. S. T.; SAMBO, P.; MCHUGH; T. H. Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. **Postharvest Biology and Technology**, v. 89, p. 11–18, 2014.

PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. G.; TAKAHAHI, J. A.; SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, v. 10, p. 209-212, 2003.

POLLAK, P. **Fine Chemicals: the Industry and the Business**, 2 ed., Wiley, 2011.

POMPILHO, W. M.; MARCONDES, H. C.; OLIVEIRA, T. T. Bioatividade de três espécies vegetais nativas da Floresta Atlântica brasileira frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 473-480, 2014.

PUTON, B. M. S.; BERNARDI, J. L.; ORO, C. E. D.; BOMBANA, V. B.; DARIFF, A. P.; BECKER, J.; PAROUL, N.; CANSIAN, R. L. Concentração inibitória mínima e atividade antioxidante do extrato de *Plectranthus ornatus* CODD. (*Lamiaceae*) extraído por diferentes solventes. **Perspectiva**, v. 42, n. 159, p. 109-118, 2018.

RODRIGUES, C.; OLIVEIRA, J.; BIER, M. C. J.; ROSSI, S. C.; CARVALHO, J. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SPIER, M. R.; BIANCHI, A.; MEDEIROS, P.; SOCCOL, C. R. Bioprocessos na produção de aditivos alimentares. In: RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada á agroindústria**. São Paulo: Edgard Blücher, 2017, p. 249-281.

SÁ, A. G. A. **Lipase-catalyzed production of benzyl esters in solvent-free system**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, 2018.

SÁ, A. G. A.; MENESES, A. C.; ARAÚJO, P. H. H.; OLIVEIRA, D. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science e Technology**, v. 69, p. 95-105, 2017.

SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. **Natural Product Research**, v. 19, n. 2, p. 183-188, 2005.

SAHOO, S.; SINGH, S.; NAYAK, S. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and extract of *Alpinia malaccensis* roscoe (*Zingibaraceae*). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, p. 183-188, 2014.

SALES, A.; PAULINO, B. N.; PASTORE, G. M.; BICAS, J. L. Biogenesis of aroma compounds. **Current opinion in Food Science**, v. 19, p. 77-84, 2018.

SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIA, F. D.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. 2005. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 4, p. 327-333, 2006.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757-781, 2015.

SHARMA, C.K.; CHAUHAN, G.S.; KANWAR, S. S. Synthesis of Medically Important Ethyl Cinnamate Ester by Porcine Pancreatic Lipase Immobilized on Poly(AAc-co-HPMA-cl-EGDMA) Hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**, v, 121, p. 2674-2679, 2011.

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

SHINTRE, M. S.; GHADGE, R. S.; SAWANT, S. B. Lipolase catalyzed synthesis of benzyl esters of fatty acids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 131-141, 2002.

SILVA, F. A. M.; **Síntese de derivados de ácido cinâmico – Determinação da actividade anti-radicalar e antioxidante**. 1998. 141 fl. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade) – Universidade do Porto. Porto, 1998.

SIVAKUMAR, S.; PANGARKAR, V. G.; SAWANT, S. B. Homogeneous System for the Synthesis of Benzyl Salicylate. **Organic Process Research e Development**, v. 6, p. 149–15, 2002.

SONNTAG, N. O. V. The reactions of aliphatic acid chlorides. **Chemical Reviews**, v. 52, p. 237-416, 1952.

SOUZA, D. A. A.; OLIVEIRA, G. N.; VALÉRIO, P. P. Estudo cinético: hidrólise alcalina de ésteres. **E-Xacta**, v. 11, n. 1, p. 109-118, 2018.

SOUZA, J. P. **Toxicidade aguda e risco ambiental do Diflubenzuron para *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na ausência e na presença de sedimento**. 2008. 61 fl. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. São Paulo, 2008.

SOUZA, R. **Avaliação de sistemas reacionais e ampliação de escala para a síntese enzimática de cinamato de geranila e suas propriedades antimicrobianas**. 2016. 95 fl. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2016.

SOUZA, S. P.; ALMEIDA, R. A. D.; GARCIA, G. G.; LEÃO, R. A. C.; BASSUT, J.; SOUZA, R. O. M. A.; ITABAIANA JR, I. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on epoxy-functionalized silica: characterization and improving biocatalytic parameters. **Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, p. 105-111, 2017.

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

SUN, S.; TIAN, L. Novozym 40086 as a novel biocatalyst to improve benzyl cinnamate synthesis. **RSC Advances**, v. 8, p. 37184-37192, 2018.

TAN, L. T. H.; LEE, H. L.; YIN, W. F.; CHAN, C. K.; KADIR, H. A.; CHAN, K. C.; GOH, B. H. Traditional Uses, Phytochemistry, and Bioactivities of *Cananga odorata* (Ylang-Ylang). **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-30, 2015.

TANG, J.; CHEN, G.; WANG, L.; MIAO, M.; JIANG, B.; FENG, B. Immobilization of *Y. lipolytica* lipase and the continuous synthesis of geranyl propionate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 311-316, 2016.

THE PROCTER e GAMBLE COMPANY (Estados Unidos da América). Zaiyou Liu; Toan Trinh; Kristin Finley. **Consumable composition comprising perfumed particles and article containing the same**. US n. US20030036489 A1, 02 maio 2002, 20 fev. 2003. 2003.

VANIN, A. B. **Produção, propriedades biológicas, antioxidantes e toxicidade do bioaromatizante obtido via esterificação enzimática de óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*)**. 2014. 139 fl. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus Erechim. Erechim, 2014.

VENKATESWARLU, S.; RAMACHANDRA, M. S.; KRISHNARAJU, A. L.; TRIMURTULU, G.; SUBBARAJU, G. V. Antioxidant and antimicrobial activity evaluation of polyhydroxycinnamic acid ester derivatives. **Indian Journal of Chemistry**, v. 45, p. 252-257, 2006.

VIEGAS, L. P.; CORREIA, T. E. Aditivos alimentares comuns aos cosméticos – importância clínica. **Revista SPDV**, v. 72, p. 63-72, 2014.

VILAS BÔAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; GIORDANI, D. S.; CASTRO, H. F. Síntese enzimática do caprilato de isopentila utilizando óleo fúsel como matéria-prima. **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 541-547, 2017.

VOULGARIS, S.; PAPADOPOULOU, A. A.; ALEVIZOU, E.; STAMATIS, H.; VOUTSAS, E. Measurement and prediction of solvent effect on enzymatic esterification reactions. **Fluid Phase Equilibria**, v. 398, p. 51-62, 2015.

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

WANG, Y.; ZHANG, D-H.; ZHANG, J-Y.; CHEN, N.; ZHI, G-Y. High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **Food Chemistry**, v. 190, 2016.

WOHLGEMUTH, R. Biocatalysis – key to sustainable industrial chemistry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 713–24, 2010.

YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y. What is oxidative stress? **Japan Medical Association**, v. 45, p. 271-276, 2002.

ZAGO, E. C. **Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido**. 2010. 127 fl. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010

ZANI, C. L.; CHAVES, P. P. G.; QUEIROZ, R.; MENDES, N. M.; OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J. E.; ANJOS, A. M. G.; GRANDI, T. S. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v. 2, p 47-50, 1995.

ZANNETI, M.; CARNIEL, T. K.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, D.; ARAÚJO, P. H. H.; RIELLA, H. G.; FIORI, M. A. Synthesis of geranyl cinnamate by lipase-catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent. **Journal of Chemical Technology e Biotechnology**, v. 92, p. 115-191, 2016.

ZHANG, D-H.; ZHANG, J-Y.; CHE, W-C.; WANG, Y. A new approach to synthesis of benzyl cinnamate: Optimization by response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 206, p. 44-49, 2016.

ZHU, F. Chemical and biological properties of feijoa (*Acca sellowiana*). **Trends in Food Science e Technology**, v. 81, p. 121-131, 2018.