

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

GUILHERME SABADIN PIVA

**ESTUDO CINÉTICO DO PROCESSO DE ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEO
ESSENCIAL DE CITRONELA (*Cymbopogon winterianus*) COM ÁCIDO CINÂMICO**

ERECHIM, RS – BRASIL

JUNHO/2020

GUILHERME SABADIN PIVA

**ESTUDO CINÉTICO DO PROCESSO DE ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE
ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA (*Cymbopogon winterianus*) COM
ÁCIDO CINÂMICO**

Tese apresentada como requisito para à
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciências Agrárias da
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai
e das Missões – URI Erechim

Orientadores: Prof^a Dr^a Natalia Paroul
Prof. Dr Rogério Cansian

ERECHIM – RS

JUNHO 2020

GUILHERME SABADIN PIVA

**ESTUDO CINÉTICO DO PROCESSO DE ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE
ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA (*Cymbopogon winterianus*) COM
ÁCIDO CINÂMICO**

Tese apresentada como requisito para à
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciências Agrárias da
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai
e das Missões – URI Erechim

Orientadores: Prof^a Dr^a Natalia Paroul
Prof Dr Rogério Cansian

Erechim, 01 de Junho

BANCA EXAMINADORA

Natália Paroul, D.Sc
(Orientadora) URI

Rogério Luis Cansian, D.Sc
(Orientador) URI

Marcos Lúcio Corazza, D.Sc
UFPR

Débora de Oliveira, D.Sc
UFSC

Alexandre Junges, D.Sc
URI

Marco Antônio Sampaio Ferraz de Souza, D.Sc
URI

P693e Piva, Guilherme Sabadin

Estudo cinético do processo de esterificação enzimática de óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winteria*) com ácido cinâmico / Guilherme Sabadin Piva. – 2020.

94 f.

Tese (doutorado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2020.

“Orientação: Prof^a Dra Natália Paroul, Prof. Dr Rogério Luis Cansian”.

1. Ácido cinâmico 2. Geraniol 3. Citronelol 4. Estudo cinético
5. Esterificação I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelo dom da vida, pela capacidade de cumprir cada etapa deste trabalho e por nunca soltar minha mão e me respondido em momentos difíceis.

Aos Prof^{es}. Dra. Natalia e Rogério pela orientação, ajuda nos momentos difíceis, paciência e compreensão no momento da troca da pesquisa e principalmente pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação profissional, crescimento científico e intelectual.

Ao amigo e colega Thiago André Weschenfelder, pela amizade, conversa e significativa colaboração no presente trabalho, e ajuda na horas de dificuldade, além daquele futebolzinho maroto nas terças e quintas.

À amiga Ilizandra Aparecida Fernandes, do departamento de Engenharia de Alimentos da URI, pela colaboração nas horas de dificuldade, pela amizade e conversa de laboratório.

Aos professores membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite para contribuir valiosamente com o trabalho.

Aos meus pais e meu irmão, pelo companheirismo, afeto, apoio e incentivo em todos os momentos e os momentos de alegria compartilhados.

À minha namorada Ianara Galvagni, pela compreensão, conversa em horas de dificuldade (que não foram poucas) paciência e amor.

Às minhas tias Cecília e Ivone pelo apoio e incentivo.

Aos professores do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, pelo aprendizado.

Ao Senai de Concórdia – SC, por ter e estar me proporcionando a vivência em sala de aula, que veio a me ensinar e engrandecer enormemente como profissional e pessoa

A todas as pessoas que contribuíram de forma indireta para a realização desse trabalho, seja pela amizade, momentos de descontração.

À Uri Campus Erechim pelo suporte necessário.

À Capes pelo apoio financeiro.

Ao PPGEAL, pela oportunidade.

À todos que de alguma maneira colaboraram para esse momento fosse possível.

RESUMO

Ésteres aromáticos se apresentam como substâncias orgânicas de grande relevância e importância para as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. O modo convencional de obtenção dos ésteres é a catálise ácida, porém este processo pode gerar impactos ambientais. A utilização de enzimas nos processos de esterificação tornam o processo mais atrativo e reduz os impactos, sendo considerado como produtos de tecnologia verde. O estudo cinético dessas reações pode trazer grandes benefícios para a reação, podendo se fazer uma análise de forma mais detalhada do comportamento da reação conforme os parâmetros são alterados. No presente trabalho a catálise enzimática de esterificação na produção de cinamato geranila e citronelila, através do óleo essencial bruto de citronela com ácido cinâmico foram utilizados os modelos clássico random bi bi, ordered bi bi e ping pong bi bi, que descrevem, através de equações, a cinética da reação. Diante disso o presente trabalho o objetivo consiste em um estudo cinético do processo a produção de cinamato de geranila e citronelila via catálise enzimática utilizando a lipase imobilizada NS 88011 e o óleo essencial bruto de citronela que possui dentre outros compostos os álcoois de interesse para a reação que são o geraniol e citronelol juntamente com o ácido cinâmico. A produção dos ésteres se deu através da utilização de reatores batelada variando as condições experimentais como, temperatura (50, 60 e 70 °C) concentração de catalizador em razão mássica (m/m) de (1, 5, 10 e 15 %), velocidade de agitação (50, 125 e 200 rpm) e razão molar ácido:álcool (1:2, 1:3, 1:6, 1:9 e 1:12). A condição que se apresentou como a mais adequada foi em 10 % de catalizador, 60 °C, 125 rpm e razão molar 1:3 (ácido:álcool), onde se obteve uma produção com rendimento de 7845 mg/L de cinamato de citronelila e 15089 mg/L de cinamato de geranila em 120 horas de reação, com conversões de 52,3 % e 48,3 % respectivamente, sendo o modelo cinético que melhor descreveu a reação foi de ping-pong bi bi.

Palavras-chaves: Estudo Cinético, Esterificação, Ácido Cinâmico, Geraniol, Citronelol

ABSTRACT

Aromatic esters are very important organic substances for the pharmaceutical, cosmetic and food industries. The conventional way of obtaining esters is acid catalysis, but this process can generate environmental impacts. The use of enzymes in the esterification processes makes the process more attractive and reduces the impacts, being considered as green technology products. The kinetic study of these reactions can bring great benefits to the reaction, and a more detailed analysis can be made of the reaction behavior as the parameters are altered. In this work the enzymatic catalysis of esterification in the production of geranyl and citronellyl cinnamate, through the crude essential oil of citronella with cinnamic acid were used the classic random bi models, ordered bi and ping pong bi, which describe, through equations, the kinetics of the reaction. In view of this, the objective of the present study consists of a kinetic study of the process the production of geranyl cinnamate and citronellila via enzymatic catalysis using the immobilized lipase NS 88011 and the crude essential oil of citronella which has, among other compounds, the alcohols of interest for the reaction which are geraniol and citronellol together with the cinnamic acid. The production of the esters was done through the use of batch reactors varying the experimental conditions such as, temperature (50, 60 and 70 °C) concentration of catalyst in mass ratio (m/m) of (1, 5, 10 and 15%), agitation speed (50, 125 and 200 rpm) and acid:alcohol molar ratio (1:2, 1:3, 1:6, 1:9 and 1:12). The optimized condition was in 10 % of catalyst, 60 °C, 125 rpm and 1:3 molar ratio (acid:alcohol), where a production 7845 mg/L of citronellyl cinnamate and 15089 mg/L of geranyl cinnamate was obtained in 120 hours of reaction, with conversions of 52.3 % and 48.3 % respectively, and the ping-pong bi bi model was the one best adjusted to the parameters and the one that described the reaction.

Keywords: Kinetic study, Esterification, Cinnamic Acid, Geraniol, Citronellol

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 Objetivo Geral | 16 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 16 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3.1 Produção de Ésteres | 17 |
| 3.2 Óleo Essencial de Capim Citronela | 19 |
| 3.2.1 Geraniol | 20 |
| 3.2.2 Citronelol | 21 |
| 3.3 Ácido Cinâmico | 23 |
| 3.3.1 Ésteres de Ácido Cinâmico | 24 |
| 3.4 Estudos Cinéticos de Reações Catalisadas por Enzimas | 25 |
| 3.4.1 Velocidade de Reação | 25 |
| 3.4.2 Modelo Uni Uni | 27 |
| 3.5 Cinética Enzimática para mais de um Substrato | 31 |
| 3.5.1 Mecanismo Randon bi bi | 31 |
| 3.5.2 Mecanismo Ordered bi bi | 32 |
| 3.5.3 Mecanismo Ping Pong bi bi | 33 |
| 3.8 Considerações a Respeito do Estado da Arte | 34 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 4.1 Enzima | 36 |
| 4.1.1 Substratos para a reação enzimática | 36 |
| 4.2 Método para determinação da atividade de esterificação da lipase | 36 |
| 4.2.2 Determinação da Composição Química do Óleo Essencial de Citronela | 37 |
| 4.2.3 Procedimento Experimental para a Reação de Esterificação | 37 |

| | |
|--|----|
| 4.2.4 Determinação do Tempo Reacional da Produção de Cinamato de Geranila e Cinamato de Citronelila..... | 38 |
| 4.2.5 Determinação do Rendimento da Reação..... | 38 |
| 4.3 Estratégia de Utilização do Estudo da Cinética Enzimática | 39 |
| 4.4 Estudo Cinético da Reação | 40 |
| 5 Resultados e Discussões | 42 |
| 5.1 Avaliação da atividade enzimática da lipase NS 88011 em diferentes razões molares dos substratos | 42 |
| 5.2 Composição do Óleo Essencial de Citronela | 43 |
| 5.3 Curva de Calibração..... | 44 |
| 5.4 Avaliação do Efeito da Concentração da Enzima..... | 45 |
| 5.5 Avaliação do Efeito da Temperatura | 48 |
| 5.6 Avaliação do Efeito da Agitação..... | 51 |
| 5.7 Avaliação do Efeito da Razão Molar | 53 |
| 5.8 Resultados da Cinética Reacional..... | 57 |
| 6. Conclusões..... | 68 |
| 7. Perspectivas de trabalho futuros..... | 70 |
| 8. Referências | 71 |
| 9. Apêndice | 88 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Variáveis de estudo cinético para a produção enzimática de cinamato de geranila e cinamato de citronelila..... | 40 |
| Tabela 2 Valores para atividade enzimática em $U.g^{-1}$, para as R.M correspondentes nas condições de 60 °C, 125 rpm e 10 % de enzima | 42 |
| Tabela 3. Composição química do óleo essencial de citronela (<i>Cymbopogon winterianus</i>)..... | 43 |
| Tabela 4. Áreas dos picos do eicosano obtidos com diferentes concentrações de eicosano..... | 45 |
| Tabela 5 Valores de rendimentos (mg/L) e conversões (%), para todas as condições experimentais..... | 57 |
| Tabela 6 Comparação dos parâmetros cinéticos avaliados nas condições concentração de enzima e temperatura, para o modelo cinético Ping-Pong bi bi, com geraniol como substrato | 59 |
| Tabela 7 Comparação dos parâmetros cinéticos avaliados nas condições concentração de enzima e temperatura, para o modelo cinético Randon bi bi, com geraniol como substrato | 60 |
| Tabela 8 Comparação dos parâmetros cinéticos avaliados nas condições concentração de enzima e temperatura, para o modelo cinético Ordered bi bi, com geraniol como substrato. | 61 |
| Tabela 9. Comparação dos parâmetros cinéticos avaliados nas condições concentração de enzima e temperatura, para o modelo cinético Ping-Pong bi bi, com citronelol como substrato..... | 62 |
| Tabela 10 Comparação dos parâmetros cinéticos avaliados nas condições concentração de enzima e temperatura, para o modelo cinético Randon bi bi, com citronelol como substrato..... | 63 |
| Tabela 11. Comparação dos parâmetros cinéticos avaliados nas condições concentração de enzima e temperatura, para o modelo cinético Ordered bi bi, com citronelol como substrato..... | 64 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Reação global de esterificação | 17 |
| Figura 2 - Estrutura química do geraniol | 21 |
| Figura 3 - Estrutura química do citronelol..... | 22 |
| Figura 4 - Estrutura química do ácido cinâmico | 23 |
| Figura 5 - Esquema representativo de uma reação catalisada por enzima..... | 25 |
| Figura 6 - Esquema de uma reação simples catalisada por enzima | 26 |
| Figura 7 - Modelo macanístico de Michaelis-Menten | 27 |
| Figura 8 - Modelo mecanístico de Michaelis-Menten, com k do catalizador | 30 |
| Figura 9 - Mecanismo do modelo Randon bi-bi..... | 31 |
| Figura 10 - Mecanismo do modelo de Ordered bi-bi | 33 |
| Figura 11 - Mecanismo do modelo de Ping-Pong bi-bi..... | 33 |
| Figura 12 Equação da reação de síntese de cinamato de geranila..... | 44 |
| Figura 13 Equação da reação de síntese de cinamato de citronelila | 44 |
| Figura 14. Efeito da concentração de enzima sobre a produção de cinamato de geranila à 70°C, razão molar ácido:álcool 1:3 e agitação de 125 rpm | 46 |
| Figura 15 - Efeito da concentração de enzima sobre a produção de cinamato de citronelila à 70°C, razão molar ácido:álcool 1:3 e agitação de 125 rpm | 46 |
| Figura 16 Redução da concentração do ácido cinâmico durante o tempo de reação em função da concentração de enzima utilizada..... | 48 |
| Figura 17. Efeito da temperatura sobre a produção de cinamato de citronelila à razão molar ácido:álcool de 1:3, concentração de enzima 10 % e agitação 125 rpm..... | 49 |
| Figura 18 - Efeito da temperatura sobre a produção de cinamato de geranila à razão molar ácido:álcool de 1:3, concentração de enzima 10 % e agitação 125 rpm..... | 49 |
| Figura 19 - Efeito da agitação sobre a produção de cinamto de citronelila à 60 °C, razão molar ácido:álcool de 1:3 e concentração de enzima 10 %..... | 51 |
| Figura 20 - Efeito da agitação sobre a produção de cinamato de geranila à 60 °C, razão molar ácido:álcool de 1:3 e concentração de enzima 10 %..... | 52 |
| Figura 21 Efeito da razão molar sobre a produção de cinamato de geranila à 60 °C, agitação de 50 rpm e concentração de enzima 10 %..... | 53 |
| Figura 22 Efeito da razão molar sobre a produção de cinamato de citronelila à 60 °C, agitação de 50 rpm e concentração de enzima 10 %..... | 54 |

Lista de Apêndice

| | |
|--|----|
| Apêndice 1 Curva de Calibração com eicosano..... | 88 |
| Apêndice 2 Cromatograma do óleo essencial de citronela | 88 |
| Apêndice 3 Cromatograma da mistura reacional de óleo essencial de citronela com ácido cinâmico, no tempo reação de 0 hrs | 89 |
| Apêndice 4 Cromatograma da mistura reacional de óleo essencial de citronela com ácido cinâmico, ao final da reação 120 hrs, nas condições de 60 °C, 125 rpm, 10 % de enzima e razão molar 1:3 (ácido:álcool) | 89 |
| Apêndice 5 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de catalizador (70 °C/10 % enzima/ 125rpm e 1:3), para o geraniol. | 90 |
| Apêndice 6 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de temperatura (60 °C/10 % enzima/ 125 rpm e 1:3), para o geraniol. | 90 |
| Apêndice 7 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de agitação (60 °C/ 10 % enzima/ 50 rpm e 1:3), para o geraniol. | 91 |
| Apêndice 8 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de razão molar (60 °C/ 10 % enzima/ 50 rpm e 1:3), para o geraniol. | 91 |
| Apêndice 9 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de catalizador (70 °C/10 % enzima/ 125rpm e 1:3), para o citronelol..... | 92 |
| Apêndice 10 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de temperatura (60 °C/10 % enzima/ 125 rpm e 1:3), para o citronelol..... | 92 |
| Apêndice 11 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de agitação (60 °C/ 10 % enzima/ 50 rpm e 1:3), para o citronelol. | 93 |
| Apêndice 12 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração da razão molar (60 °C/ 10 % enzima/ 50 rpm e 1:3), para o citronelol..... | 93 |

LISTA DE ABREVIATÓES

A – Reagente

B – Reagente

C – Produto

AE - Atividade de esterificação (U.g-1)

E – Enzima

ES – Complexo Enzima/Substrato

EP – Complexo Enzima/Produto

k_{cat} – Constante de velocidade do catalisador

k_{eq} – Constante de equilíbrio

k_{ia} – Constante de inibição do ácido

k_{ib} – Constante de inibição do álcool

k_{ma} – Constante de Michaelis do ácido

k_{mb} – Constante de Michaelis do álcool

k_s – Constante de dissociação

k₁, k₂, k₃, k₄ – Constantes de Velocidade

k₋₁, k₋₂ – Constantes de Velocidade

M – Molaridade da solução de NaOH;

ME – Massa de enzima utilizada na reação (g);

P – Produto

ppm – Partes por milhão

rpm – Rotações por minuto

S – Substrato

V_a – Volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos de reação (mL);

V_b – Volume de NaOH gasto na titulação da amostra de tempo zero (mL);

VC – Volume da alíquota do meio reacional retirado para titulação (mL).

V_{max} – Velocidade máxima da reação

V_f – Volume final do meio reacional (mL);

t – tempo (min);

1 INTRODUÇÃO

Os ésteres podem ser considerados uma das classes de compostos orgânicos mais importantes e versáteis da indústria sendo amplamente utilizados em alimentos, bebidas, cosméticos, fármacos, produtos de higiene pessoal, produção de polímeros, celulose, adesivos, tintas, tecidos e biocombustíveis.

Ésteres de ácido cinâmico tornaram-se motivo de interesse científico, por apresentar propriedades terapêuticas e com boas perspectivas de aplicação nas áreas alimentícia e cosmética. A obtenção de cinamatos pode ocorrer através de processos de esterificação ou transesterificação via catálise ácida ou enzimática. As reações catalisadas por enzimas apresentam vantagens quando comparadas aos métodos tradicionais de catálise ácida, como: aumento da eficiência, alta seletividade, menor impacto ambiental e podem ser conduzidas em meio orgânico ou aquoso. Uma das principais vantagens da catálise enzimática em meio orgânico é a possibilidade de efetuar reações que utilizam substratos pouco solúveis em água (Hasan et al., 2006; Khan et al., 2015).

Os álcoois terpênicos de origem natural podem ser usados como agentes nucleofílicos em reações de esterificação visando à obtenção de novos compostos bioativos. Uma fonte que poderia atender essa demanda são os óleos essenciais ricos em álcoois mono e sesquiterpênicos tais como geraniol, citrionelol, elemol e eugenol entre outros.

O conhecimento da cinética do processo de esterificação permite compreender melhor o mecanismo da reação, bem como a energia de ativação envolvida no processo. A determinação de parâmetros cinéticos é indispensável para avaliação e desenvolvimento destes processos, uma vez que estes parâmetros são utilizados para prever o comportamento da reação sob circunstâncias particulares (Darnoko e Cheryan, 2000).

O conhecimento da cinética enzimática se apresenta como uma ferramenta muito importante para o estudo das reações catalisadas por enzimas. Existem alguns modelos matemáticos que são desenvolvidos para ajudar a elucidar de forma mais clara o comportamento da cinética para fins de

análise do sistema e otimização de reações enzimáticas. Com o aumento do interesse da indústria farmacêutica e alimentícia na utilização de sistemas biológicos, a modelagem pode facilitar uma solução e a previsão do sistema.

Tendo em vista o potencial terapêutico do óleo essencial de citronela e dos ésteres de ácido cinâmico que vão agregar valor ao óleo, aliado aos benefícios que podem ser conseguidos através do estudo de modelos matemáticos aplicados diretamente em uma área de grande interesse tanto para a indústria de alimentos, quanto para a indústria farmacêutica, justifica-se a realização do presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo cinético do processo de produção de cinamatos de citronelila e geranila via esterificação enzimática do óleo essencial de Citronela (*Cymbopogon winterianus*) com ácido cinâmico.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a composição química do óleo essencial de citronela;
- Avaliar o efeito da razão molar, temperatura, agitação e concentração da enzima na produção de ésteres de ácidos cinâmicos;
- Realizar a estimativa dos parâmetros cinéticos;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

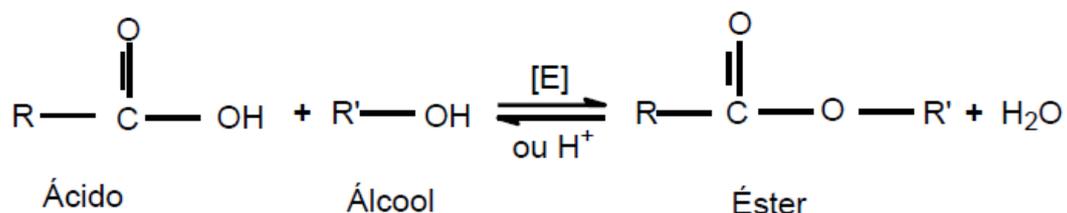
Neste capítulo será apresentada a revisão bibliográfica sobre os temas relacionados à esterificação enzimática do óleo essencial de citronela com ácido cinâmico visando à obtenção de cinamatos de geranila e citronelila.

3.1 Produção de Ésteres

Os ésteres são compostos pouco polares e possuem ponto de ebulição menor que os ácidos e os álcoois com peso molecular semelhantes. Eles também possuem odores agradáveis, diferente dos ácidos de baixo peso molecular, alguns apresentam aroma de frutas e são utilizados na fabricação de essências.

A via convencional para obtenção de ésteres orgânicos a partir de ácidos carboxílicos e álcoois é conhecido como esterificação de Fischer, representada na Figura 1.

Figura 1 - Reação global de esterificação



Fonte: O Autor

A reação é conhecida por ser reversível e de purificação difícil, pois consiste na catálise homogênea com ácido sulfúrico, o qual permanece dissolvido no meio reacional. Neste processo, o catalisador deve ser removido ao final da reação por lavagem aquosa alcalina. Como grandes desvantagens podemos citar a dificuldade de reutilização do catalisador, a corrosão de reatores e geração de resíduos (Yadav e Rahuman, 2002; Bondioli, 2004; Deutschmann, 2009).

Avanços recentes na biotecnologia, na tecnologia enzimática, no monitoramento de bioprocessos e nas técnicas de recuperação de produtos

proporcionam novas oportunidades em potencial para a biotecnologia de produção de ésteres.

A reação de catálise enzimática inicialmente ficava restrita ao emprego de reações em meio aquoso. Com isso, o potencial de utilização das enzimas em síntese orgânica era reduzido devido à baixa solubilidade de alguns substratos na presença de água (García-Junceda et al., 2004). No intuito de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos inciou-se o uso de solventes orgânicos em reações enzimáticas (Serra et al., 2005, Rajendran et al., 2009, Eisenmenger, 2010).

A substituição da água por solventes orgânicos apresenta uma série de vantagens, dentre as quais pode-se citar: fácil recuperação das enzimas; as reações competitivas são desfavorecidas prevenindo a decomposição de compostos sensíveis à água; o deslocamento do equilíbrio reacional favorecendo a esterificação ao invés da hidrólise; a especificidade do substrato e uso de substratos não polares (Pedersen et al., 2002; Gotor-Fernández et al., 2006).

A utilização de rotas enzimáticas vem ganhando espaço nas pesquisas do meio científico, pelo fato dessas reações apresentarem diversos benefícios quando comparadas às rotas químicas, podem ser consideradas formas de “tecnologia verde” ou “processos ambientalmente corretos” por promoverem alta especificidade, menor impacto ambiental, economia de energia e recursos, pois atuam em condições operacionais mais brandas (Krajewska, 2004; Sharma, Chauhan e Kanwar, 2011).

Paroul et al., 2012, estudaram a produção de bioflavors por esterificação enzimática do óleo essencial de citronela em sistema livre de solvente, comparando dois diferentes ácidos (ácidos oleico e propiônico), com os resultados obtidos foi observado que a técnica utilizada é promissora em consequência da conversão quase totalitária dos álcoois geraniol e citronelol em ésteres. No ensaio utilizando o ácido oleico obteve-se maior produção nas condições de razão molar 1:1, temperatura de 70°C e concentração de enzima de 10% em peso, obtendo uma conversão de 98,9% de oleato de citronelila e 82,5% de oleato de geranila. No ensaio utilizando ácido propiônico a produção

foi de 92,95% de propionato de citronelila e 96,51% de propionato de geranila, nas mesmas condições do ensaio com ácido oleico.

Zanetti et al., 2016, estudaram a esterificação do geraniol e ácido cinâmico, numa relação 1:3, em cinamato de geranila e obtiveram uma conversão de 75% de produto a temperatura de 70°C utilizando 15 wt% de enzima imobilizada (NS 88011). Os autores também analisaram a atividade antimicrobiana do produto para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e concluíram que o produto é ativo contra as duas

3.2 Óleo Essencial de Capim Citronela

Citronela é o nome vulgar dado as plantas da família das Gramíneas (atualmente denominada Poaceae), do gênero *Cymbopogon*, reconhecidas pela característica repelência de insetos, sendo utilizada como matéria prima para a obtenção de óleos repelentes e obtida por destilação a vácuo. Segundo Bauer et al. (2001) há duas espécies mais conhecidas de citronela:

a) Citronela-do-Ceilão (*Cymbopogon nardus*) - cresce na ilha de Sri Lanka e provavelmente se formou como uma forma distinta de outra espécie selvagem, chamada *Cymbopogon confertiflorus*. Fornece um óleo amarelo pálido, com planta parecendo capim, com odor canforado.

b) Citronela-de-Java (*Cymbopogon winterianus*) - constitui-se em uma variação da mesma *Cymbopogon nardus*. Cresce no Sudeste da Ásia, Índia, China e Indonésia, bem como na América Central e do Sul, com odor acentuado de citronelal.

A citronela é cultivada em regiões tropicais e seu cultivo no Brasil foi inicialmente devido a sua ornamentação e propriedades medicinais. A citronela é um dos repelentes naturais mais utilizados no mercado na concentração de 5-10%, que são concentrações menores que a maioria dos repelentes comerciais (Maia et al., 2011). A produção de citronela se destacou no Brasil, devido ao aumento na produção do óleo essencial para atender as demandas do mercado interno e externo.

O óleo essencial encontrado em células oleríferas possui atividade antibacteriana, atua na diminuição da atividade motora, é anti-convulsionante, anti-espasmódico e analgésico, sendo também utilizado como aromatizante de

ambiente e como material de partida para a síntese da Vitamina A (Rocha et al., 2000; Lorenzi e Matos, 2002; Vida et al., 2006).

A aplicação do óleo essencial de citronela é ampla e variada, sendo registrado como agente herbicida, de acordo com patente CA 2324245 C (Barrier Biotech Limited; Robert E. Ryan e Sandra Morris, 2008).

Silveira, 2012, realizou um estudo da atividade antibacteriana de diversos óleos essenciais, os resultados mostraram que o óleo de citronela, *C. winterianus*, apresenta atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia enterocolitica* e *Proteus vulgaris*.

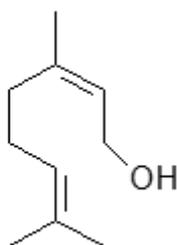
Timung et al., 2016, realizou análise da atividade antimicrobiana de óleo de citronela obtido por hidrodestilação, onde foi verificado que o óleo de citronela se mostra eficaz contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.

O óleo da citronela apresenta um aroma de rosa-floral cítrico, sendo também utilizado para obtenção do citronelal, usado como precursor em várias sínteses. Rico em geraniol e citronelal, os quais são utilizados como material de partida em sínteses de outras fragrâncias (Bauer et al., 2001).

3.2.1 Geraniol

O geraniol é um monoterpeno acíclico (Figura. 2) comumente encontrado como um dos principais componentes presentes em óleos essenciais de plantas, como: capim citronela, limão, laranja, amora, palmarosa e gerânio. Na sua forma pura se apresenta como um líquido incolor, oleoso e com um aroma de rosa (Lapczynski et al., 2008).

Figura 2 - Estrutura química do geraniol



Fonte: O Autor

O geraniol, derivado de óleos essenciais de plantas, possui várias propriedades farmo-terapêuticas, conservantes e odorizantes, sendo um atrativo para insetos polinizadores (por imitar o seu feromônio de localização) e também repelente de um grande número de insetos considerados pragas agrícolas e da pecuária (Charbonneau et al., 2016; Cardozo, 2007; Burt, 2004; Bakkali et al., 2008; Nerio et al., 2010; Gillij et al., 2008; Carnesecchi et al., 2001).

Estudos realizados mostram diversos efeitos farmacológicos do geraniol, como o efeito antitumoral, relatado por Carnesecchi et al. (2001) e Wiseman et al., 2007. Khan et al, 2013, mostraram em seu estudo que o geraniol inibe peroxidação lipídica, respostas inflamatórias, liberação de citocinas pró-inflamatórias em edema cutâneo induzido, e gera regulação de diferentes enzimas antioxidantes. Esses autores concluíram que o geraniol atenua precocemente alterações promocionais tumorais, podendo prevenir carcinogênese.

Zanetti et al., 2015, analisaram a atividade antimicrobiana do geraniol em bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*, obtendo atividade antimicrobiana para todas as bactérias estudadas.

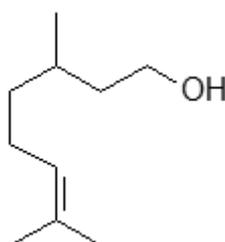
3.2.2 Citronelol

O citronelol é um álcool monoterpênico de cadeia acíclica pertencente à composição de diversas plantas, como o *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus* e a *Lippia Alba* entre outras. Alguns efeitos farmacológicos, tais como antibacteriano, antifúngico, anti-espasmódico e atividade

anticonvulsivante já foram descritos na literatura (Bastos et al., 2010; De Souza et al., 2007).

O citronelol (Figura 3) se apresenta como um líquido incolor, com agradável odor de rosas.

Figura 3 - Estrutura química do citronelol



Fonte: O Autor

Em óleos essenciais, o citronelol ocorre como uma mistura de dois isômeros (+) ou (-). O enantiômero (-) é raramente encontrado e tem um odor de rosa mais delicado. Comparado com o geraniol, o citronelol é relativamente estável, e facilmente convertido em citronelal por desidrogenação ou oxidação. O (-) citronelol é encontrado em óleos de rosas (18-55%) e gerânio (Bauer et al., 2001).

Viollon e Chaumont, (1994), comprovaram a eficácia antifúngica do citronelol, utilizando o fungo *Cryptococcus neoformans*, espécie oportunista em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

Jeon et al., 2008, mostraram a ação acaricida do citronelol contra *Dermatophagoides farinae* (ácaro da poeira americano) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (ácaro da poeira europeu).

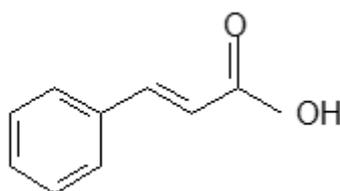
A atividade anticonvulsivante do citronelol foi descrita por De Souza et al., 2007, o grupo realizou testes de convulsão induzida por pentilenetrazol, picotroxina ou eletrochoque máximo (130V, 150Hz, por 0,5 s), sendo registrado que esse monoterpêno produz uma proteção significativa tanto nas convulsões crônicas induzidas por pentilenetrazol como nas tônico-clônicas induzidas pelo eletrochoque, o que garante uma maior vantagem ao citronelol quando comparado à maioria das drogas anticonvulsivantes.

3.3 Ácido Cinâmico

O ácido cinâmico pertence ao grupo dos ácidos aromáticos. Os compostos fenólicos, derivados do ácido cinâmico, são amplamente distribuídos na natureza, sendo muito estudados por suas atividades farmacológicas, capacidade de inibir a proliferação de fungos, promover a oxidação lipídica e conferir cor, adstringência e aroma a vários alimentos (Soares, 2002).

O ácido cinâmico, também conhecido como ácido 3-fenil-2-propenóico (Figura 4), é encontrado em estoraque, óleo de canela e folha de coca. O ácido apresenta baixa toxicidade e um grande espectro de atividades biológicas contra diversos microrganismos (Zanetti et al., 2016).

Figura 4 - Estrutura química do ácido cinâmico



Fonte: O Autor

O ácido cinâmico mostra-se importante pela sua variedade de aplicações, podendo ser utilizado como aroma, fragrância e antioxidante, este último torna-se dependente da característica estrutural do composto (Yadav e Shinde, 2012; Sharma, Chauhan e Kanwar, 2011).

O ácido cinâmico e seus derivados fenólicos são metabolitos secundários de vegetais, fazendo parte da dieta humana e representando cerca de um terço dos compostos fenólicos dos vegetais (Xu et al., 2005; Tabart et al., 2011). Apresenta diversas atividades biológicas, como: antioxidantes, antimicrobianas, proteção contra radiação ultravioleta, antivirais e antiparasitárias, é utilizado na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar (Molinerio et al., 2013; Wang et al., 2016; Zanetti et al., 2016).

3.3.1 Ésteres de Ácido Cinâmico

A obtenção de ésteres de ácido cinâmico vem despertando grande interesse científico devido suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, e por possuir aromas com potencial utilização na indústria alimentícia e de cosméticos (Souza, 2016).

Zanetti et al., 2016, utilizaram a esterificação por via enzimática em um estudo para a obtenção de cinamato de geranila através da esterificação de geraniol e ácido cinâmico, em razão 1:3, e obtendo uma conversão de 75% de produto a temperatura de 70 °C e 150 rpm utilizando 15% em peso de enzima *Candida antarctica* imobilizada (NS 88011).

Wang et al., 2016, que obtiveram rendimento de 99% de cinamato de etila através da esterificação de ácido cinâmico e etanol, em razão 1:3, a 50°C e 170 rpm após 24 horas de reação com a utilização de 30 mg/mL de enzima Lipozyme TLIM.

Sharma, Chauhan e Kanwar, 2011, estudaram as melhores condições para a esterificação de ácido cinâmico e etanol obtendo cinamato de etila. A conversão máxima foi alcançada a uma temperatura de 65°C utilizando lipase pancreática porcina como catalisador em 27 horas de reação.

Segundo a patente US 6036986 A (Lipton, Division of Conopco, Inc., 2000) o ácido cinâmico, seus sais e ésteres, podem ser utilizados como aromatizantes e antimicrobianos. Já, o cinamato de geranila pode ser utilizado como ingrediente para perfume, conforme patente US20030036489 A1 (THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, 2003).

Um dos ésteres de ácido cinâmico, com aprovação no *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) é o cinamato de etila (Wang et al. 2016). Este produto possui aplicações em cosméticos, fragrâncias finas, shampoos, sabonetes e também em produtos de limpeza para a casa (Bathia et al., 2007).

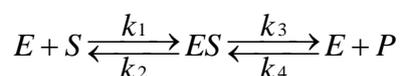
Outros estudos estão sendo desenvolvidos para a aplicação de cinamatos em fármacos, como no trabalho desenvolvido por Zhang et al. (2015) onde foi explorado a atividade acaricida do cinamato de etila contra *Psoroptes cuniculi* e foi comprovada sua eficácia contra tal ácaro.

3.4 Estudos Cinéticos de Reações Catalisadas por Enzimas

A cinética enzimática é uma das principais ferramentas utilizadas para a análise de uma reação química, sendo que os principais pontos a serem estudados são, as velocidades e o mecanismo de reação (Fogler, 2009).

Mahan e Myers, 1995, mostraram em seus estudos que reações catalisadas por enzimas são caracterizadas pela formação de associação ou complexos com o substrato. O complexo (ES) pode se dissociar formando os reagentes e a enzima livre, ou os produtos e a enzima livre. Em um modelo cinético catalisado por apenas uma enzima, é muito comum encontrar representação como essa (Figura 5).

Figura 5 - Esquema representativo de uma reação catalisada por enzima



Onde: *E* - enzima; *S* - substrato, *ES* – complexo enzima/substrato, *P* - produto desejado, *k*₁, *k*₂, *k*₃, *k*₄ - constantes de velocidade da reação

Fonte: O Autor

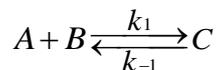
Durante a reação de esterificação, o substrato se liga à enzima, formando um complexo (ES), esse complexo, é chamado de transitório, que nada mais são que as formas modificadas da enzima, onde ela está, associada ao substrato, podendo participar de reações unimoleculares. Esse complexo sofre uma transformação, pois ele não é estável, ocorrendo a formação do produto e liberando a enzima com as mesmas propriedades e características do início da reação.

No estudo realizado por Michaelis e Menten, 1913, os autores consideram que a concentração de substrato presente no meio é muito maior que a de enzima, portanto a constante *k*₃ é a constante de dissociação do complexo ES.

3.4.1 Velocidade de Reação

Pinto e Menezes, 2009, utilizando o modelo mecanístico chegaram a conclusão que é possível desenvolver um modelo matemático para aplicação em uma reação simples ou mais complexa.

Figura 6 - Esquema de uma reação simples catalisada por enzima



Fonte: Pinto e Menezes (2009)

Onde: A e B – reagentes, C – produto da reação

A reação enzimática genérica pode ser dada figura 6, que ocorre no sentido de formação do produto (C) é chamada de reação direta, já a reação que ocorre no sentido de formação dos reagentes (A e B) é dita reação inversa.

Mahan e Myers, 1995, a lei de ação das massas se baseia na constante de equilíbrio existente na reação, a qual foi obtida através de medidas experimentais e também pela teoria sobre as velocidades das reações. Portanto, seguindo a Lei de Ação das Massas a velocidade de reação para a Figura 6 pode ser descrita como:

$$v_c = \frac{d[S]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} = k_1 \cdot [A] \cdot [B] - k_{-1} \cdot [C] \quad (1)$$

A Equação 1 descreve a velocidade de formação do produto (v_c), que ocorre em uma reação reversível. A equação elementar considera um sistema isotérmico e com volume constante. As constantes de velocidade que são representadas por k_1 e k_{-1} , e significam respectivamente, a reação de formação dos produtos e a reação reversível, ou seja, onde ocorre a formação dos reagentes.

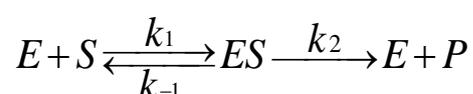
Podemos afirmar que a reação atinge o chamado equilíbrio químico quando não há mais transformação de reagentes em produtos e nem produtos em reagentes (Mahan e Myers, 1995). Na Equação 2 podemos observar o surgimento de uma constante denominada k_{eq} , que é a constante de equilíbrio da reação. Para obtenção desta constante, é necessário considerar as concentrações dos reagentes e produtos quando a reação atinge o equilíbrio. Para se chegar a Equação 2, é necessário igualar a Equação 1 a zero, ou seja, admitir que não haverá mudança das concentrações com o tempo. Assim, a Equação 1 quando atinge o equilíbrio pode ser reescrita na forma da Equação 2.

$$k_1.[A]_{eq}.[B]_{eq} = k_{-1}.[C]_{eq} \therefore \frac{[A]_{eq}.[B]_{eq}}{[C]_{eq}} = \frac{k_{-1}}{k_1} = k_{eq} \quad (2)$$

3.4.2 Modelo Uni Uni

O modelo Uni Uni de Michaelis-Menten é representado na Figura 7 abaixo.

Figura 7 - Modelo macanístico de Michaelis-Menten



Fonte: Segel (1975)

Segel (1975), relata que o modelo Uni Uni de Michaelis-Menten é considerado o modelo tradicional que descreve uma cinética enzimática. Na Figura 7 representa a simulação de uma reação enzimática genérica, que pode ser simplificada fazendo a suposição que no início da reação, a concentração dos produtos é baixa, portanto o produto não se reverte para o complexo ES ou E +S.

A reação por este motivo ocorre da seguinte maneira o substrato (S) se liga a enzima (E), formando assim um complexo enzima-substrato (ES), sendo esta a etapa da reação que é reversível, surgindo assim duas constantes de velocidade: k_1 (associação do complexo) e k_{-1} (dissociação do complexo). O complexo ES com o auxílio do catalisador se transforma em produto (P), liberando a enzima (E) que volta a forma em que se encontrava no início da reação, sendo a etapa da reação que é considerada irreversível, assim constará apenas uma constante de reação (k_2), por este motivo a inexistência de uma constante de reação inversa (k_{-2}).

As equações de velocidade (3, 4, 5 e 6) para cada etapa da reação da Figura 7 podem ser escritas da seguinte maneira:

$$\frac{d[E]}{dt} = (k_{-1} + k_2) \cdot [ES] - k_1 \cdot [E] \cdot [S] \quad (3)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = -(k_{-1} + k_2) \cdot [ES] + k_1 \cdot [E] \cdot [S] \quad (4)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{-1} \cdot [ES] - k_1 \cdot [E] \cdot [S] \quad (5)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (6)$$

Ao realizar o balanço de massa da reação e considerando a concentração de enzima no tempo zero (0) $[E]_0$, e a concentração da enzima ao término da reação como $[E]$ e ainda a concentração do complexo enzima/substrato como $[ES]$, obtém-se a Equação 7. Ao continuar o balanço de massa, considerado neste momento a concentração inicial do substrato $[S]_0$ e igualando com as concentrações do substrato $[S]$ no fim da reação, produto $[P]$ obtido e o complexo $[ES]$, obtém-se a Equação 8.

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (7)$$

$$[S]_0 = [S] + [P] + [ES] \quad (8)$$

Afim de simplificar e reduzir esses modelos matemáticos para apenas uma equação é necessário realizar duas simplificações que são comumente utilizadas. Para tanto é preciso considerar que a reação ocorre em sistema estacionário ou em um regime de rápido equilíbrio, em ambos os casos podemos considerar que o complexo transitório permanece com a concentração constante (Pinto e Menezes, 2009).

Sendo feitas as simplificações para o regime estacionário, pode-se admitir que a concentração do complexo $[ES]$ permanecerá constante, assim podemos descrever as equações da seguinte maneira:

$$[E] = [E]_0 - [ES] \quad (9)$$

$$[S] = [S]_0 - [P] - [ES] \quad (10)$$

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \cdot [E] \cdot [S] = \frac{[E] \cdot [S]}{k_m} \quad (11)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (12)$$

A partir das simplificações que foram realizadas, ocorre o surgimento de uma nova constante, k_m , a qual pode ser observada na Equação 11. Essa constante é chamada constante de Michaelis, que está descrita novamente na Equação 13.

$$k_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (13)$$

A partir dessas considerações e simplificações, é possível chegar na equação de Michaelis-Mentem.

$$v_0 = \frac{k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{k_m + [S]} = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{k_m + [S]} \quad (14)$$

A equação 14 representa a cinética de formação do produto para o modelo uni uni irreversível, para os modelos em regime de estado estacionário onde o volume é considerado constante e o sistema isotérmico. Ainda na Eq 14, pode ser observado o surgimento de uma variável (v_{\max}), que representa a velocidade máxima da reação. As reações de catálises enzimáticas são comumente realizadas à baixas concentrações de enzima, sendo possível observar a seguinte condição, $[E]_0 \ll [S]_0$. Em reações que ocorrem essas condições, tanto $[E]$ como $[ES]$ podem ser consideradas desprezíveis quando comparadas a $[S]_0$.

As velocidades que são determinadas experimentalmente, normalmente são consideradas nas condições iniciais da reação, assim, a concentração do produto $[P]$ é muito pequena quando comparada à concentração de $[S]_0$ (Pinto e Menezes, 2009).

Outra forma que se pode descrever a equação de Michaelis-Menten surge nessas novas condições e está descrita na Equação 15.

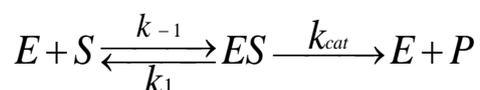
$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]_0}{k_m + [S]_0} \quad (15)$$

Em reações de catálises enzimáticas é comumente encontrada uma constante de dissociação (k_s), que é a afinidade da enzima em relação ao substrato. Pode-se descrever a equação do k_s conforme a Equação 16.

$$k_s = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (16)$$

Considerando o modelo de Michaelis-Menten apresentado na Figura 7, obtém-se a reação da Figura 8, na qual a constante de velocidade k_2 passa a ser considerada a partir de agora como sendo a constante de velocidade do catalisador, k_{cat} .

Figura 8 - Modelo mecanístico de Michaelis-Menten, com k do catalizador



Fonte: Segel, 1975.

Para obter a expressão da velocidade da equação 17, com essas novas considerações, analisa-se a segunda etapa da reação, que passa a ser considerada irreversível e que o complexo ES forma o produto P, liberando a enzima E, não sendo possível a reação inversa, ou seja, voltar a ser [ES]. Essa etapa é considerada a etapa limitante da reação enzimática.

$$v = k_{cat} \cdot [ES] \quad (17)$$

Quando a reação possui um único substrato em estado estacionário e não é considerando apenas as condições iniciais da reação, a equação de Michaelis-Menten é descrita como:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{k_m + [S]} \quad (18)$$

A Equação 18 permite mostrar o comportamento da velocidade da reação com a variação da concentração do substrato.

3.5 Cinética Enzimática para mais de um Substrato

O modelo proposto por Michaelis-Menten se aplica de forma eficiente quando se considera reações com apenas um substrato se ligando a enzima. Quando estudamos um sistema enzimático com a utilização de dois substratos, os mecanismos gerais possíveis nas interações de substrato-enzima são o mecanismo Ordered bi-bi, Randon bi-bi ou Ping-pong bi-bi. (Marangoni, 2003).

O nome bi-bi sugere, que a enzima vai reagir com um dos substratos para formar um produto, liberando uma enzima modificada, que vai ter afinidade com o segundo substrato, formando o produto principal e deixando a enzima novamente como estava no início da reação (Varma et al., 2013).

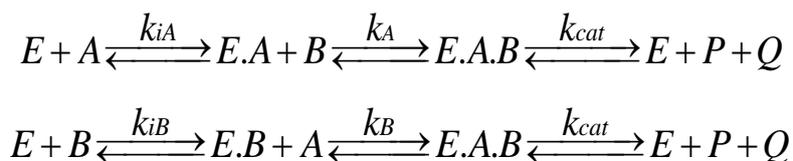
3.5.1 Mecanismo Randon bi bi

O mecanismo Randon bi-bi é empregado quando a enzima utiliza um dos substratos aleatoriamente gerando o produto e a utilização de qualquer que seja o substrato, não altera a afinidade da enzima com o substrato restante. Assim, é possível atingir um rápido equilíbrio (Vishakha et al., 2013). O mecanismo rondon bi bi pode ser descrito segundo a Equação 19.

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [A] \cdot [B]}{[A] \cdot [B] + k_B \cdot [A] + k_A \cdot [B] \cdot k_{iA} \cdot k_B} \quad (19)$$

Como o próprio nome diz a reação pode ocorrer em uma ordem aleatória, portanto há duas possibilidades para o mecanismo da reação:

Figura 9 - Mecanismo do modelo Randon bi-bi



Fonte: Vishakha et al, 2013

O complexo [E·A], [E·B] e [E·A·B] são chamados de complexo transitório. Segundo a definição de Segel, (1975) um complexo transitório é qualquer espécie enzimática capaz de realizar uma reação uni molecular liberando um substrato ou produto, como na reação ocorre a liberação de dois produtos, na equação acima, um produto é chamado de “P” e o segundo produto formado pela reação é chamado de “Q”.

Kahn et al., 2015, realizaram um estudo comparativo onde foi avaliado a eficiência dos modelos Ordered bi bi, random bi bi e ping pong bi bi para uma síntese catalisada por lipase do cetil oleato com a utilizando ultrassom. No trabalho os autores consideraram os parâmetros: tempo de reação, temperatura, concentração de enzima, razão molar de ácido:álcool, potência do ultrassom, frequência e velocidade de agitação. Os parâmetros utilizados para as equações bi bi, foram calculados por métodos gráficos utilizando regressão não linear e método dos mínimos quadrados para otimizar os dados obtidos.

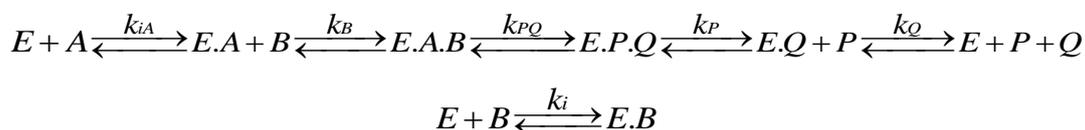
Os dados obtidos a partir dos modelos foram comparados com os resultados experimentais. Segundo Kahn et al., 2015, o modelo que melhor ajustou os parâmetros cinéticos para a reação foi o de Ordered bi bi.

3.5.2 Mecanismo Ordered bi bi

No mecanismo Ordered bi bi, a enzima, como o nome sugere, reage com os substratos de forma ordenada, consequentemente ocasionando uma liberação dos produtos também de forma ordenada. Se o componente [B] possui uma afinidade em se ligar com a enzima livre e não com o complexo [E·A], irá se formar o complexo [E·B], um complexo que não terá a formação do produto final desejado (dead-end complex), fazendo com que ocorra o que chamamos de inibição competitiva, atacando competitivamente o sítio ativo com o substrato [A]. Desta forma, para que não ocorra este tipo de inibição, a enzima reage primeiramente com o substrato [A], para posteriormente colocar

o segundo substrato [B] na reação, formando um complexo [E·A·B] (Vishakha et al., 2013).

Figura 10 - Mecanismo do modelo de Ordered bi-bi



Fonte: Vishakha et al, 2013

O mecanismo com inibição para ambos os substratos pode ser descrito pela Equação 20.

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [A] \cdot [B]}{[A] \cdot [B] + k_B \cdot [A] + k_A \cdot [B] \cdot \left(1 + \frac{[B]}{k_{iA}}\right) \cdot k_{iA} \cdot k_B \cdot \left(1 + \frac{[B]}{k_i}\right)} \quad (20)$$

Itabaiana et al. (2013) utilizaram o modelo Ordered bi bi para realizar um estudo cinético e o mecanismo da catálise por lipase para a síntese do monoacilglicerol. Os autores basearam-se pelo modelo Ordered bi bi, ou seja, pela Equação 20 e pelo mecanismo da Figura 10. A enzima utilizada foi a CaL B.

3.5.3 Mecanismo Ping Pong bi bi

Segundo Vishakha et al. (2013), no mecanismo ping pong bi bi a enzima se liga primeiramente a um substrato [A], formando assim um complexo enzima/substrato [E·A]. Após a formação desse complexo, a enzima se modifica, ocorre a liberação o primeiro produto da reação, e essa enzima modificada vai se ligar a um segundo substrato [B] formando um novo complexo [F·B] e assim libera o produto secundário [Q]. Ao final da segunda reação a enzima volta ao seu estado natural, como era no início da reação.

Figura 11 - Mecanismo do modelo de Ping-Pong bi-bi



Fonte: Vishakha et al, 2013

A Equação 21 descreve o modelo de ping-pong bi-bi

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [A] \cdot [B]}{[A] \cdot [B] + k_B \cdot [A] + \left(1 + \frac{[A]}{k_{iA}}\right) + k_A \cdot [B] \cdot \left(1 + \frac{[B]}{k_{iB}}\right)} \quad (21)$$

Varma et al. (2010) utilizaram o modelo ping pong bi bi para descrever a síntese do biodiesel em álcoois e dióxido de carbono supercrítico. Os parâmetros cinéticos da equação (Eq. 21) foram encontrados utilizando método gráfico, conforme Lineweaver-Burk. Sendo ajustados os dados experimentais para a equação e plotado um gráfico $1/v_i$ versus $1/[S]$, onde v_i é a velocidade inicial da reação de transesterificação e $[S]$ é a concentração do óleo.

Os autores utilizaram óleo de gergelim e mostarda como substratos, e etanol e metanol como solventes. Os resultados obtidos foram comparados com outro trabalho publicado pelos mesmos autores para o óleo de mamona.

Ainda segundo Varma et al. (2010), foi constatado que quando as constantes de inibição são elevadas, a inibição da reação pelo substrato é baixa. Os valores mais elevados da constante de inibição aparente, k_{is} e k_{ia} , em comparação com as constantes aparentes de Michaelis, k_s e k_a , o que indica que a inibição devido ao óleo e o álcool é muito baixa. Devido essa baixa inibição, a enzima pode manter a sua atividade e ser reutilizada várias vezes.

3.8 Considerações a Respeito do Estado da Arte

A demanda atual por produtos naturais está se tornando cada vez maior, em diversos setores, principalmente em setores do ramo alimentício. Com isso, as indústrias vem investindo pesadamente em pesquisa e desenvolvimento com o intuito de elaborar novos produtos através de técnicas que possam substituir os métodos tradicionais por técnicas renováveis. O consumidor através da mudança de hábito e do consumo consciente tem optado cada vez mais por produtos com a chamada “tecnologia verde”. Em relação à indústria de alimentícia isso não é diferente. Os ésteres de ácido cinâmico utilizados na indústria alimentícia, por exemplo, podem ser produzidos a partir de reações utilizando enzimas, sendo estes catalisadores biológicos, aos quais substituem

a utilização de catalisadores de ácidos e base, formando produtos de alta qualidade devido à alta especificidade que as enzimas apresentam, além de produzir menos subprodutos indesejáveis, atraindo a atenção do consumidor.

Nas reações de esterificação comumente realizadas para a utilização desses produtos na indústria alimentícia, geralmente, se utiliza substratos isolados, o que torna o processo relativamente mais rápido, porém o torna caro. O trabalho que foi desenvolvido busca a substituição desses compostos puros, por uma mistura compostos, utilizando como fonte doadora de álcoois para a reação o óleo essencial bruto de citronela e o ácido cinâmico, tornando o processo mais barato e mantendo a linha de tecnologia verde.

O óleo de citronela por se tratar de uma mistura de componentes, onde além de estar os álcoois desejáveis para reação do estudo, neste caso, o citronelol e o geraniol, possui outros compostos que podem ou não reagir com o ácido cinâmico e o catalizador enzimático. Existem poucos estudos descritos na literatura onde ocorre a reação de esterificação através da utilização de óleos brutos e quais os possíveis efeitos da sua utilização e nenhum estudo foi encontrado com a utilização do óleo bruto de citronela em conjunto com o ácido cinâmico. Para avaliar de forma mais clara os possíveis efeitos que possa existir com a utilização do óleo bruto, será feito um estudo cinético da reação.

Diante do exposto, na revisão bibliográfica e no que concerne ao estado da arte, fica evidente a importância da realização deste trabalho, com potencial para estudos detalhados na área, oportunizando novas possibilidades de rotas biotecnológicas, com a utilização do óleo bruto, sendo importante ressaltar que até o momento poucos trabalhos disponíveis na literatura trazem tal análise, onde ocorre a esterificação de compostos como o citronelol e geraniol através do óleo bruto de citronela via esterificação enzimáticas, com a análises de seus efeitos durante um estudo de cinética.

4 MATERIAL E MÉTODOS

No presente capítulo serão apresentadas as metodologias e materiais empregados para a realização dos experimentos.

4.1 Enzima

A enzima utilizada como catalisadora nas reações de esterificação foi a NS 88011. A enzima NS88011 é uma lipase de *Candida antarctica* imobilizada em resina polimérica hidrofóbica.

4.1.1 Substratos para a reação enzimática

Os substratos utilizados nas reações de esterificação foram: o óleo essencial de Citronela (*Cymbopogon winterianus*) (Ferquima) sendo este obtido por hidro destilação, o ácido cinâmico (97% de pureza - Sigma-Aldrich, EUA). Como solvente foi utilizado n-heptano (Vetec, p.a, Brasil).

4.2 Método para determinação da atividade de esterificação da lipase

A atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido oleico na reação de esterificação de ácido oleico e etanol. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 g de enzima ao meio reacional, sendo este formado por uma mistura de etanol e ácido oleico em razão molar 1:1, em erlenmeyer, e mantido sob agitação mecânica de 160 rpm à 40°C por 40 minutos. Alíquotas de 500 µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional nos tempos zero e após 40 minutos de reação e adicionadas em 15 mL de solução acetona-etanol (1:1) com o intuito de finalizar a reação e proporcionar volume de amostra. A quantidade de ácido oleico consumido foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M até atingir pH 11. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que consome 1 µL de ácido graxo por minuto nas condições experimentais descritas, como descrito por Oliveira et al. (2005). A atividade de esterificação foi calculada pela Equação 34.

$$AE = \frac{(v_b - v_a).M.1000.v_f}{t.ME.v_c} \quad (22)$$

Onde:

AE corresponde a atividade de esterificação ($U.g^{-1}$);

V_b corresponde ao volume de NaOH gasto na titulação da amostra de tempo zero (mL);

V_a corresponde ao volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos de reação (mL);

M corresponde à molaridade da solução de NaOH;

V_f corresponde ao volume final do meio reacional (mL);

t corresponde ao tempo (min);

ME corresponde a massa de enzima utilizada na reação (g);

V_c corresponde ao volume da alíquota do meio reacional retirado para titulação (mL).

4.2.2 Determinação da Composição Química do Óleo Essencial de Citronela

As análises da composição do óleo essencial de citronela foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrofotômetro de massas GCMS-QP5050A da marca Shimadzu com injetor automático e detector de ionização de chama (FID). As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de polietilenoglicol (PEG) Rtx-Wax (30 m x 0,25 mm i.d.), 0,25 μ m de espessura de filme, com tempo total de análise igual a 95 minutos com programação de temperatura de: 40°C (6 min), 40-180°C (2°C/min), 180-220°C (10°C/min), 220°C (15 min). A temperatura do detector e injetor foi de 220°C, modo de injeção Split, razão de Split 1:50 e gás de arraste: N₂ (30 mL/min), H₂ (40 mL/min) e ar sintético (400 mL/min). O volume injetado foi de 100 μ L de amostra diluída em diclorometano (1:9).

4.2.3 Procedimento Experimental para a Reação de Esterificação

Esta etapa foi realizada preparando uma mistura reacional formada por, ácido cinâmico e óleo essencial de citronela na razão molar ácido:álcool determinada em ensaios preliminares de (1:3) e 40 mL de solvente n-heptano. Após dissolução completa dos substratos, a enzima (m/m) foi adicionada aos substratos, e o tempo reacional foi contado a partir da adição desta.

Todos os experimentos foram realizados em *shaker* com agitação constante de 125 rpm. Após o término do tempo de reação o biocatalisador foi filtrado com papel filtro. Todas as amostras foram mantidas na geladeira, para posterior análise.

4.2.4 Determinação do Tempo Reacional da Produção de Cinamato de Geranila e Cinamato de Citronelila

A reação consistiu em preparar uma mistura reacional (5 g) formada por óleo essencial de citronela, da espécie *Cymbopogon winterianus* e ácido cinâmico, usando razão molar ácido:álcool 1:3 e 40 mL solvente n-heptano em erlenmeyer e mantido sob agitação mecânica de 125 rpm e temperatura de 70 °C em shaker até a completa dissolução do ácido de acordo com a metodologia descrita por Zanetti et al. (2016).

Após a completa dissolução do ácido fez-se a adição de 15% (m/m) da enzima NS 88011 e manteve-se a reação sob agitação constante. As alíquotas de 100µL foram retiradas do meio reacional nos tempos de (0, 2, 4, 6, 11, 24, 27, 30, 35, 48, 51, 54, 58, 72, 77, 82, 96 e 120 horas), sendo que estas foram analisadas por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama com o objetivo de determinar a conversão de substratos.

4.2.5 Determinação do Rendimento da Reação.

Para determinar a concentração final dos produtos formados pela reação de esterificação entre o geraniol e citronelol com ácido cinâmico, foi realizada a construção de uma curva de calibração usando o eicosano (Sigma Aldrich) como padrão externo nas concentrações: 500, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000 e 25000 ppm em n-heptano.

As análises das misturas reacionais assim como as soluções da curva de calibração com eicosano foram realizadas em cromatógrafo gasoso do tipo GC-FID 2010 plus Shimadzu com injetor automático e detector de ionização de chama (FID). As análises foram realizadas utilizando coluna capilar de polietilenoglicol (PEG) Rtx-Wax (30 m x 0,25 mm i.d.), 0,25 µm de espessura de filme, com tempo total de análise igual a 95 minutos com programação de temperatura de: 40°C (6 min), 40-180°C (2°C/min), 180-220°C (10°C/min),

220°C (15 min). A temperatura do detector e injetor foi de 220°C, modo de injeção Split, razão de Split 1:50 e gás de arraste: N₂ (30 mL/min), H₂ (40 mL/min) e ar sintético (400 mL/min).

A concentração dos compostos obtidos pela reação foi calculada segundo a Equação 30

$$C = \left(\frac{1000 \cdot Ap_b}{Ap_a} \right) \cdot 10 \quad (23)$$

Onde:

C = Concentração do produto em ppm

Ap_b = Área do pico do produto

Ap_a = Área do pico na concentração de 1000 ppm

O resultado final da equação é multiplicado por 10, pelo fato dos produtos finais, estarem diluídos nesta proporção para injeção no GC-FID.

O cálculo da conversão em porcentagem foi feito através da proporção de substrato no tempo zero da reação, com a proporção de substrato residual ao final da reação.

4.3 Estratégia de Utilização do Estudo da Cinética Enzimática

As variáveis estudadas foram a temperatura, a concentração da enzima, a velocidade de agitação e razão molar (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis de estudo cinético para a produção enzimática de cinamato de geranila e cinamato de citronelila

| Experimento | T °C | [E] % | Agitação (rpm) | R.M (ác:ál) |
|-------------|------|-------|----------------|-------------|
| 1 | 70 | 15 | 125 | 1:3 |
| 2 | 70 | 10 | 125 | 1:3 |
| 3 | 70 | 5 | 125 | 1:3 |
| 4 | 70 | 1 | 125 | 1:3 |
| 5 | 70 | 10 | 125 | 1:3 |
| 6 | 60 | 10 | 125 | 1:3 |
| 7 | 50 | 10 | 125 | 1:3 |
| 8 | 60 | 10 | 50 | 1:3 |
| 9 | 60 | 10 | 125 | 1:3 |
| 10 | 60 | 10 | 200 | 1:3 |
| 11 | 60 | 10 | 50 | 1:2 |
| 12 | 60 | 10 | 50 | 1:3 |
| 13 | 60 | 10 | 50 | 1:6 |
| 14 | 60 | 10 | 50 | 1:9 |
| 15 | 60 | 10 | 50 | 1:12 |

4.4 Estudo Cinético da Reação

O estudo cinético da reação consiste na simulação da velocidade de reação, baseada nas equações de velocidades dos modelos descritos para a reações de cinética enzimática quando da utilização de mais de um substrato, que tem por base os modelos de Ordered bi bi, Randon bi-bi e ping-pong bi-bi.

A velocidade de reação vai ser simulada para cada condição experimental estudada, para ambos os substratos nos três modelos propostos.

As equações utilizadas são apresentadas abaixo, para os modelos Ordered bi-bi, Randon bi-bi e ping-pong bi-bi, respectivamente. Os modelos utilizados para as equações seguem o que foi descrito por Kuperkar et al., (2014).

$$V = \frac{V_{\max}}{[A][B] + k_{mb}[A] + k_{ma}[B](1 + [B]/k_{ia}) + k_{ia}k_{mb}(1 + [B]/k_i)} \quad (24)$$

$$V = \frac{V_{\max}}{[A][B] + k_{mb}[A] + k_{ma}[A]k_{ia}k_{mb}} \quad (25)$$

$$V = \frac{V_{\max}}{[A][B] + k_{mb}[A] + (1 + [A] / k_{ia}) + k_{ma}[B] + (1 + [B] / k_{ib})} \quad (26)$$

Onde V representa a taxa de reação, V_{\max} a velocidade de reação máxima, $[A]$ e $[B]$ são as concentrações do ácido cinâmico e do geraniol e citronelol (dependendo da reação), k_{ma} e k_{mb} , constantes de Michaelis, de $[A]$ e $[B]$, k_{ia} e k_{ib} são as constantes de inibição de $[A]$ e $[B]$, respectivamente e k_i é a constante de inibição pelo produto.

Os valores de V_{\max} , k_{ia} , k_{ib} , k_{ma} e k_{mb} serão ajustados para as equações acima apresentadas, através do solver do programa Microsoft Excel.

As equações resolvidas pelo solver através do método GRG não-linear, com uma taxa de convergência de 0,0001 e uma população de 100, com uma propagação aleatória de 0. A otimização dos valores foi feita através da equação dos mínimos quadrados.

A equação 34 representa o cálculo do RMSD, onde x_{calc} é o valor predito pelo modelo, x_{exp} é valor experimental e n representa o número de total de experimentos.

$$RMSD = \sqrt{\sum \frac{(x_{\text{calc}} - x_{\text{exp}})^2}{n}} \quad (27)$$

5 Resultados e Discussões

5.1 Avaliação da atividade enzimática da lipase NS 88011 em diferentes razões molares dos substratos

Os resultados obtidos através das medidas de atividade de esterificação enzimática foram realizados nas condições de 60°C, 50 rpm e 10 % de concentração de enzima para todas as razões molares (1:2, 1:3, 1:6, 1:9 e 1:12) e estão disponíveis na Tabela 2, abaixo.

Tabela 2 Valores para atividade enzimática em $U.g^{-1}$, para as R.M correspondentes nas condições de 60 °C, 125 rpm e 10 % de enzima

| Razão molar | Atividade Enzimática ($U.g^{-1}$) |
|-------------|-------------------------------------|
| 1:2 | 1.462,50 |
| 1:3 | 1.527,50 |
| 1:6 | 1.556,25 |
| 1:9 | 1.566,95 |
| 1:12 | 1.650,00 |

A atividade da enzima no tempo 0 foi de 1725,35 $U.g^{-1}$

Para um bom rendimento da reação, é necessário a presença de um biocatalisador, como por exemplo, uma enzima. Desta maneira, foram determinadas as atividades de esterificação da lipase comerciais NS 88011. Quanto maior for o valor de $U.g^{-1}$, maior é a capacidade de esterificação da enzima, e com isso maior o rendimento da reação.

Wang et al., 2016, relata que o efeito da razão molar dos substratos pode ser analisada de duas maneiras. A primeira delas pressupõe que o aumento de etanol poderá aumentar a taxa de reação inicial e a conversão de equilíbrio, porém, também pode exercer um efeito de inibição de substrato sobre atividade enzimática.

Sun e Tian, 2018, relataram em um estudo de esterificação do cinamato de benzila, que em razões molares com concentração de álcool acima de 1:3, houve perda de rendimento e inibição da atividade enzimática.

No presente trabalho, quando o etanol foi adicionado em excesso, a partir de 1:6, inibiria a atividade da lipase e reduziria o rendimento de cinamato de geranila e citronelila. Podemos perceber através dos valores descritos na Tabela 2 acima, que esse efeito de inibição relatado pelos autores citados,

corroboram com os valores encontrados no presente trabalho, quando do incremento de álcool na razão molar, a atividade enzimática reduz menos, se aproximando do valor inicial, mostrando que de fato existe um efeito inibitório.

Bansode et al., 2017, relata que a inibição da atividade enzimática, se dá, pela ação do álcool que pode bloquear o sítio ativo da enzima. O autor também relata que a concentração excessiva de ácido na razão molar, causa a inativação da lipase, reduzindo sua atividade. Analisando a Tabela 2, podemos perceber a existência desse efeito no presente trabalho, quando utilizado a razão molar com excesso de ácido, a atividade enzimática é mais afetada, e ocorre uma decréscimo maior em relação ao excesso de álcool.

5.2 Composição do Óleo Essencial de Citronela

A composição química do óleo essencial da citronela usado em reações de esterificação está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Composição química do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*)

| Pico | Nome do composto | Área (%) |
|------|------------------------|----------|
| 1 | D-Limoneno | 3,49 |
| 2 | Citronelal | 41,02 |
| 3 | β -Elemeno | 1,09 |
| 4 | Linalol | 1,12 |
| 5 | Geranial | 1,99 |
| 6 | Δ -Cadieno | 1,15 |
| 7 | Cedreno | 0,9 |
| 8 | Acetato de citronelila | 1,81 |
| 9 | α -Muuroleno | 1,88 |
| 10 | Citronelol | 14,11 |
| 11 | Geraniol | 28,37 |
| 12 | τ -Cadinol | 0,98 |
| 13 | Elemol | 1,87 |

Fonte: O Autor

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3 foram identificados cinco álcoois, sendo dois álcoois monoterpênicos primários majoritários, geraniol (28,37%) e citronelol (14,11%), e três álcoois terciários, linalol (1,57%), germacreno-4-ol (0,64%) e elemol (2,33%). Considerando o efeito do estereoimpedimento dos álcoois terciários (Paroul, et al. 2010) e sua baixa concentração supomos que somente o geraniol e o citronelol poderiam reagir com o ácido cinâmico, de acordo com a equação de reação apresentada na Figura 12 e 13.

Figura 12 Equação da reação de síntese de cinamato de geranila

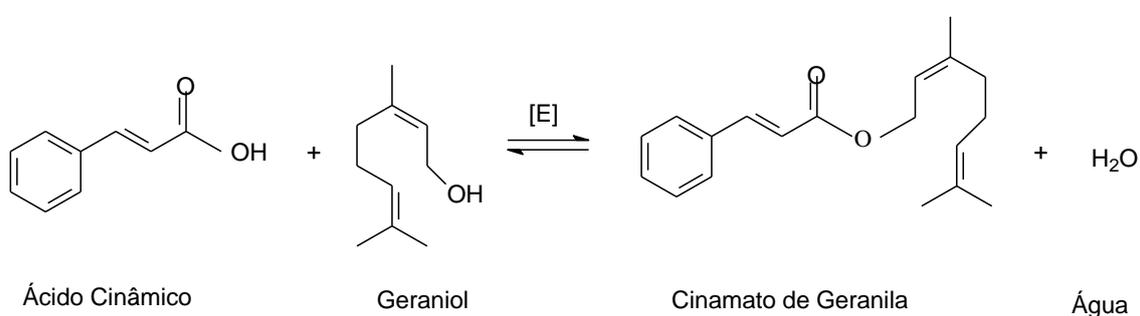
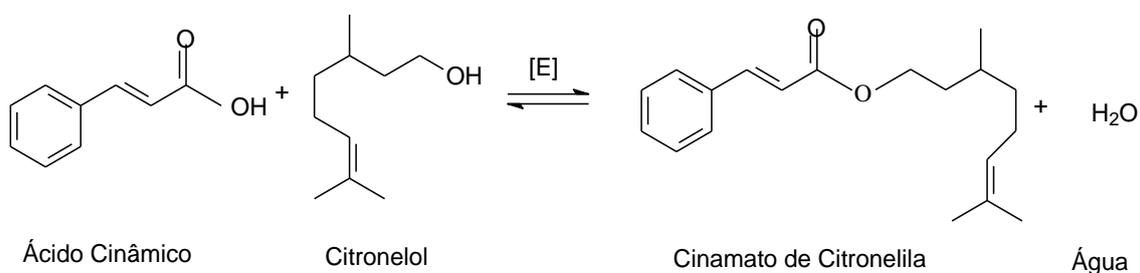


Figura 13 Equação da reação de síntese de cinamato de citronelila



Fonte: Autor (2019)

5.3 Curva de Calibração

As soluções com diferentes concentrações de eicosano foram preparadas para elaboração da curva de calibração empregada para cálculo de rendimento de cinamatos de citronelila e geranila (Tabela 4).

Tabela 4. Áreas dos picos do eicosano obtidos com diferentes concentrações de eicosano

| Concentração de eicosano Ppm | Área do Pico |
|---------------------------------|--------------|
| 500 | 15.054,76 |
| 1000 | 38.586,41 |
| 2500 | 113.498,4 |
| 5000 | 216.295,3 |
| 7500 | 331.793,69 |
| 10000 | 385.467,54 |
| 25000 | 1.234.963,53 |

O gráfico correspondente a curva de calibração encontra-se no apêndice.

5.4 Avaliação do Efeito da Concentração da Enzima

Para ter uma melhor compreensão do efeito da concentração da enzima na produção de cinamato de geranila e cinamato de citronelila foram realizados 4 ensaios utilizando, 15 %, 10 %, 5 % e 1 % de catalizador (em relação à massa de substratos). As condições reacionais foram: agitação de 125rpm, temperatura de 70 °C e razão molar ácido:álcool de 1:3 por 144 horas. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 14 e 15.

Figura 14. Efeito da concentração de enzima sobre a produção de cinamato de geranila à 70°C, razão molar ácido:álcool 1:3 e agitação de 125 rpm

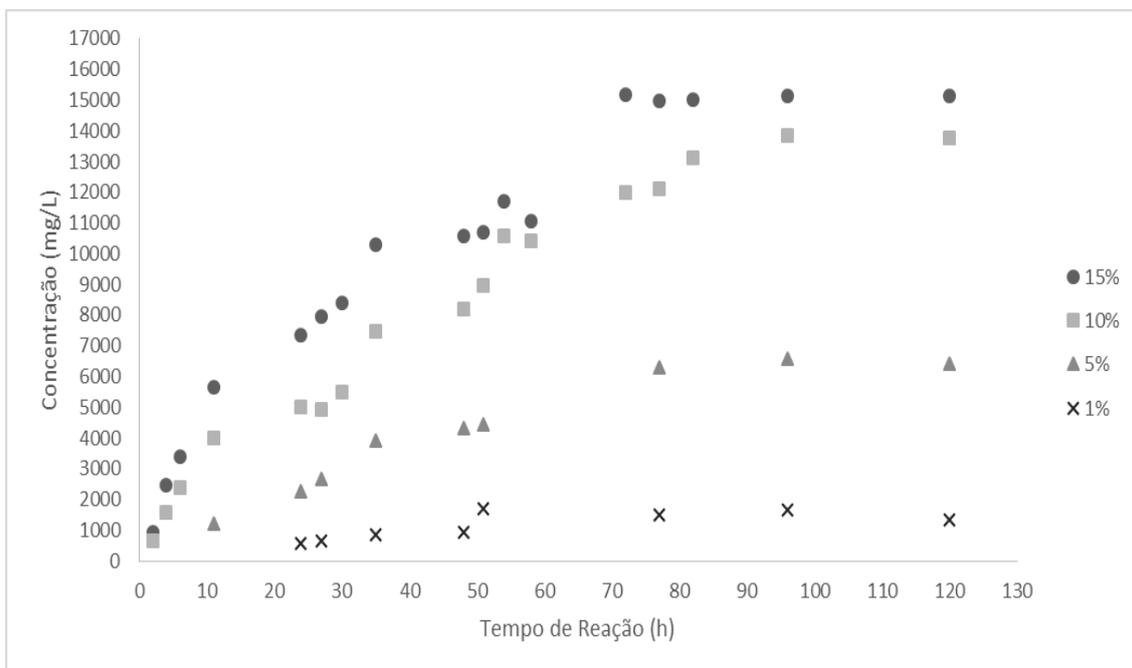
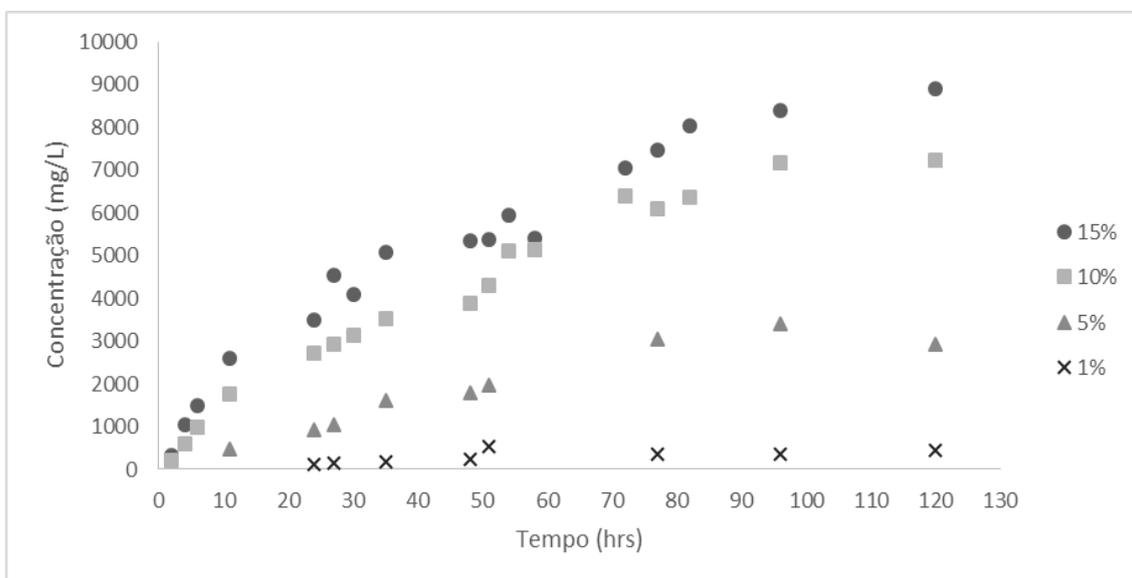


Figura 15 - Efeito da concentração de enzima sobre a produção de cinamato de citronelila à 70°C, razão molar ácido:álcool 1:3 e agitação de 125 rpm



Os dados a serem apresentados a seguir, para todas as condições experimentais testadas dividem-se em rendimento, quantidade de produto

obtido em cada reação, expressa em (mg/L) e conversão, qual foi a quantidade de substrato que converteu em produto, expressa em (%).

A partir das Figuras 14 e 15, pode-se observar um aumento nas produções dos éteres de ácido cinâmico tanto para o geraniol quanto para o citonelol conforme aumenta a concentração da lipase NS 88011, atingindo valores próximos a 9161 mg/L para o cinamato de citronelila e 15866 mg/L para o cinamato de geraniol depois de 144 horas para concentração 15% de enzima. Para o cinamato de citronelila e geranila ao final da reação com 10% de catalizador foi obtido 7285 mg/L e 13692 mg/L, respectivamente.

Wang et al, (2015), estudaram a formação de ésteres a partir do álcool benzílico e o ácido cinâmico utilizando a enzima Lipozym TLIM, no estudo eles relataram que um aumento de catalizador 30 mg/mL de solvente para 40 mg/mL, resultou em diminuição da taxa de reação e perda de rendimento, configurando que o aumento da concentração enzimática não foi benéfica para a reação.

No presente estudo foi obtido uma conversão final de 61,1% para o citonelol e 50,7% para o geraniol com 15 % de enzima NS 88011. Já para a concentração de 10 % de catalizador, foi obtido uma conversão de 48,5 % para o citonelol e 44,6 % para o geraniol. Zanetti et al. (2016) em estudo de produção de cinamato de geranila via reação catalisada pela enzima NS 88011, obtiveram uma conversão de 75,85% em éster em duas horas de reação, utilizando temperatura igual a 70°C, razão molar 1:3 (geraniol:ácido) e 15% (m/m) de enzima.

Também podemos perceber que a reação praticamente não ocorre com baixos níveis de concentração da enzima NS 88011, demonstrando assim a necessidade de uso de catalizador.

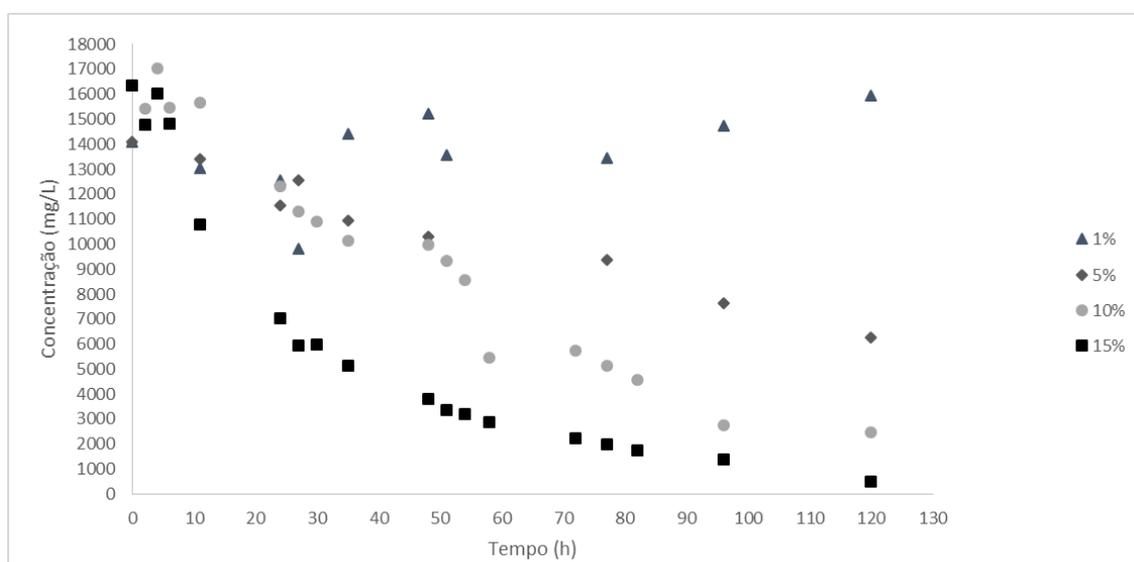
Como sabemos as enzimas comerciais imobilizadas normalmente possuem um custo elevado, sendo que a utilização de dosagens excessivas pode acarretar em redução da eficiência do sistema e aumento dos custos de produção (Bansode e Rathod, 2014; Deng et al., 2011; Serrano-Arnaldos et al., 2016).

Dessa forma é possível concluir que não se torna vantajoso o aumento da concentração do catalizador, em função da pequena diferença obtida na

conversão em ésteres ao final da reação. Sendo assim pensando em diminuição dos custos de produção optamos por utilização de uma menor concentração do catalizador, fixando para os próximos estudos de reações de esterificação a concentração de 10 % de enzima NS 88011, além da redução do tempo de reação para 120 horas.

Como podemos observar na Figura 16, o aumento da concentração da enzima também é desnecessário, tendo em vista que a concentração do reagente limitante da reação (ácido cinâmico) se esgota ao final da reação.

Figura 16 Redução da concentração do ácido cinâmico durante o tempo de reação em função da concentração de enzima utilizada



5.5 Avaliação do Efeito da Temperatura

Ao avaliar o efeito da temperatura na produção de cinamato de citronelila e cinamato de geranila foi realizado estudo cinético usando as temperaturas 70 °C, 60 °C e 50 °C, com 10% de enzima, agitação de 125 rpm e razão molar ácido:álcool 1:3 (Figuras 17 e 18 respectivamente). O tempo da reação foi fixado em 120 horas.

Figura 17. Efeito da temperatura sobre a produção de cinamato de citronelila à razão molar ácido:álcool de 1:3, concentração de enzima 10 % e agitação 125

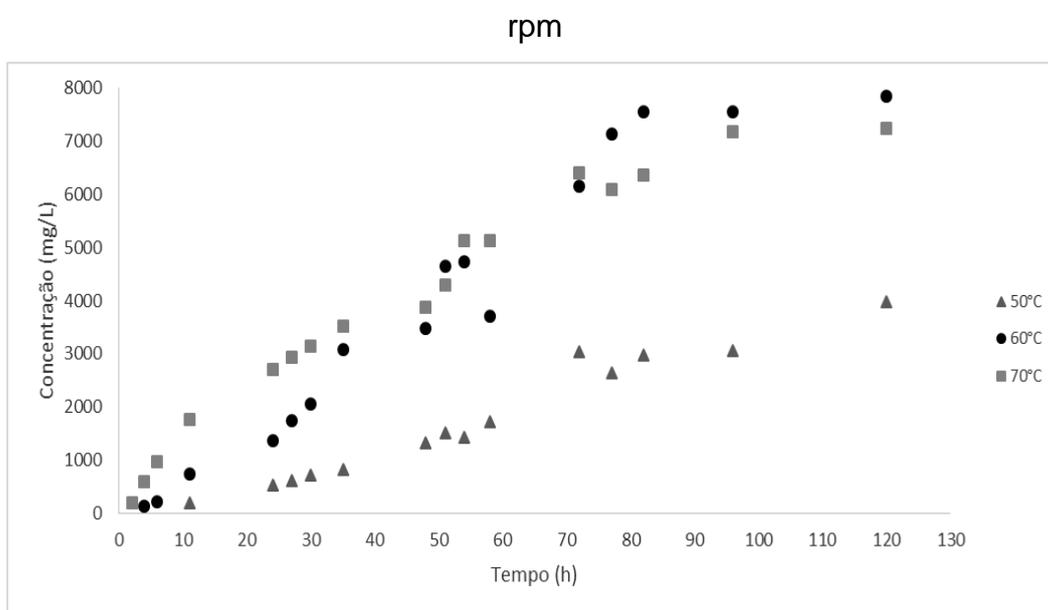
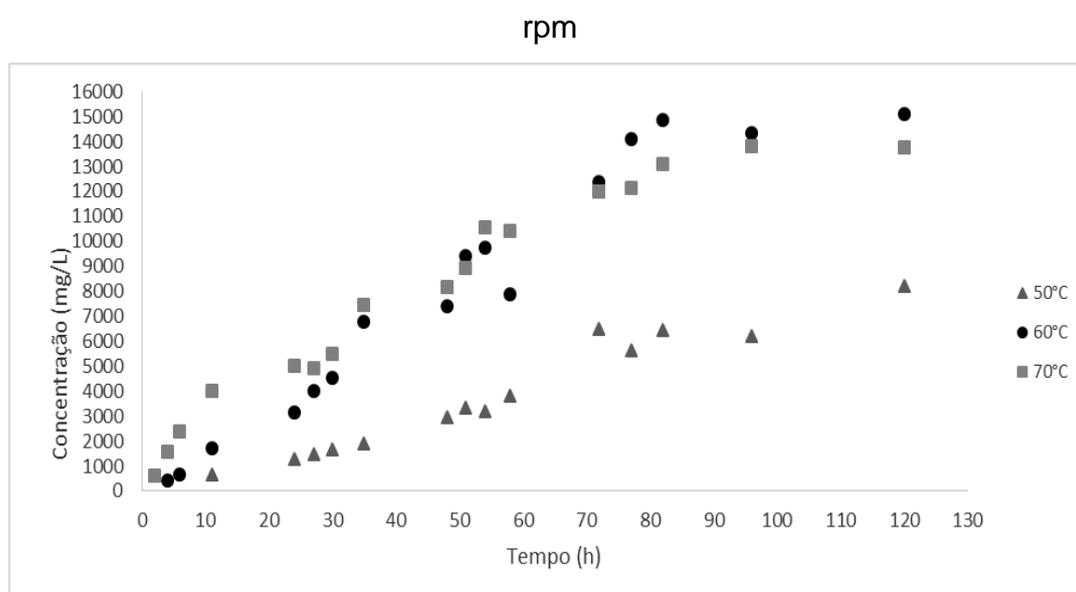


Figura 18 - Efeito da temperatura sobre a produção de cinamato de geranila à razão molar ácido:álcool de 1:3, concentração de enzima 10 % e agitação 125



Ao analisar as Figuras 17 e 18, percebemos que quando aumentamos a temperatura reacional de 50 °C para 60 °C, a produção de cinamato de citronelila passa de 3978 para 7845 mg/L, o que representa um incremento de

97,2 % e de cinamato de geranila de 8229 para 15089 mg/L, um incremento de 83,4%. Porém quando aumentamos a temperatura de 60 °C para 70 °C, não ocorre um aumento na concentração dos ésteres, pelo contrário, ocorre uma pequena diminuição na concentração dos ésteres produzidos.

Waghmare, Chatterji e Rathod (2017) estudaram a variação da temperatura para a reação de esterificação entre o ácido butírico e o álcool cinamílico utilizando a lipase Cal.B, onde encontraram a temperatura ótima de reação em 60 °C.

Bansode, Hardikar e Rathod, 2016, estudaram a esterificação do ácido butírico com o álcool isoamílico utilizando a enzima Novozym 435, em 4 diferentes temperatura (40, 50, 60 e 70 °C), onde observou-se melhores resultados em 50 e 60 °C, com um ótimo em 60 °C, e perda rendimento quando de um incremento na temperatura para 70 °C. Nesse mesmo estudo a conversão obtido em temperatura de 60 °C foi de 96%, quando ocorreu o aumento para 70 °C, a conversão caiu para 80 %.

Quando avaliado o efeito da temperatura em relação a conversão dos substratos, com concentração do catalizador fixada em 10 %, podemos perceber um incremento na conversão de ambos o substratos quando a temperatura é reduzida de 70 °C para 60 °C, passando de 48,5 % para 52,3 % para o citronelol e 44,6 % para 48,3 % para o geraniol. Quando se dá a redução da temperatura à 50 °C a conversão cai drasticamente, passando para 25,3% para o citronelol e 26,3 % para o geraniol.

Chaibakhsh et al, 2012, relataram a otimização da síntese de éster de eugenol, utilizando eugenol e ácido caprílico como substrato e lipozyme TL IM como catalisador. O rendimento máximo de conversão (72,2%) foi obtido sob condições ideais de 65 °C, 250 rpm, 259 min, 100 mg de enzima, e razão molar 2:1 de eugenol para ácido caprílico.

A temperatura apresenta um importante fator em estudos cinéticos de diferentes sistemas reacionais. Primeiramente, temperaturas elevadas tendem a melhorar a difusão dos substratos, aumentar a solubilidade e a velocidade das reações (Kristensen, Xu, Mu, 2005). Além disso o aumento da temperatura reduz a viscosidade do meio e favorece as interações entre enzima e substrato aumentando dessa forma a taxa da reação e a conversão (Sun, et al., 2013).

De acordo com Levenspiel (2007), o aumento da temperatura da reação vai acarretar por consequência em um aumento da conversão de uma reação uma vez que a sua constante e velocidade reacional também aumentam com o acréscimo da temperatura. Porém o autor também salienta a importância de analisar que o aumento de temperatura favorece a conversão da reação até determinado ponto, a partir do qual a conversão decresce. Isso ocorre pela hipótese de degradação térmica dos reagentes ou produtos, bem como a desnaturação da enzima.

As lipases comerciais apresentam sua temperatura ótima de reação entre 40-70 °C. Analisando os resultados e pensando em eficiência energética, a temperatura ótima para a reação proposta foi fixada em 60 °C.

5.6 Avaliação do Efeito da Agitação

Para a análise o efeito da agitação foi realizado um estudo cinético usando 3 velocidades de agitação diferentes, 125 rpm, 200 rpm e 50 rpm, para ambos os substratos com 10% de enzima, temperatura 60 °C e razão molar de ácido:álcool de 1:3 em 120 horas de reação. As curvas que descrevem as o comportamento cinético de produção de cinamato de citronelila e geranila podem ser visualizadas nas Figuras 19 e 20 respectivamente.

Figura 19 - Efeito da agitação sobre a produção de cinamto de citronelila à 60 °C, razão molar ácido:álcool de 1:3 e concentração de enzima 10 %

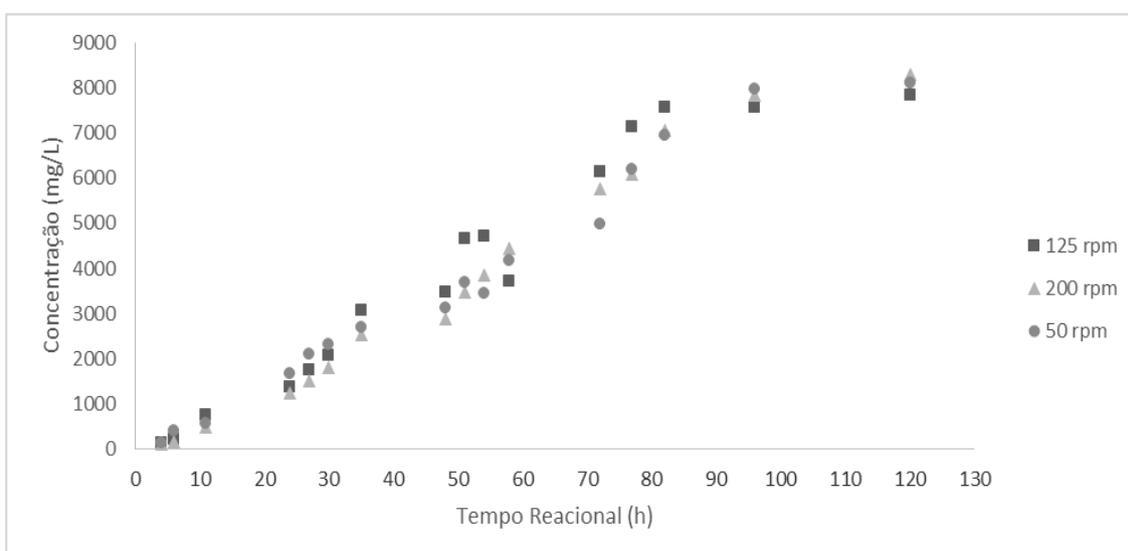
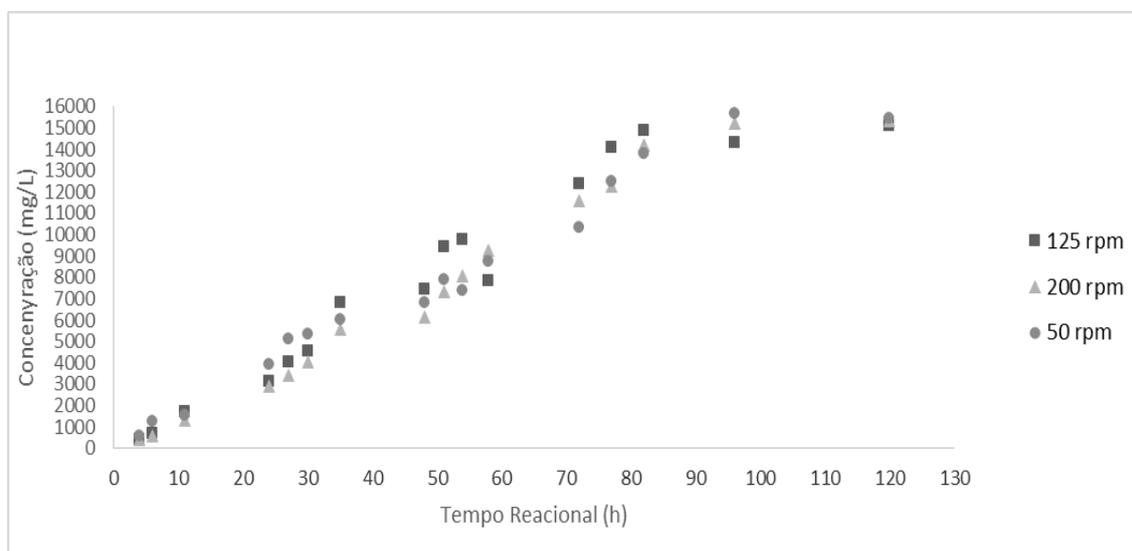


Figura 20 - Efeito da agitação sobre a produção de cinamato de geranila à 60 °C, razão molar ácido:álcool de 1:3 e concentração de enzima 10 %



Como pode ser observado nas Figuras 19 e 20 o aumento da agitação de 50 para 200 rpm não levou ao aumento de produção de ésteres. Também é possível observar que todas as curvas apresentaram a mesma tendência de crescimento chegando a produção máxima de 8289 mg/mL (54,8 %) e 15433 mg/mL (49,4 %) para cinamato de citronelila e cinamato de geranila, respectivamente depois de 100 horas da reação. Os valores obtidos mostram que a agitação não apresenta o efeito na formação dos produtos.

Sun e Tian, 2018, estudaram a produção de cinamato de benzila, e variação a agitação da reação em (60, 150 e 200 rpm), não encontrando diferenças significativas quanto a formação final do produto, resultados esses que se assemelham aos encontrados neste trabalho.

Resultados semelhantes foram obtidos por Cirillo, et al. (2018), para a reação esterificação entre álcool cetílico e ácido palmítico utilizando a enzima Lipozyme RM IM, com agitações de 180, 480 e 720 rpm, também não havendo variações na conversão final do produto.

Sabe-se que com o aumento da velocidade de agitação, o grau de missibilidade entre os reagentes aumenta promovendo um contato maior entre os substratos e os sítios ativos, fazendo com que a resistência a transferência de massa seja reduzida, aumentando, dessa forma, a taxa de reação. Porém é

importante ressaltar que em velocidades de agitação mais altas, é possível ocorrer um maior cisalhamento da enzimas que catalisam a reação, devido ao maior contato com as paredes do reator (Cirillo et al., 2018). Como enzimas comerciais imobilizadas possuem um custo elevado para sua utilização, é interessante minimizar esses impactos e manter a enzima o mais integra possível ao final da reação. Dessa forma a agitação ideal para o processo foi definida em 50 rpm.

5.7 Avaliação do Efeito da Razão Molar

Para a análise do efeito da razão molar foram usadas as seguintes razões molares (ácido:álcool) (1:2, 1:3, 1:6, 1:9 e 1:12). As curvas que descrevem as cinéticas produção de cinamato de citronelila e geranila podem ser visualizadas nas Figuras 21 e 22 respectivamente.

Figura 21 Efeito da razão molar sobre a produção de cinamato de geranila à 60 °C, agitação de 50 rpm e concentração de enzima 10 %

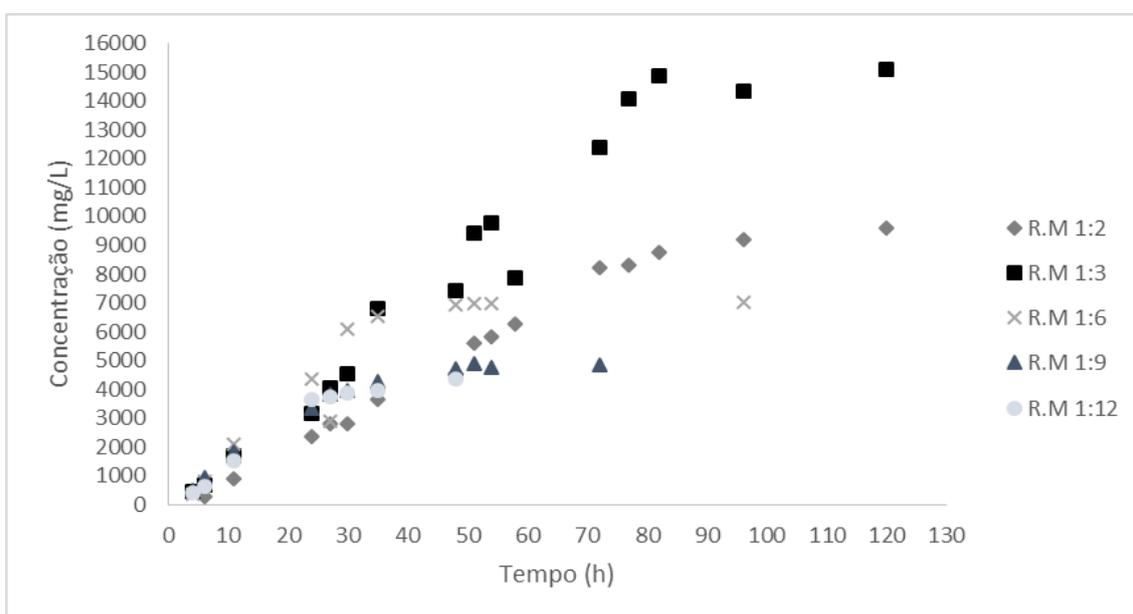
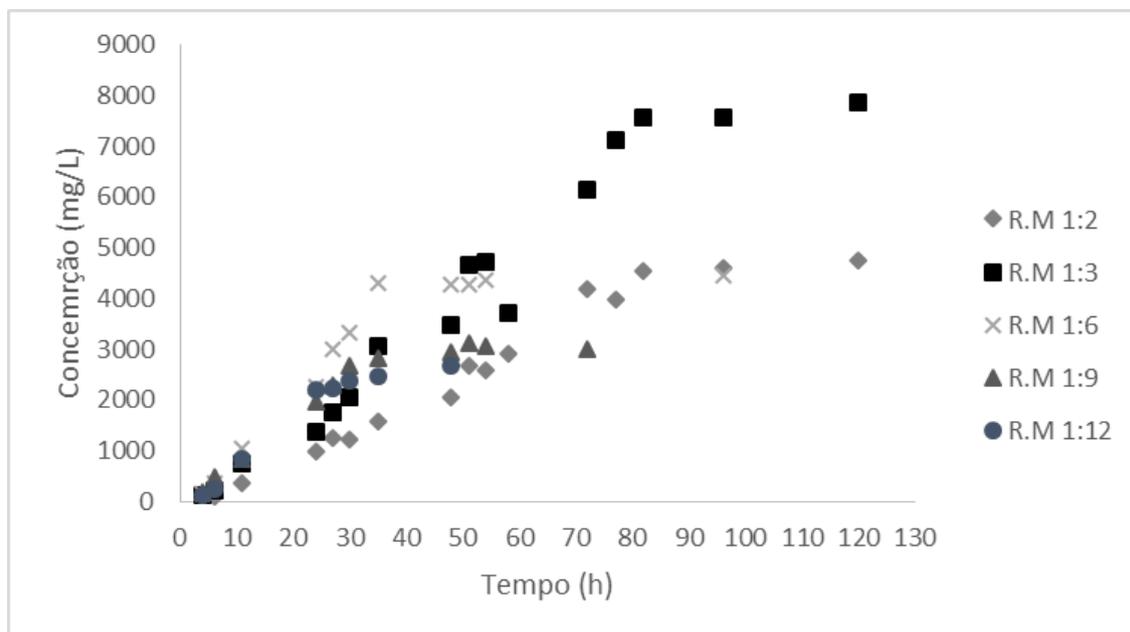


Figura 22 Efeito da razão molar sobre a produção de cinamato de citronelila à 60 °C, agitação de 50 rpm e concentração de enzima 10 %



O efeito da razão molar dos substratos é frequentemente relatado como um fator crítico a ser analisado em reações de síntese enzimática (Guillen et al, 2012), como podemos observar nas Figuras 21 e 22, a variação da razão molar afeta diretamente o rendimento da reação. Ao observar os valores para a R.M (ácido:álcool) de 1:3, podemos perceber no momento que se aumenta a proporção de ácido na reação o rendimento diminui, passando de 7845 mg/L (52,3 %) de cinamato de citronelila para 4764 mg/L (31,7 %) e 15089 mg/L (48,3 %) de cinamato de geranila para 9585 mg/L (30,7 %), quando utilizada a R.M de 1:2. Uma explicação possível para tal acontecimento está baseados que quando foi utilizado a razão molar 1:2 (ácido:álcool) a solubilidade da mistura reacional ficou mais difícil pelo excesso de ácido presente na reação, em comparação com a razão molar 1:3

Estudos feitos por Lerin et al, 2012, mostram que em reações onde existe ácido em excesso, ocorre a inibição de formação do produto, o que justifica a redução de 15089 mg/L para 9858 mg/L para o cinamato de geranila e de 7845 mg/L para 4764 mg/L para cinmato de citronelila.

Bansode, Hardikar e Rathod, 2016, mostraram em seus estudos que um aumento na razão molar no sentido do ácido, causa uma redução na taxa de conversão e reação, isto se deve ao fato de ocorrer uma inativação da enzima

por acidificação, devido ao acúmulo de ácido próximo aos sítios ativos da enzima.

Por outro lado, quando se aumenta a concentração de álcool na reação, nas reações com R.M (1:6, 1:9 e 1:12), ocorre uma diminuição acentuada na concentração final do produto, sendo obtido respectivamente 4443, 3000 e 2685 mg/L, contra 7845 mg/L utilizando a razão molar 1:3, para o cinamato de citronelila. Já para o cinamato de geranila a diferença é ainda maior onde passa de 15089 mg/L, para 7003, 4847 e 4362 mg/L respectivamente.

A diminuição pode ser explicada pela falta do reagente limitante na reação, que é o ácido cinâmico, o que faz com que tenha menos substrato para reagir, como consequência ocorre a diminuição da formação do produto final. Wang et al, 2015, mostrou que conforme se aumenta a razão molar, no sentido de aumentar a concentração de álcool na mistura reacional, a conversão substrato/produto diminui.

Wang et al, 2015, mostrou em seu trabalho também que quando foi utilizada uma razão molar (ácido:álcool) de 1:1, obteve uma conversão de 87,6 %, esse valor passou para 97,3 %, quando utilizada a razão molar de (1:3) e para valores próximos a 60 %, quando a razão molar passou para 1:6 e 1:9.

Sun e Tian, 2018, estudaram a formação de cinamato de benzila, e mostraram em seus experimentos que variação da razão molar ácido cinâmico:álcool benzílico de 1:1 para 1:3 fez o rendimento da reação aumentar 83 % para 93 %, já aumentando a proporção de álcool na razão molar (1:4, 1:5 e 1:6) fez com que o rendimento diminua para aproximadamente 87 %. Comportamentos semelhantes aos de Sun e Tian, (2018) e Wang et al, 2015, pode ser encontrado no presente trabalho.

No presente trabalho, as conversões obtidas para ambos os substratos corroboram com os valores encontrados por Wang et al, 2015, quando da utilização da razão molar (ácido:álcool) 1:2, os rendimentos obtidos foram de 31,75 % para cinamato de citronelol e 30,7 % para o cinamato de geraniol, quando a razão molar passa para 1:3, as conversões aumentam para 52,3 % e 48,3 %, respectivamente. Quando aumentamos a concentração de álcool no meio, as conversões caem bruscamente, para as razões molares de 1:6, 1:9 e 1:12, os rendimentos para cinamato de citronelila foram respectivamente

29,6 %, 20 % e 17,9 %, já para o cinamato de geranila foram, 22,4 %, 15,5 % e 13,9 %.

Um ponto importante a ser ressaltado a respeito do trabalho desenvolvido, é a utilização de um óleo bruto, onde há uma mistura complexa de compostos presente na sua composição, isso faz com que o tempo de reação se torne maior e possa prejudicar a reação podendo formar compostos indesejáveis a reação e também fazendo com que os rendimentos obtidos sejam um pouco menores do que quando comparado com trabalhos onde os compostos são isolados e puros. Porém quando analisamos a formação dos dois composto de forma conjunta presente no óleo percebemos que os rendimentos se equivalem.

Trabalhar com uma mistura de compostos traz algumas dificuldades adicionais ao trabalho, como o tempo de reação mais longo, porém tem benefícios como a formação de mais de um composto de interesse na mesma reação, além de óleo bruto, por se tratar de uma mistura de compostos, se economicamente mais viável que um composto puro.

Para uma melhor análise dos rendimentos obtidos nas reações, os valores de concentração (mg/mL) e conversão (%) em todas as condições experimentais, para os dois substratos se encontram na Tabela 5.

Tabela 5 Valores de rendimentos (mg/L) e conversões (%), para todas as condições experimentais

| R.M 1:3/70°C/125 rpm | | | | |
|-------------------------|-------------------|---------------|-----------------|---------------|
| [E] | Citronelol (mg/L) | Conversão (%) | Geraniol (mg/L) | Conversão (%) |
| 15 | 9.161 | 51,1±2,15 | 15.866 | 50,7±2,21 |
| 10 | 7.285 | 48,5±1,91 | 13.692 | 46,4±2,02 |
| 5 | 2.924 | 19,4±0,92 | 6.044 | 19,3±1,04 |
| 1 | 320 | 2,1±1,23 | 1.086 | 3,4±1,33 |
| R.M 1:3 [E] 10% 125 rpm | | | | |
| T °C | Citronelol (mg/L) | Conversão (%) | Geraniol (mg/L) | Conversão (%) |
| 70 | 7.285 | 48,5±1,91 | 13.692 | 46,4±2,02 |
| 60 | 7.845 | 52,3±1,46 | 15.089 | 48,3±1,63 |
| 50 | 3.978 | 25,3±0,92 | 8.229 | 26,3±1,03 |
| 60°C R.M 1:3 [E] 10% | | | | |
| Agitação (rpm) | Citronelol (mg/L) | Conversão (%) | Geraniol (mg/L) | Conversão (%) |
| 50 | 8.115 | 54,1±1,53 | 15.433 | 49,4±1,82 |
| 125 | 7.845 | 52,3±1,46 | 15.089 | 48,3±1,63 |
| 200 | 8.289 | 54,8±1,21 | 15.326 | 49±1,74 |
| 60°C 50 rpm [E] 10% | | | | |
| Razão Molar | Citronelol (mg/L) | Conversão (%) | Geraniol (mg/L) | Conversão (%) |
| 1:2 | 4.764 | 31,7±1,12 | 9.585 | 30,7±1,23 |
| 1:3 | 8.115 | 54,1±1,53 | 15.433 | 49,4±1,82 |
| 1:6 | 4.443 | 29,6±1,22 | 7.003 | 22,4±1,35 |
| 1:9 | 3.000 | 20±1,81 | 4.847 | 15,5±1,76 |
| 1:12 | 2.685 | 17,9±1,8 | 4.362 | 13,9±1,8 |

5.8 Resultados da Cinética Reacional

Os mecanismos de reação (Ping-Pong bi bi, Ordered bi bi e randon bi bi) têm sido propostos, por autores (Kuperkar et al, 2014 e Vishakha et al., 2013) para explicar reações catalisadas por lipase (transesterificação, esterificação, interesterificação) onde existe a presença de mais de um substrato e observa-se que a descrição mais comum e mais aceita da ação catalítica é dada pelo mecanismo de Ping Pong bi bi.

No presente trabalho foram investigados os três mecanismos, Ping Pong bi bi, Ordered bi bi e randon bi bi para avaliação das taxas iniciais com base em seu mecanismo. Sendo determinado o mecanismo dominante para variação de agitação (125; 200 e 50 rpm), temperatura (50, 60 e 70 °C) e

quantidade de enzima (15, 10, 5 e 1 %) nas síntese de cinamato de geranila e cinamato de citronelila, catalisada por NS 88011.

As tabelas 6, 7, 8, 9, 10 e 11 a seguir, mostram os parâmetros ajustados para os substratos geraniol e citronelol, nos três modelos estudados, Ping-Pong bi bi, random bi bi e Ordered bi bi.

Tabela 6 Comparação dos parâmetros cinéticos avaliados nas condições concentração de enzima e temperatura, para o modelo cinético Ping-Pong bi bi, com geraniol como substrato

| Condição Experimental | [E] % | V _m (mol/l.h) | K _{ia} (mol/L) | K _{ib} (mol/L) | K _{ma} (mol/L) | K _{mb} (mol/L) | R ² | Rmsd |
|-----------------------|----------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|----------|
| 70°C/125rpm/1:3 | 15 | 9.868295 | 0.000168 | 0.000049 | 0.126731 | 0.195487 | 0.955447 | 0.004885 |
| | 10 | 8.106943 | 0.000051 | 0.004829 | 0.179346 | 0.160281 | 0.894347 | 0.005541 |
| | 5 | 0.080841 | 0.007354 | 0.000679 | 0.101681 | 0.101053 | 0.977797 | 0.000436 |
| | 1 | 0.019988 | 346.1789 | 1077.551 | -3.175071 | -10.03210 | 0.008289 | 0.014796 |
| | T(°C) | | | | | | | |
| 10 % E/125rpm/1:3 | 70 | 8.106943 | 0.000051 | 0.004829 | 0.179346 | 0.160281 | 0.894347 | 0.005541 |
| | 60 | 12.87466 | 0.000068 | 0.000066 | 0.239843 | 0.225451 | 0.985559 | 0.004057 |
| | 50 | 2.822112 | 0.000052 | 0.338350 | 0.228512 | 0.132424 | 0.940782 | 0.005267 |
| | Agitação (rpm) | | | | | | | |
| 60°C/10% E/1:3 | 50 | 12.25635 | 0.000052 | 0.000048 | 0.215639 | 0.235698 | 0.954236 | 0.003589 |
| | 125 | 12.87466 | 0.000068 | 0.000066 | 0.239843 | 0.225451 | 0.985559 | 0.004057 |
| | 200 | 12.98547 | 0.000053 | 0.000059 | 0.225697 | 0.234789 | 0.963578 | 0.003987 |
| | R.M | | | | | | | |
| 60°C/10% E/50rpm | 1:2 | 0.895241 | 0.000713 | 0.000262 | 0.102068 | 0.010064 | 0.970287 | 0.001447 |
| | 1:3 | 12.87466 | 0.000068 | 0.000066 | 0.239843 | 0.225451 | 0.985559 | 0.004057 |
| | 1:6 | 0.287922 | 0.000141 | 0.035155 | 0.101182 | 0.100591 | 0.978010 | 0.000859 |
| | 1:9 | 0.102292 | 0.000587 | 0.078988 | 0.100842 | 0.100211 | 0.947101 | 0.000889 |
| | 1:12 | 0.069991 | 0.000544 | 0.072024 | 0.100819 | 0.100268 | 0.851111 | 0.000819 |

Tabela 7 Comparação dos parâmetros cinéticos avaliados nas condições concentração de enzima e temperatura, para o modelo cinético Randon bi bi, com geraniol como substrato

| Condição Experimental | [E] % | Vm (mol/L.h) | Kia (mol/L) | Kma (mol/L) | Kmb (mol/L) | R ² | Rmsd |
|-----------------------|----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|----------------|----------|
| 70°C/125rpm/1:3 | 15 | 2.60E-05 | 0.102401 | 0.102400 | 0.340799 | 0.265331 | 0.010321 |
| | 10 | 6.35E-05 | 0.101020 | 0.110200 | 0.220520 | 0.480512 | 0,030760 |
| | 5 | 8.31E-09 | 0.101230 | 0.101230 | 0.200390 | 0.968650 | 0.000420 |
| | 1 | 7.21E-06 | 0.101090 | 0.101090 | 0.208740 | 0.053770 | 0.012740 |
| | T °C | | | | | | |
| 10% E/125rpm/1:3 | 70 | 6.35E-05 | 0.101020 | 0.110200 | 0.220520 | 0.480512 | 0.030760 |
| | 60 | 2.11E-05 | 0.100882 | 0.100882 | 0.188407 | 0.319444 | 0.010136 |
| | 50 | 3.31E-05 | 0.100854 | 0.100854 | 0.185668 | 0.820136 | 0.005522 |
| | Agitação (rpm) | | | | | | |
| 60°C/10% E/1:3 | 50 | 2.54E-05 | 0.100459 | 0.100459 | 0.178962 | 0.336500 | 0.010253 |
| | 125 | 2.11E-05 | 0.100882 | 0.100882 | 0.188407 | 0.319444 | 0.010136 |
| | 200 | 2.23E-05 | 0.100444 | 0.104441 | 0.165873 | 0.325493 | 0.012563 |
| | R.M | | | | | | |
| 60°C/10% E/50rpm | 1:2 | 1.39E-05 | 0.101206 | 0.101206 | 0.221279 | 0.806205 | 0.002750 |
| | 1:3 | 2.11E-05 | 0.100882 | 0.100882 | 0.188407 | 0.319444 | 0.101360 |
| | 1:6 | 2.71E-06 | 0.101139 | 0.101139 | 0.213887 | 0.921917 | 0.001008 |
| | 1:9 | 3.21E-06 | 0.100994 | 0.100994 | 0.199548 | 0.898029 | 0.000885 |
| | 1:12 | 2.92E-07 | 0.101044 | 0.101044 | 0.204449 | 0.961159 | 0.000382 |

Tabela 8 Comparação dos parâmetros cinéticos avaliados nas condições concentração de enzima e temperatura, para o modelo cinético Ordered bi bi, com geraniol como substrato.

| Condição Experimental | [E] % | V _m (mol/l.h) | K _{ia} (mol/L) | K _{ib} (mol/L) | K _{ma} (mol/L) | K _{mb} (mol/L) | R ² | Rmsd |
|-----------------------|----------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|----------|
| 70°C/125rpm/1:3 | 15 | 0.001849 | 0.105740 | 0.206030 | 0.09612 | 0.022230 | 0.516750 | 0.007680 |
| | 10 | 0.000944 | 0.034940 | 0.173780 | 0.13271 | 0.193430 | 0.642970 | 0.008380 |
| | 50 | 0.001091 | 0.041430 | 0.158040 | 0.13903 | 0.183990 | 0.750650 | 0.010430 |
| | 1 | 0.001831 | 0.274380 | 0.286660 | 0.00807 | 0.248110 | 0.224070 | 0.009710 |
| | T °C | | | | | | | |
| 10% E/125rpm/1:3 | 70 | 0.000944 | 0.034947 | 0.173789 | 0.132714 | 0.193437 | 0.642974 | 0.008380 |
| | 60 | 0.002209 | 0.040082 | 0.186896 | 0.092352 | 0.208067 | 0.603989 | 0.007480 |
| | 50 | 0.002335 | 0.047251 | 0.190172 | 0.120424 | 0.196434 | 0.595927 | 0.006740 |
| | Agitação (rpm) | | | | | | | |
| 60°C/10% E/1:3 | 50 | 0.002306 | 0.039875 | 0.178953 | 0.087563 | 0.198563 | 0.598763 | 0.008102 |
| | 125 | 0.002209 | 0.040082 | 0.186896 | 0.092352 | 0.208067 | 0.603989 | 0.007480 |
| | 200 | 0.002465 | 0.041360 | 0.189963 | 0.086479 | 0.203648 | 0.610237 | 0.007526 |
| | R.M | | | | | | | |
| 60°C/10% E/50rpm | 1:2 | 0.000123 | 0.033520 | 0.009769 | 0.152706 | 0.259800 | 0.645392 | 0.003185 |
| | 1:3 | 0.002209 | 0.040082 | 0.186896 | 0.092352 | 0.208067 | 0.603989 | 0.007480 |
| | 1:6 | 0.000435 | 0.092301 | 0.206242 | 0.109877 | 0.211862 | 0.515921 | 0.002321 |
| | 1:9 | 0.000257 | 0.086401 | 0.196325 | 0.117498 | 0.204276 | 0.503661 | 0.001319 |
| | 1:12 | 0.000177 | 0.087508 | 0.201575 | 0.115585 | 0.206642 | 0.430373 | 0.001205 |

Tabela 9. Comparação dos parâmetros cinéticos avaliados nas condições concentração de enzima e temperatura, para o modelo cinético Ping-Pong bi bi, com citronelol como substrato

| Condição Experimental | [E] % | Vm (mol/l.h) | Kia (mol/L) | Kib (mol/L) | Kma (mol/L) | Kmb (mol/L) | R ² | Rmsd |
|-----------------------|----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|----------|
| 70°C/125rpm/1:3 | 15 | 9.576834 | 0.000171 | 0.000049 | 0.111406 | 0.187022 | 0.930883 | 0.005371 |
| | 10 | 2.621801 | 0.000036 | 0.000028 | 0.119959 | 0.127392 | 0.979132 | 0.002243 |
| | 5 | 0.080841 | 0.044735 | 0.000518 | 0.100498 | 0.100871 | 0.965461 | 0.000465 |
| | 1 | 0.021112 | 50.72488 | 119.8349 | -0.396991 | -1.023434 | 0.069391 | 0.014806 |
| | T °C | | | | | | | |
| 10% E/125rpm/1:3 | 70 | 2.621801 | 0.000036 | 0.000028 | 0.119959 | 0.12739 | 0.979114 | 0.002243 |
| | 60 | 10.42298 | 0.000037 | 0.000061 | 0.135294 | 0.20707 | 0.981252 | 0.004014 |
| | 50 | 0.877801 | 0.000140 | 0.125252 | 0.107187 | 0.10475 | 0.957731 | 0.002613 |
| | Agitação (rpm) | | | | | | | |
| 60°C/10% E/1:3 | 50 | 10.12361 | 0.000036 | 0.000052 | 0.12369 | 0.183643 | 0.975632 | 0.003981 |
| | 125 | 10.42302 | 0.000037 | 0.000061 | 0.135294 | 0.207073 | 0.981255 | 0.004010 |
| | 200 | 10.98754 | 0.000042 | 0.000072 | 0.158961 | 0.214561 | 0.956342 | 0.004251 |
| | R.M | | | | | | | |
| 60°C/10% E/50rpm | 1:2 | 0.895241 | 0.000682 | 0.000244 | 0.102068 | 0.100644 | 0.970287 | 0.001941 |
| | 1:3 | 10.42298 | 0.000037 | 0.000062 | 0.135294 | 0.207070 | 0.981255 | 0.004014 |
| | 1:6 | 0.132871 | 0.000195 | 0.000458 | 0.100852 | 0.100686 | 0.99186 | 0.000486 |
| | 1:9 | 0.170148 | 0.000175 | 0.060930 | 0.100906 | 0.100364 | 0.906365 | 0.000911 |
| | 1:12 | 0.055468 | 0.000303 | 0.060378 | 0.100626 | 0.100345 | 0.923952 | 0.000637 |

Tabela 10 Comparação dos parâmetros cinéticos avaliados nas condições concentração de enzima e temperatura, para o modelo cinético Randon bi bi, com citronelol como substrato.

| Condição Experimental | [E] % | Vm (mol/L.h) | Kia (mol/L) | Kma (mol/L) | Kmb (mol/L) | R ² | Rmsd |
|-----------------------|----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|----------------|----------|
| 70°C/125rpm/1:3 | 15 | 2.18E-05 | 0.100803 | 0.100803 | 0.180631 | 0.327483 | 0.009671 |
| | 10 | 2.89E-05 | 0.101124 | 0.101124 | 0.212371 | 0.445106 | 0.008421 |
| | 5 | 8.23E-06 | 0.101156 | 0.101156 | 0.215552 | 0.969685 | 0.000328 |
| | 1 | 7.08E-06 | 0.101191 | 0.101191 | 0.219276 | 0.055904 | 0.012768 |
| | T °C | | | | | | |
| 10% E/125rpm/1:3 | 70 | 0.0000289 | 0.101124 | 0.101124 | 0.212371 | 0.445106 | 0.008421 |
| | 60 | 2.05E-05 | 0.101041 | 0.101041 | 0.204029 | 0.301988 | 0.010266 |
| | 50 | 3.06E-05 | 0.101076 | 0.101076 | 0.207664 | 0.762474 | 0.006292 |
| | Agitação (rpm) | | | | | | |
| 60°C/10% E/1:3 | 50 | 2.09E-05 | 0.101125 | 0.101125 | 0.214501 | 0.298726 | 0.011256 |
| | 125 | 2.05E-05 | 0.101041 | 0.101041 | 0.204029 | 0.301988 | 0.010266 |
| | 200 | 2.10E-05 | 0.010105 | 0.010105 | 0.202403 | 0.300021 | 0.010364 |
| | R.M | | | | | | |
| 60°C/10% E/50rpm | 1:2 | 1.39E-05 | 0.101199 | 0.101199 | 0.22025 | 0.818272 | 0.002768 |
| | 1:3 | 2.05E-05 | 0.101041 | 0.101041 | 0.204029 | 0.301988 | 0.010266 |
| | 1:6 | 2.712E-06 | 0.101165 | 0.101165 | 0.216402 | 0.921949 | 0.001007 |
| | 1:9 | 3.163E-06 | 0.101076 | 0.101076 | 0.207584 | 0.881499 | 0.000942 |
| | 1:12 | 2.90E-07 | 0.101125 | 0.101125 | 0.212424 | 0.956218 | 0.000392 |

Tabela 11. Comparação dos parâmetros cinéticos avaliados nas condições concentração de enzima e temperatura, para o modelo cinético Ordered bi bi, com citronelol como substrato

| Fixed Conditions | [E] % | Vm (mol/l.h) | Kia (mol/L) | Kib (mol/L) | Kma (mol/L) | Kmb (mol/L) | R ² | Rmsd |
|------------------|-----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|----------|
| 70°C/125rpm/1:3 | 15 | 0.001601 | 0.107537 | 0.20234 | 0.094587 | 0.222391 | 0.456708 | 0.008123 |
| | 10 | 0.001829 | 0.094343 | 0.201906 | 0.107262 | 0.213743 | 0.423784 | 0.008171 |
| | 5 | 0.000753 | 0.088769 | 0.189991 | 0.113381 | 0.206165 | 0.447851 | 0.012767 |
| | 1 | 0.001542 | 0.262282 | 0.252411 | 0.038405 | 0.239792 | 0.214746 | 0.009766 |
| | T °C | | | | | | | |
| 10% E/125rpm/1:3 | 70 | 0.001829 | 0.094343 | 0.201906 | 0.107262 | 0.213743 | 0.423784 | 0.008171 |
| | 60 | 0.001709 | 0.095651 | 0.196473 | 0.105403 | 0.215156 | 0.421446 | 0.008743 |
| | 50 | 0.002968 | 0.000636 | 0.082791 | 0.110662 | 0.162311 | 0.618461 | 0.006849 |
| | Agitation (rpm) | | | | | | | |
| 60°C/10% E/1:3 | 50 | 0.001756 | 0.092563 | 0.192463 | 0.107896 | 0.210036 | 0.415638 | 0.008856 |
| | 125 | 0.001709 | 0.095651 | 0.196473 | 0.105403 | 0.215156 | 0.421446 | 0.008743 |
| | 200 | 0.001787 | 0.093457 | 0.190024 | 0.106013 | 0.213647 | 0.424364 | 0.008428 |
| | M.R. | | | | | | | |
| 60°C/10% E/50rpm | 1:2 | 0.000125 | 0.038063 | 0.010227 | 0.14963 | 0.261811 | 0.646564 | 0.003170 |
| | 1:3 | 0.001709 | 0.095651 | 0.196473 | 0.105403 | 0.215156 | 0.421446 | 0.008743 |
| | 1:6 | 0.000386 | 0.093978 | 0.206313 | 0.108233 | 0.213436 | 0.461479 | 0.002453 |
| | 1:9 | 0.000222 | 0.089357 | 0.199798 | 0.113722 | 0.207986 | 0.428655 | 0.001413 |
| | 1:12 | 0.000157 | 0.091751 | 0.206917 | 0.110346 | 0.211856 | 0.368548 | 0.001265 |

Os ajuste de R^2 e RMSD, mostrados nas Tabelas (6 a 11) acima, e as curvas comparativas dos modelos, nas condições experimentais ótimas, que se encontram nos apêndices (5 a 12) mostram que o modelo de Ping-Pong bi bi obteve os resultados mais satisfatórios, obtendo bons ajustes para as condições estudadas, em comparações com os demais modelos apresentados no trabalho. Já o modelo de Randon bi bi, veio em sequência e obteve poucos em poucas situações onde foi possível obter um ajuste satisfatório, não conseguindo prever de maneira clara os dados experimentais. Já o modelo de Ordered bi bi não conseguiu se ajustar aos parâmetros e não sendo eficiente para simular as reação.

Importante ressaltar que na concentração 1 % de enzima, nenhum modelo conseguiu se ajustar, visto que a reação se torna inviável sem uma concentração significativa de catalizador.

Podemos observar que para ambos os substratos (geraniol e citronelol) a razão molar ácido:álcool (1:3), à temperatura de 70 °C e concentração de enzima de 15 % e velocidade de agitação de 125 rpm, obtiveram maior valor da constante cinética V_m em comparação com as outras condições, coincidindo com os rendimentos máximos da reação apresentados anteriormente (Figura 14 e 15) e na Tabela 5, indicando maior taxa de reação nesta condição devido à divisão mais rápida do complexo enzima-substrato para formar o produto.

O mesmo pode ser observado para quando ocorre a variação dos demais parâmetros analisados (temperatura, agitação e razão molar). Os valores para melhor efeito de comparação pode ser obtidos através da Tabela 5 e as Tabelas 6 a 11. Dado o exposto, observa-se comportamento satisfatório da nova enzima (NS 88011) para a produção de cinamato de citronelila e cinamato de geranila.

Um alto valor de V_m indica a existência de uma tendência maior na formação do complexo enzima/substrato se separarem e formarem o produto (Khan et al, 2015).

O mesmo comportamento encontramos no estudo de Chowdary e Prapulla, 2005, que estudaram a esterificação entre o etanol e o ácido isovalérico, onde o valor do V_m , passou de 2,637 na utilização de n-hexano como solvente, para 7,723 com utilização uma mistura de solventes (n-hexano

e dietil éter) numa proporção de (85/15) v/v, coincidindo com o aumento na produção de éster pela reação.

Quando analisado os valores estimados da constante k_m , para o modelo de melhor ajuste que foi o Ping-Pong bi bi, podemos perceber que os valores não possuem muita diferença para as condições testadas, o que indica que a enzima possui igual especificidade tanto para o álcool, quanto para o ácido, desta forma nenhum dos parâmetros (k_{ma} e k_{mb}) possui efeitos adversos sobre a formação do complexo enzima-substrato durante a reação catalítica (Voet e Voet, 2006).

Além semelhança de valores da constante k_m para ambos os substratos, sugere que a enzima possui afinidade idêntica para ácido cinâmico, geraniol e citrionelol. Resultados semelhantes, que corroboram com exposto foi apresentado por Basheer, Cogan e Nakajima (1998) relataram em seus estudos a afinidade de ligação comparável de uma lipase (R. japônicas) para ambos os substratos na esterificação entre ácido láurico ($k_m = 10,6$ mmol /L) e álcool dodecílico ($k_m = 11,9$ mmol/L), e também Chowdhury e Mitra (2015) relataram afinidade dos substratos (ácidos graxos livres e álcool octílico) utilizando à lipase (Novozyme 435), apresentando k_m de 1,08 mol/L e 2,07 mol /L, respectivamente. Outros autores que apresentaram resultados neste sentido foram Bansode, Hardikar e Rathod (2016) relaram a afinidade da constante k_m para o ácido butirico e o álcool isoamilico encontrando valores de $k_a = 0.636$ mol/L e $k_b = 0.657$ mol/L respectivamente.

Os valores para os parâmetros de (k_{ib}) constante de inibição dos álcoois e k_{ia} , constante de inibição do ácido, para uma reação tendem a ser próximos, o que indica que nenhum dos substratos, tanto álcoois quanto o ácido, age de maneira a inibir a formação do produto, prejudicando assim a reação.

Podemos analisar que para todas as variações das condições experimentais apresentadas na Tabelas 6 a 11

No presente estudo, ao analisar o efeito inibitório das constantes k_{ia} e k_{ib} para a razão molar (ácido:álcool) de 1:3, não foi possível observar a influência de alguns dos substratos agindo de maneira inibitória, onde as constantes de inibição foram semelhantes, apresentando valores baixos, o que demonstra ser, que está parece ser a condição ótima de razão molar para a reação.

Ao observar a Tabela 6 e fazer a análise da variação da razão molar, no sentido de aumentar a quantidade de álcool presente na mistura reacional, podemos perceber que no modelo de Ping-Pong bibi, para o cinamato de geranila, podemos perceber que o valor da constante de inibição do álcool (k_{ib}), aumenta na casa de 1000 vezes, mostrando um forte poder inibitório atuando sobre a reação, fazendo com que o rendimento diminua, o que pode ser observado na Figura 21.

O mesmo efeito inibitório podemos perceber para o cinamato de citonelila, observando a Tabela 9 quando aumentada a razão molar (ácido:álcool) de 1:3, para 1:6, podemos observar um aumento de 10 vezes na constante inibitória do álcool (k_{ib}), e quando passa para 1:9 e 1:12, o aumento do valor da constante inibitória chega também a 1000 vezes. E na Figura 22, pode-se observar a redução do rendimento ao final da reação.

Em estudos realizados por Wang et al. (2015), onde estudaram a produção de cinamato de benzila mostra que a utilização de razões molares acima de (1:3) ácido:álcool, ocorreu uma diminuição do rendimento devido à inibição da lipase causada pelo álcool, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho. 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 álcool à enzima.

Quando analisamos o efeito contrário, na razão molar onde se diminui a quantidade de álcool (1:2) e por consequência, se aumento a concentração de ácido no meio, para o modelo de Ping-Pong bi-bi, foi observado que, a constante de inibição do ácido (k_{ia}), aumentou em 10 vezes, o que pode ser observado nas Tabelas 6 e 9, para ambos os produtos, com consequente diminuição do rendimento, que também pode ser observado de forma bem clara na figuras 21 e 22. Um dos pontos que pode ter favorecido o efeito inibitório e a diminuição do rendimento, é a dificuldade na solubilização dos substratos para iniciar a reação.

Lerin et al, 2012, mostrou em seus experimentos que o excesso de ácido pode causar pode reduzir a taxa de reação, reduzindo assim o rendimento devido a inibição causada pelo ácido

6. Conclusões

O processo de esterificação enzimática com a utilização do óleo bruto de citronela conseguiu resultados promissores apesar das dificuldades apresentadas durante o processo, como o longo tempo reação e por se tratar de uma mistura de compostos. A complexa mistura de componentes presente no óleo bruto de citronela mostrou não afetar de forma negativa o rendimento do reação, não ocorrendo a formação de compostos indesejáveis. Os resultados obtidos mostram-se satisfatório perante os trabalhos com a utilização de compostos puros e isolados, mostrando que é possível se obter bons resultados com esse tipo de substrato, sendo assim podemos concluir que através do estudo cinético da produção de cinamato de geranila e citronelila utilizando o óleo essencial bruto de citronela com o ácido cinâmico é possível se otimizar as condições de reação para a obtenção de melhores resultados.

Com o estudo cinético foi possível reduzir a temperatura de produção de 70 °C para 60 °C e a concentração da enzima de 15 % para 10 % (m/m) possibilitando a diminuição do custo operacional. A razão molar que leva a produção máxima de ésteres de interesse foi de 1:3 (ácido:álcool) e a agitação não apresentou o efeito na faixa estudada.

Em processos de esterificação que utiliza biocatalisadores, é importante ajustar as condições ideais de operação para se obter a máxima eficiência no processo. Os modelos matemáticos utilizados no trabalhos auxiliaram neste processos, permitindo uma descrição adequada do sistema, facilitando a otimização do processo e elucidar a cinética da reação de esterificação.

Com a utilização dos modelos cinéticos também foi possível verificar que nenhum dos substratos utilizados na reação, os álcoois, geraniol e citronelol, e o ácido cinâmico atua de maneira inibitória na reação de esterificação nas condições ideais de operação, o que se torna de grande interesse para o processo, uma vez que a reação já é demasiado longa.

Dentre os modelos cinéticos aplicados, o que obteve o melhor desempenho e conseguiu reproduzir da melhor forma os resultados obtidos experimentalmente, foi o Ping-Pong bi bi. O modelo também demonstrou que há um efeito inibitório do álcool atuando sobre a reação quando se opera em razões molares diferentes de 1:3. O modelo de Ping-Pong bi bi, demonstrou

que as taxas de reações máximas preditas (V_m) são maiores nas condições experimentais em que se obteve melhores rendimentos.

7. Perspectivas de trabalho futuros

- Avaliação dos ciclos operacionais da enzima NS 88011

8. Referências

AL-ZUHAIR, S.; LING, F.; JUN, L. S. Proposed Kinect mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 951-960, 2007.

ARENALES, S.; DAREZZO, A. **Cálculo Numérico: Aprendizagem com apoio de software**. São Paulo: Cengage Learning, 2014.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. Ed. 46, 446 – 475, 2008.

BASSANEZI, R. **Ensino-Aprendizagem com Modelagem Matemática: uma nova estratégia**. São Paulo, SP: Contexto, 2011

BARRIER BIOTECH LIMITED; ROBERT EUGENE RYAN; SANDRA MORRIS. ROBERT EUGENE RYAN; SANDRA MORRIS. **Citronella oil as a herbicide for control of ragwort, docks, nettles or thistles**. n. CA 2324245 C, 17 mar. 1999, 14 out. 2008, 2008.

BASER, K. H. C.; DEMIRCI, F. **Chemistry of essential oils**. In: BERGER, R. G. Flavours and Fragrances: Chemistry, **Bioprocessing and Sustainability**. Hannover: Springer, 2007. Cap. 4, p. 43-86.

BASTOS, J. F. A.; ANTONIOLLI, A. R.; De SOUZA, D. P.; MOREIRA I. J.; MEDEIROS, I. A.; RIBEIRO, T. P.; SANTOS, M. R. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, n. 4, p. 331–337, abr. 2010.

BANSODE, S. R.; HARDIKAR, M. A.; RATHOD, V. K. Evaluation of reaction parameters and kinetic modelling for Novozym 435 catalysed synthesis of

isoamyl butyrate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1306–1314, 1 jun. 2017

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

BASHEER, S.; COGAN, U.; NAKAJIMA, M. Esterification kinetics of long-chain fatty acids and fatty alcohols with a surfactant-coated lipase in n -hexane. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 12, p. 1785–1790, dez. 1998.

BAUER, K.; GARBE, D. **Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses**. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p. 213, 1985.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. **Common fragrance and flavor materials. Preparation, properties and uses fourth, completely revised edition**. VCH. Germany. 2001.

BIEGLER, L. T.; GROSSMANN, I. E., Retrospective on optimization. **Computers and Chemical Engineering**, v. 28, p. 1169-1192, 2004a.

BIEGLER, L. T.; GROSSMANN, I. E., Future perspective on optimization. **Computers and Chemical Engineering**, v. 28, p. 1193 – 1218, 2004b.

BISSWANGER, H. **Enzyme Kinetics Principles and methods**. Weinheim, Germany: WILEY-VCH, 2002.

BONDIOLI, P. The Preparation of Fatty Acid Esters by Means of Catalytic Reactions. **Topics in Catalysis**, v. 27, p. 77-82, 2004.

BOTELHO, F. M.; CORRÊA, P. C.; GONELI, A. L. D.; MARTINS, M. A.; BAPTESTINI, F. M. Análise da Hidratação do Arroz na parboização. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 30(3), p.713 – 718, jul.-set. 2010.

BRITO R. G., GUIMARÃES A. G., QUINTANS J. S., SANTOS M.R., DE SOUSA D.P., BADAUE-PASSOS D. Jr, DE LUCCA W. Jr, BRITO F. A., BARRETO E. O., OLIVEIRA A.P., QUINTANS L. J. Jr. Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. **Journal of Natural Medicines**. v.4, p. 637-44, 2012.

BRITO R.G., SANTOS P.L., PRADO D.S., SANTANA M.T., ARAÚJO A.A. BONJARDIM L.R., SANTOS M.R., DE LUCCA Júnior W., OLIVEIRA A.P., QUINTANS-JÚNIOR L.J.. Citronellol reduces orofacial nociceptive behaviour in mice - evidence of involvement of retrosplenial cortex and periaqueductal grey areas. **Basic Clin Pharmacology Toxicology**. v.112, p.215-21, 2013.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods- a review. *Int. Jornal Food Microbiology*, v. 94, p. 223-253, 2004.

CARDOZO, M. T. **Atividade quimiopreventiva do geraniol e β -ionona quando administrados isoladamente ou em associação a ratos durante a fase de promoção da hepatocarcinogênese**. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo, 123 p, 2007.

CARVALHO, P. O.; CALAFATI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lípases microbianas. **Química Nova**. v. 28, 4, p. 614-621, 2005.

CARNESECCHI, S.; Schneider. Y, Ceraline. J, Duranton. B, Gosse. F, Seiler. N, Raul. F. **Geraniol , a Component of Plant Essential Oils , Inhibits Growth and Polyamine Biosynthesis in Human Colon Cancer Cells**. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 298, n. 1, p. 197–200, 2001.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. **Chemistry and bioactivity of essential oils**. In: THORMAR, H. Lipids and essential oils as antimicrobial agents. West Sussex: John Wiley & Sons, 2011. Cap. 9, p. 203-238.

CASTELO, A. V. M.; DEL MENEZZI, C. H. S.; RESCK, I. S. **Rendimento e análises espectroscópicas (RMN ¹H, ¹³C, IV) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do Cerrado**. CERNE, v. 16, n. 4, p. 573-584, 2010.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

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

CHARBONNEAU, L. R.; HILLIER, N. K.; ROGERS, R. E. L.; WILLIAMS, G. R.; SHUTLER, D. Effects of Nosema apis, N. ceranae, and coinfections on honey bee (*Apis mellifera*) learning and memory. **Scientific Reports**, 2016.

CHOWDARY, G. V.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from Rhizomucor miehei: a multivariate analysis. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 331–339, 1 nov. 2000

CASTRO, H. G. D. et al. Teor e Composição do Óleo Essencial de Cinco Acessos de Mentrasto. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004.

CHAIBAKHSH N.; BASRI, M, ANUAR, S.H.M, RAHMAN, M.B.A, REZAYEE, M. Optimization of enzymatic synthesis of eugenol ester using statistical approaches. **Biocatal Agric Biotechnol**, v. 1, p. 226–231, 2012.

CIRILLO, N. A; QUIRRENBACH, C.G; CORAZZA, M. L ; VOLL, F. A. P . Enzymatic kinetics of cetyl palmitate synthesis in a solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal** , v. 137, p. 116-124, 2018.

CORAZZA, S. **Aromacologia: Uma Ciência de Muitos Cheiros**. São Paulo: Editora SENAC 2002.

CHIARADIA, V.; CANSIAN, R. L; Detofol, M. R; JÚNIOR, C. V; LERIN, L. A; OLIVEIRAI, D; OLIVEIRA, J. V; Paroul, N. Synthesis of Eugenol Esters by Lipase-Catalyzed Reaction in Solvent-Free System. **Appl Biochem Biotechnol**. V. 168, p 742–751, 2012.

DAFERERA, D. J.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU; M. G. Characterization of Essential Oils from Lamiaceae Species by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. Atenas, Grécia. v. 50, p. 5503-5507, 2002.

DARNOKO, D.; CHERYAN, M. Kinectis of palm oil: Tranesterification in a Batch Reactor. **Journal of the American Oil Chemistis Society**. V. 77, p. 1263-1266, 2000.

DENG, L. LIU, J; NIE, K; TAN, T; WANG, F; WANG, P; WANG, Z. Synthesis of Wax Esters by Lipase-catalyzed Esterification with Immobilized Lipase from *Candida* sp. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 6, p. 978–982, 2011.

DE SOUZA, D. P.; QUINTANS, L.; DE ALMEIDA, R. N. Evolution of the Anticonvulsant Activity of -Terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 1, p. 69–70, 2007.

DEUTSCHMANN, O.; KNOZINGER, H; KOCHLOEFL, K; TUREK, T. Heterogeneous catalysis and solid catalysts. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2009

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

DEVRNJA, N. et al. Comparative studies on the antimicrobial and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and methanol extracts. **South African Journal of Botany**, v. 111, p. 212-221, 2017.

EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. Enhanced synthesis of isoamyl acetate using an ionic liquid-alcohol biphasic system at high hydrostatic pressure. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 36 – 40, 2010.

FABER, R.; JOCKENHOVEL, T.; TSATSARONIS, G., Dynamic optimization with simulated annealing. **Computers and Chemical Engineering**, v. 29, p. 273-290, 2005.

FENNEMA, O. R; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Fennema's Food Chemistry**. 4.ed. New York: CRC Press, 2007.

FOGLER, H. S. **Elements of chemical reaction engineering**. 3° edição, Prentice Hall, New Jersey, 1999.

FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. São Paulo: LTC, 2009.

GARCÍA.; J. E.; GARCÍA, G. J. F; BASTIDA, A.; FERNÁNDEZ, M. A. Enzymes in the syntheses of bioactive compounds: the prodigious decades. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 17-34, 2004.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Application of lipase in kinetic resolution of racemates. **Chirality**, v. 17, p. 1-15, 2005.

GILLIJ, Y. G.; GLEISER, R. M.; ZYGADLO, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**. Ed. 99, 2507-2515, 2008

GOTOR-FÉRNANDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 111-120, 2006.

HAAG, J. E.; VANDE WOUWER, E. A.; QUEINNEC, I., Macroscopic modeling and identification of an anaerobic waste treatment process. **Chemical Engineering Science**, v. 58, p. 4307-4316, 2003.

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

IBRAHIM, M. A. et al. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural Food Science**, v. 10, p. 243-259, 2001.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; GUALTIERI, S. C. J. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica.**, v. 27, n. 1, p. 70-77, 2013.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection.**, v. 19, p. 603-608, 2000.

ITABAIANA, J. I.; CORDEIRO, Y. M. L.; GONÇALVES. K. M; LEAL, I. C. R; MIRANDA, L. S. M; de SOUZA, R. O. M.A; ZOUMPANIOTI, M; XENAKISC, A. Kinetics and mechanism of lipase catalyzed monoacylglycerols synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 96, p. 34-39, Dec. 2013.

JEON, J. H.; KIM, H. W; KIM, M. G; LEE H.S. Mite-control activities of active constituents isolated from *Pelargonium graveolens* against house dust mites.

Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 18, n. 10, p. 1666–1671, out. 2008

KAKARAPARTHI, P. D.; KUMAR, A. N, KUMARA, J. K, RAJPUT, D. K, SRINIVASA, K. V. N. S; SARMA, V. U. M. Variation in the essential oil content and composition of Citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt.) in relation to time of harvest and weather conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 240-248, 2014.

KHAN, N. R.; JADHAV, S. V.; RATHOD, V. K. Lipase catalysed synthesis of cetyl oleate using ultrasound: Optimisation and kinetic studies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 522-529, Nov. 2015.

KHAN, A. Q.; KHAN, R.; QAMAR, W.; LATEEF, A.; REHMAN, M.U.; TAHIR, M.; ALI, F.; HAMIZA, O.O.; HASAN, S.K.; SULTANA, S. Geraniol attenuates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)- induced oxidative stress and inflammation in mouse skin: possible role of p38 MAP Kinase and NF-κB. **Experimental and molecular pathology**, v. 94, n. 3, p. 419–29, jun. 2013.

KHAN, N. R.; JADHAV, S. V; RATHOD, V. K. Lipase catalysed synthesis of cetyl oleate using ultrasound: Optimisation and kinetic studies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 522-529, Nov. 2015.

KRISTENSEN, J.B.; XU, X.; MU, H. Diacylglycerol Synthesis by Enzymatic Glycerolysis: Screening of Commercially Available Lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, p.329-334, 2005.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126–139, 2004.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p. 120-132, 2010.

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

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 58-60, 2001.

LAGE, P. L. C.; PINTO, J. C. C. S. **Métodos numéricos em problemas de Engenharia Química**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

LAPCZYNSKI; A, BHATIA.; S. P, FOXENBERG.; R. J, LETIZIA.; C.S, API.; A. M. Fragrance material review on geraniol. **Food and Chemical Toxicology**. V.46, p. 160-170, 2008.

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

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. 563 p

LIPTON - Division of Conopco, Inc. (Estados Unidos da América). Michael Charles Cirigliano; William Conrad Franke; Meghan Mary Kemly; Raymond Thomas McKenna; Paul John Rothenberg. Cinnamic acid for use in tea containing beverages. US n. US 6036986 A, 28 out. 1997, 14 mar. 2000, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

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.

MAIA, M. F.; MOORE, S. J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, 10(Suppl 1): S11, 2011. Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/10/S1/S11>, acesso em 17 de janeiro de 2019.

MARCO, C. A.; BORGES, N. S. S.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; NAGAO, E. O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura brasileira**, v. 25, n. 3, 2007.

MARANGONI, A. G. *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*. New Jersey: A John Wiley and Sons, INC., 2003.

MOLINERO, L.; ESTEBAN, J; GARCIA-OCHOA, F; LADERO, M; TAMAYO, J. J. Thermal esterification of cinnamic and p-methoxycinnamic acids with glycerol to cinnamate glycerides in solventless media: A kinetic model. **Chemical Engineering Journal**, v. 225, p. 710-719, 2013.

MORE, S. B.; WAGHMARE, J. T.; GOGATE, P. R. Ultrasound pretreatment as a novel approach for intensification of lipase catalyzed esterification of tricaprilyn. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 253–261, 2017.

MULLER, G. C.; JUNNILA, A.; BUTLER, J.; KRAVCHENKO, V. D.; REVAY, E.E;WEISS, R.W.; SCHLEIN, Y. Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitos. **Journal of vector Ecology**. Vol. 34, n.1, 2009.

NERIO, L. S.; VERBEL, J. O.; STASHENKO, E. Repellent activity of Essentials oils: a reveiw. **Bioresource Technology**. Ed. 101, 372-378, 2010

OLIVEIRA, M.A. de. **Resolução enzimática de álcoois secundários**. 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

OLIVEIRA, J. S.; ALMEIDA, R. N.; ALVES-NICULAU, E. S.; ESTEVAM, C. S.; MARCHIORO, M.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; PLACA, A. F.; PORTO, L. A.; SIQUEIRA, R. S. Análise fitoquímica e propriedade anticonvulsivante de *Ocimum basilicum* óleo das folhas essencial. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y Aromaticas**, v. 8, p. 195-202, 2009

PAROUL, N.; BIASI, A.; ROVANI, A.C.; PRIGOL, C.; DALLAGO, R.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Enzymatic production of linalool esters in organic and solvent-free **Bioprocess Biosystem Engineering**, v.33, p.583-589, 2010

PAROUL, N.; CANSIAN, R. L.; CHIARADIA, V.; GRZEGOZESKI, L. P.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H. Solvent-Free Production of Bioflavors by enzymatic Esterification of Citronella (*Cymbopogon winterianus*) Essential Oil. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.166, p.13–21, 2012

PEDERSEN, N. R.; WIMMER, R.; EMMERSEN, J.; DEGN, P.; PEDERSEM, L. H. Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalyzed esterification of disaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 13, p. 1179-1184, 2002.

PILAREK, M.; SZEWCZYK, K. W. Kinetic model of 1,3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 736-744

PINTO, G. F.; MENEZES, R. R. **Cinética enzimática**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2009.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52 p. 201-219, 2009.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. Bioprospecting of plant essential oils for medicinal uses. In: FULEKAR, M.H.; PATHAK, B.; KALE, R.K. **Environment and Sustainable Development**. India: p. 59-76, 2014.

RESENDE, O.; FERREIRA, L. U.; ALMEIDA, D. P. Modelagem Matemática Para Descrição da Cinética de Secagem do Feijão Adzuki. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n.2, p.171-178, 2010.

ROCHA.; S. F. R; MING.; L. C. MARQUES.; M. O. M. Influência de cinco temperaturas de secagem no rendimento e composição do óleo essencial de citronela *Cymbopogon winterianus* Jowitt. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, p.73-78, 2000.

SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A, SANGWAN, R. S; SHABIH, F. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3-21, 2001.

SAYORWAN, W.; HONGRATANAWORAKIT, T; KOTCHABHAKDI, N; PIRIYAPUNYAPORN, T; RUANGRUNGSI, N; SIRIPORNANICH, V. The Harmonizing Effects of Citronella Oil on Mood States and Brain Activities. **Journal Saúde Public**. V. 26(2), p. 69-75, 2012

SCHWAAB, M., **Avaliação de algoritmos heurísticos de otimização em problemas de estimação de parâmetros**. Tese (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

SCHWAAB, M.; PINTO, J.C. **Análise de Dados Experimentais I – Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros** – Escola Piloto em Engenharia Química – COPPE – UFRJ – Rio de Janeiro, RJ, 2007.

SEGEL, I. H. **Enzyme Kinetics**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1975.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNAN, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends Biotechnology**, v. 23, p. 193-198, 2005.

SERRANO-ARNALDOS, M. et al. Solvent-free enzymatic production of high quality cetyl esters. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 4, p. 641–649, 2016.

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

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, n. 5, p.2674-2679, 2011.

SILVEIRA, S.M. da. **Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda)**. Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 71, n. 3, p. 471-480, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 268-495.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

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

SU, Y. W.; CHAO, S. H.; LEE, M. H.; OU TY; TSAI, Y. C. Inhibitory effects of citronellol and geraniol on nitric oxide and prostaglandin E₂ production in macrophages. **Planta Medica.**, v. 76, n. 15, p. 1666-71, 2010.

SUN W. J, ZHAO H. X; CUI, F. J; LI, Y. H; YU, S. L; ZHOU Q. D-isoascorbyl palmitate: lipase-catalyzed synthesis, structural characterization and process optimization using response surface methodology. **Chemical Central**, v.7, p.114–126, 2013.

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

TABART, J.; DOMMES, J.; EVERS, D.; KEVERS, C. Ascorbic acid, phenolic acid, flavonoid, and carotenoid profiles of selected extracts from *Ribes nigrum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4763–4770, 2011.

TIMUNG, R.; BARIK, C. R; GOUD, V. V; PUROHIT, S. Composition and anti-bacterial activity analysis of citronella oil obtained by hydrodistillation: Process optimization study. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 178-188, 2016.

Rosanna Tarkany Basting; Humberto Moreira Spindola; Leila Servat; Nubia de Cassia Almeida Queiroz; Ilza Maria Oliveira Sousa; Rogério Grando; Vanessa Helena da Silva Sousa; Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues; João Ernesto de Carvalho; Mary Ann Foglio. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – Unicamp (Brasil). **Composição e formulação a base de extratos/óleos essenciais de *Pterodon pubescens* benth. e *Cordia verbenacea* dc, e usos**. BR n. WO 2016187682 A1, 28 maio 2015, 1 dez. 2016, 2016.

VARMA, M. N.; PARAG, A. D.; MADRAS, G. Synthesis of biodiesel in supercritical alcohols and supercritical carbon dioxide. **Fuel**, v. 89, n. 7, p. 1641–1646, 2010.

VIDA, J.B., CARVALHO JÚNIOR, A.A. de, VERZIGNASSI, J.R. Primeira ocorrência de ferrugem em capim-limão causada por *Puccinia cymbopogonis* no Brasil. **Summa Phytopathologica**. v. 32, n. 1, p. 89-91, 2006.

VIOLLON, C.; CHAUMONT, J. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, n. 128, p. 151–153, 1994.

VISHAKHA, V. K.; ARUSHI, P.; VIKESH, G.L.; VIRENDRA, K.R. Synthesis of isobutyl propionate using immobilized lipase in a solvent free system: Optimization and kinetic studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 143-149, Jan. 2013.

Voet D.; Voet J.D. Bioquímica, Artmed, São Paulo, (2006)

XU, Y.; DU, W.; LIU, D. Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.32, p. 241-245, 2005.

ZANNETTI, M.; DALCANTON F.; De ARAUJO P.H.H.; de MELLO M.M.J.; de OLIVEIRA D.; FIORI M.A.; RIELLA H.G.; TERNUS Z.R.; Microbiological characterization of pure geraniol and comparison with bactericidal activity of the cinnamic acid in gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Microbial Biochemical Technology**, [S.l.], v. 07, n. 04, p.186-193, 2015.

ZANETTI, M.; CARNIEL, T.C.; De ARAUJO, P.H.H.; De OLIVEIRA, D.; De OLIVEIRA, V.J.; FIORI, M.A.; RIELLA, H.G.; VALÉRIO, A. Synthesis of geranyl cinnamate by lipase-catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S.l.], abr. 2016.

ZHANG, B.; CAO, F; CHEN, D; CUI, Z; LI, W; LV, C; MIAO, F; ZHOU, L. Ethyl cinnamate derivatives as promising high-efficient acaricides against *Psoroptes cuniculi*: Synthesis, bioactivity and structure-activity relationship. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 63, p. 255-262, 2015.

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.

YADAV, Ganapati D. e SHINDE, Somnath D. Synergism of Microwave Irradiation and Immobilized Lipase Catalysis in Synthesis of 4,8-dimethylnon-7-en-1yl (2E)-3- phenylpro-2-enolate. **International Review Of Chemical Engineering**, [S.l.], v. 4, n. 6, p.589-596, 2012

YADAV, G.D.; RAHUMAN, M.S.M.M. Cation-Exchange Resin-Catalysed Acylations and Esterifications in Fine Chemical and Perfumery Industries. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 5, p. 706-713, 2002.

YU, D.; FANG, X.; MA, D.; TIAN, LI.; WANG, L.; WANG, Z.; WU, H.. Microwave assisted fatty acid methyl ester production from soybean oil by Novozym 435. **Green Chemistry**, v. 12, p. 844-850, 2010.

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.; CHEN, N; ZHANG, D. H; ZHANG, J. Y; ZHI, G. Y. High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **Food Chemistry**, v. 190, p. 629-633, 2016.

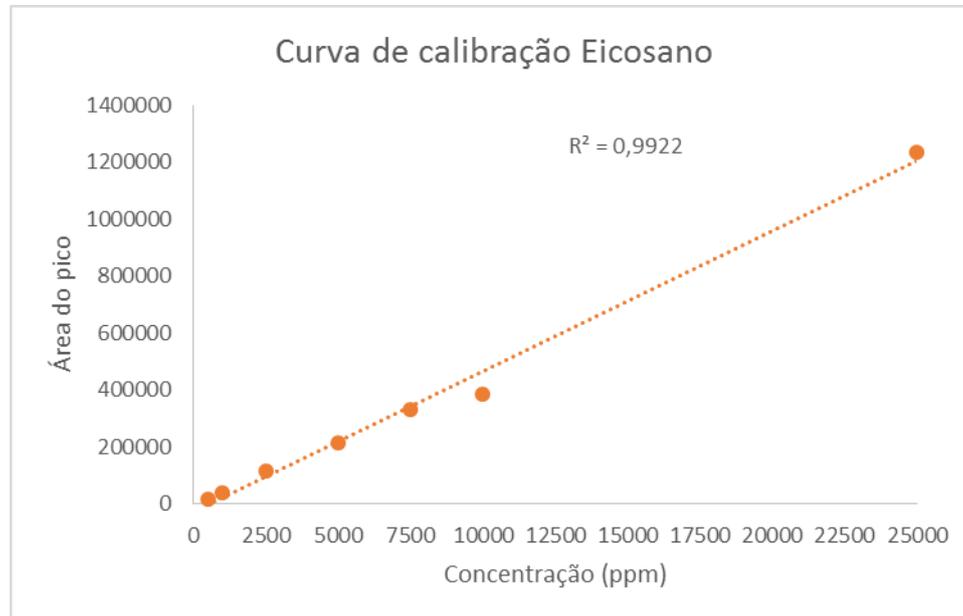
WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Activities and Volatile Constituents of Various Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. California. p. 1737, 2007.

WAGHMARE.; G.V; CHATTERJI, A, RATHOD, V.K. Kinetics of Enzymatic Synthesis of Cinnamyl Butyrate by Immobilized Lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.183(3), p.792-806, 2017.

WISEMAN, D. A.; WERNER, S. R.; CROWELL, P. L. Cell Cycle Arrest by the Isoprenoids Perillyl Alcohol, Geraniol, and Farnesol Is Mediated by p21Cip1 and p27Kip1 in Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.320, n.3, p. 1163-1170, 2007.

9. Apêndice

Apêndice 1 Curva de Calibração com eicosano

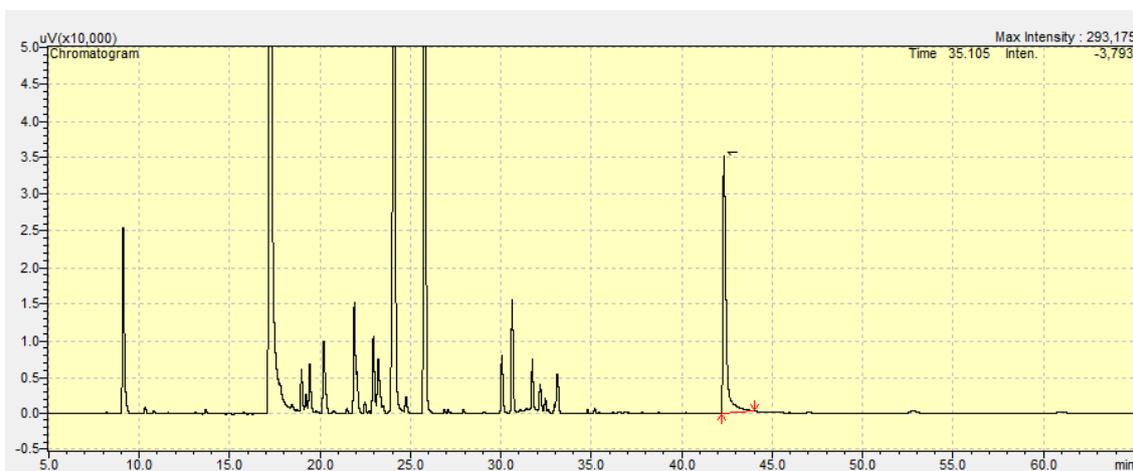


Apêndice 2 Cromatograma do óleo essencial de citronela



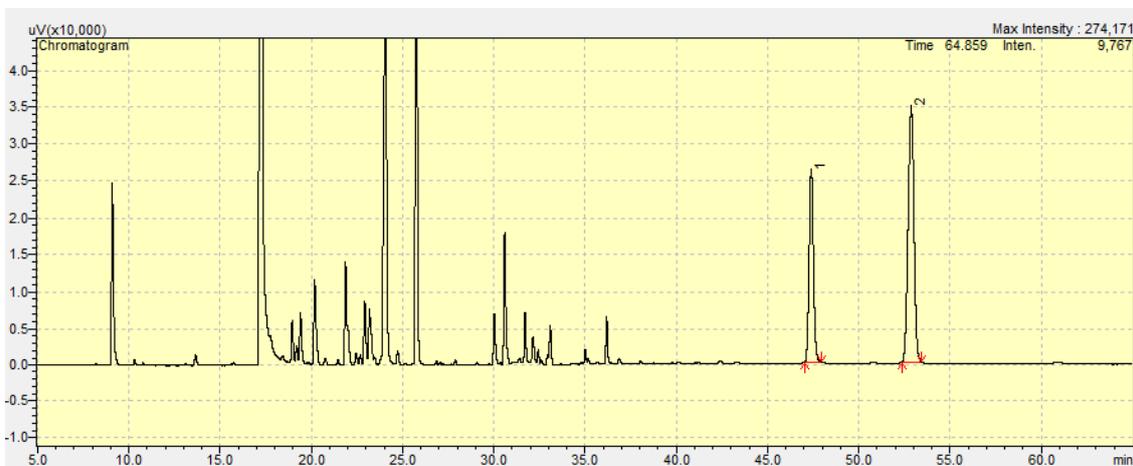
Onde, 1 representa o composto citronelol e 2 o composto geraniol

Apêndice 3 Cromatograma da mistura reacional de óleo essencial de citronela com ácido cinâmico, no tempo reação de 0 hrs



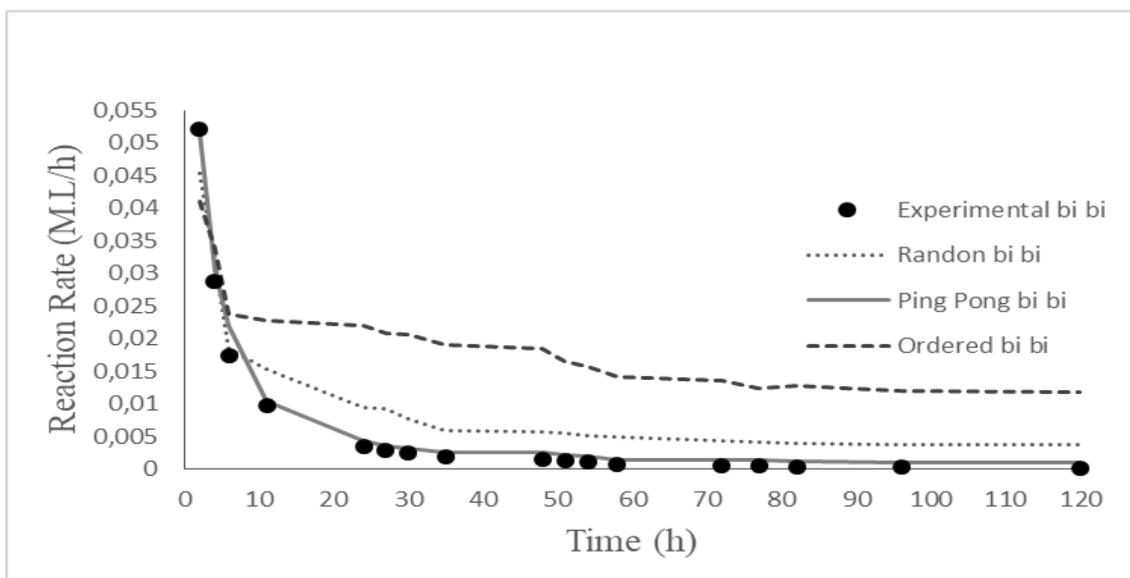
Onde, 1 representa o composto ácido cinâmico

Apêndice 4 Cromatograma da mistura reacional de óleo essencial de citronela com ácido cinâmico, ao final da reação 120 hrs, nas condições de 60 °C, 125 rpm, 10 % de enzima e razão molar 1:3 (ácido:álcool)

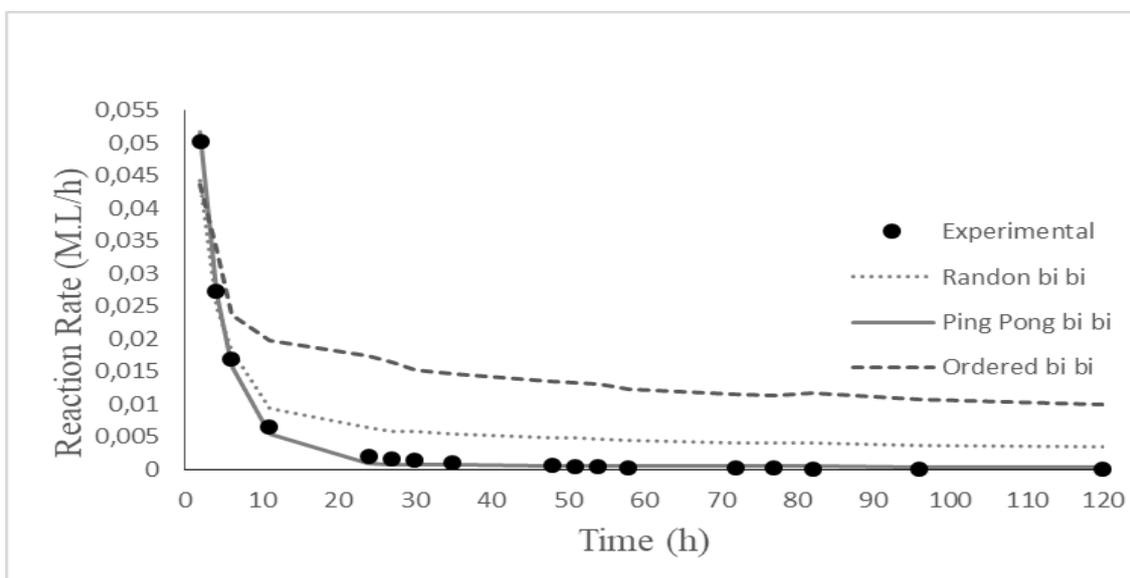


Onde: 1 representa o composto cinamato de citronelila e 2 cinamato de geranila.

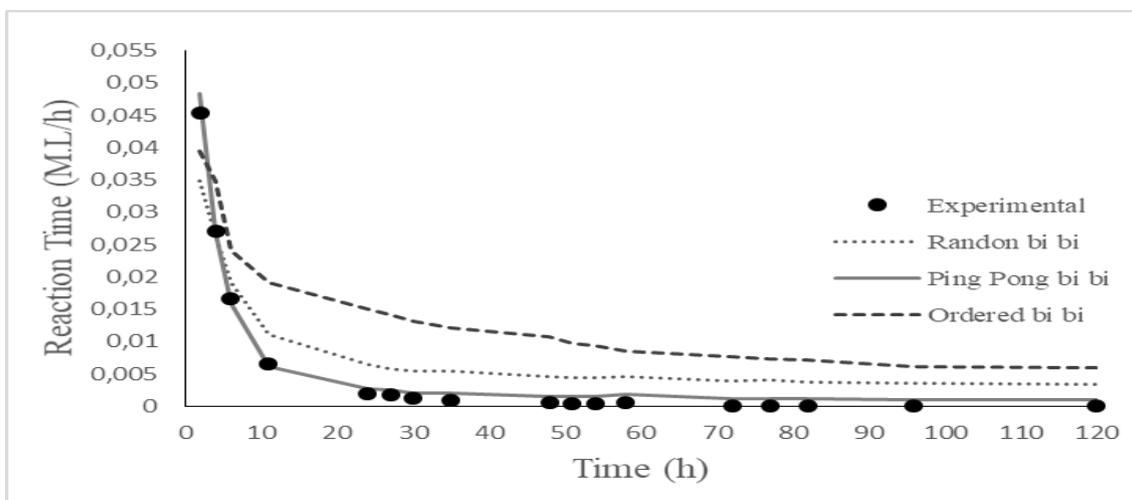
Apêndice 5 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de catalizador (70 °C/10 % enzima/ 125rpm e 1:3), para o geraniol.



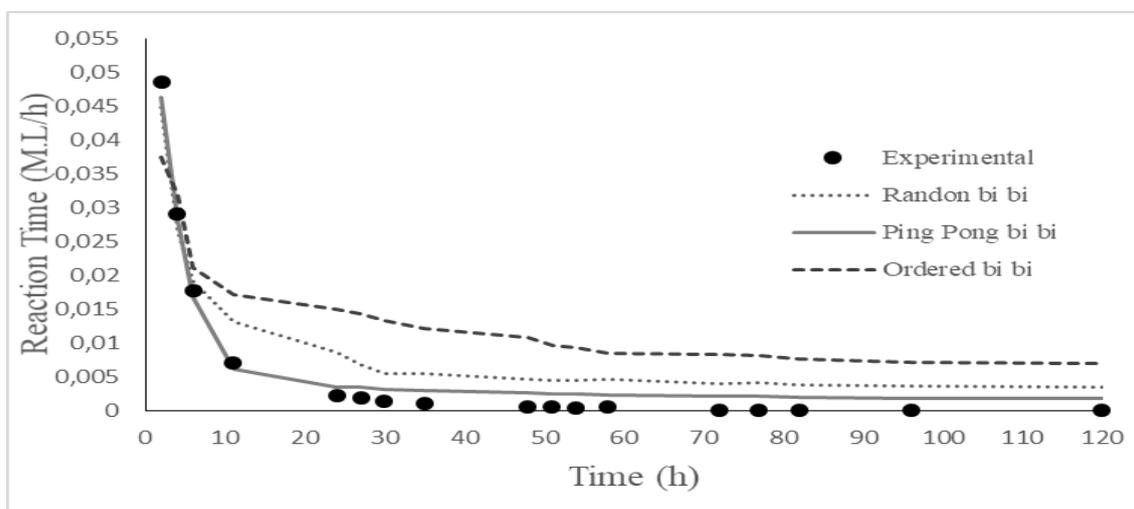
Apêndice 6 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de temperatura (60 °C/10 % enzima/ 125 rpm e 1:3), para o geraniol.



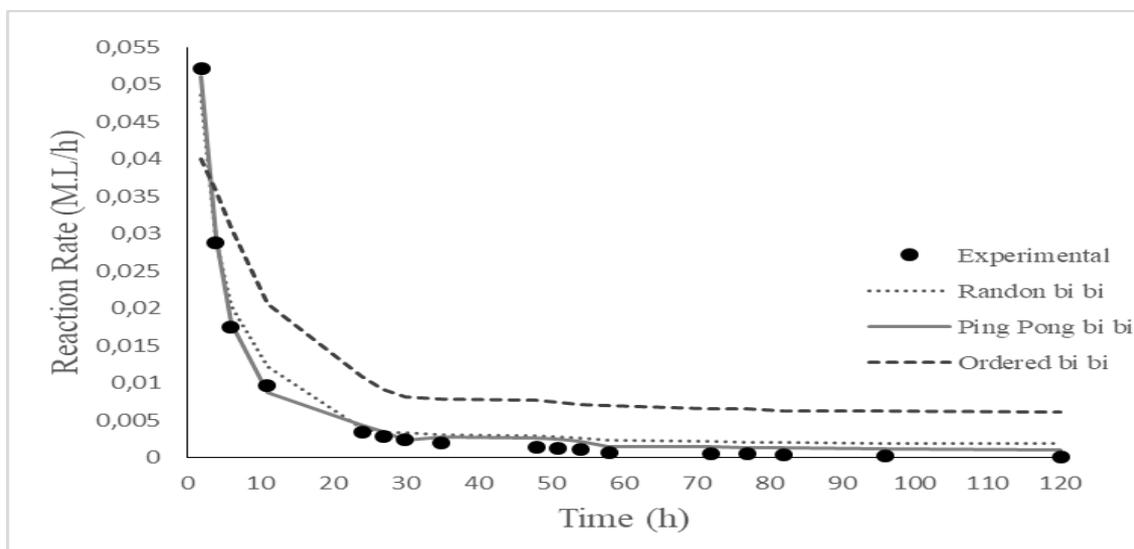
Apêndice 7 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de agitação (60 °C/ 10 % enzima/ 50 rpm e 1:3), para o geraniol.



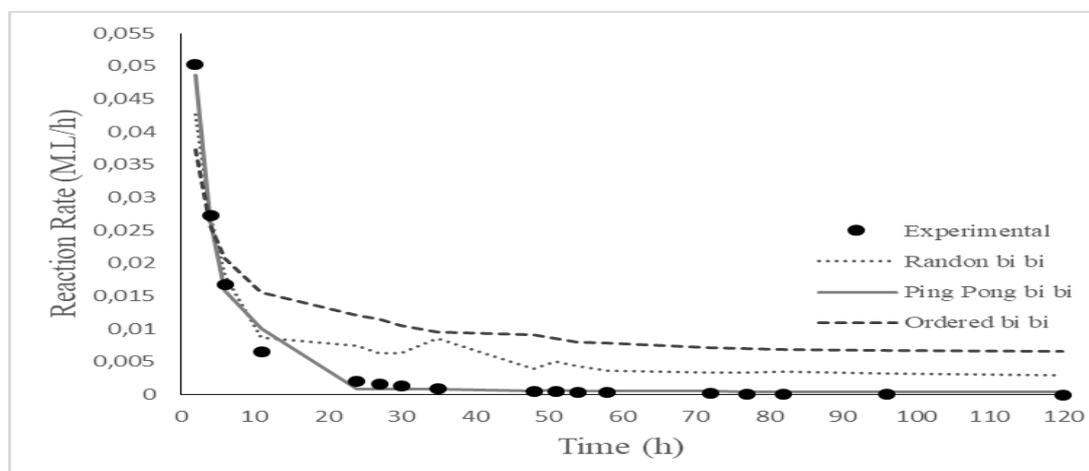
Apêndice 8 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de razão molar (60 °C/ 10 % enzima/ 50 rpm e 1:3), para o geraniol.



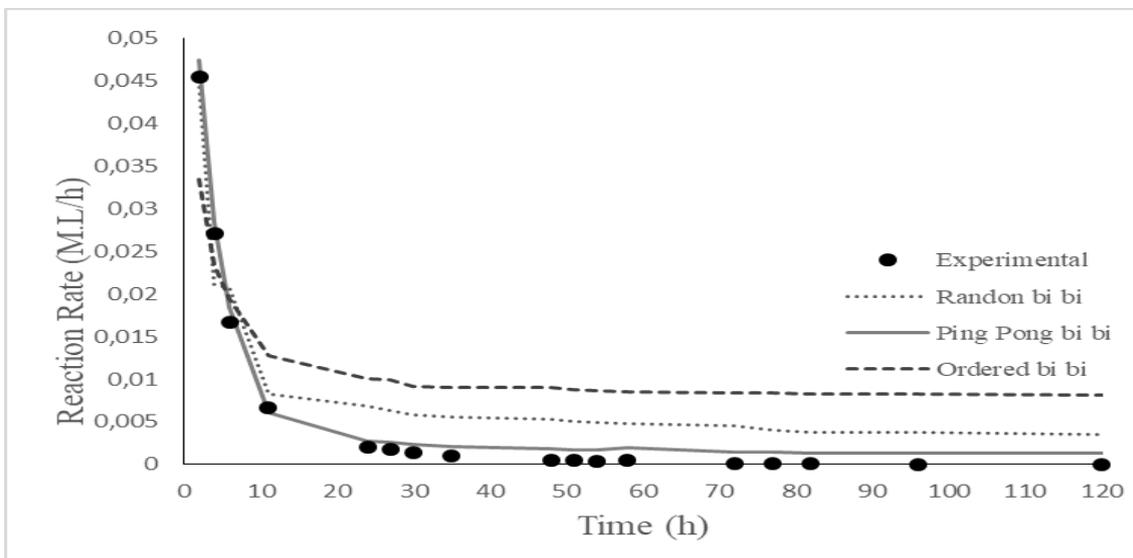
Apêndice 9 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de catalizador (70 °C/10 % enzima/ 125rpm e 1:3), para o citronelol



Apêndice 10 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de temperatura (60 °C/10 % enzima/ 125 rpm e 1:3), para o citronelol



Apêndice 11 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração de agitação (60 °C/ 10 % enzima/ 50 rpm e 1:3), para o citrônolol.



Apêndice 12 Curvas comparativas da condição ótima de variação da concentração da razão molar (60 °C/ 10 % enzima/ 50 rpm e 1:3), para o citrônolol.

