

Priscila Sayuri Shiki

**PRODUÇÃO DE BENZOATO DE BENZILA POR ROTA
ENZIMÁTICA EM MEIO ORGÂNICO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau
de Mestra em Engenharia Química.
Orientador: Prof. Dr.^a Débora de
Oliveira
Coorientador: Dr. Lindomar Lerin

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Priscila Sayuri, Shiki

Produção de Benzoato de Benzila por Rota Enzimática em Meio Orgânico / Priscila Sayuri Shiki ; orientadora, Débora de Oliveira ; coorientador, Lindomar Lerin. Florianópolis, SC, 2018.

76 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Esterificação enzimática. 3. Lipase. 4. Benzoato de benzila. I. De Oliveira, Débora. II. Lerin, Lindomar. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

**Produção de Benzoato de Benzila por Rota Enzimática em
Meio Orgânico**

por

Priscila Sayuri Shiki

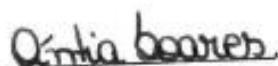
Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, na área de **Concentração de Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.



Prof.ª Dr.ª Débora de Oliveira
orientadora



Dr. Lindomar Alberto Lerin
coorientador



Prof.ª Dr.ª Cíntia Soares
coordenadora

Banca Examinadora:



Dr.ª Manuella Balen



Prof.ª Dr.ª Mara Cristina Picoli Zenevitz

Florianópolis, 11 de junho de 2018.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Hatilo e Nair, pelo incentivo e apoio
vindo de vocês e por serem fonte de
inspiração em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Hatilo Shiki e Nair A. I. Shiki pelo apoio e por sempre acreditarem nos meus sonhos.

A professora orientadora Débora de Oliveira pelo aprendizado e por acreditar em meu potencial, estando sempre disposta a compartilhar seus conhecimentos.

Ao coorientador Lindomar Lerin pela paciência, valiosa coorientação e por repassar seus conhecimentos.

Aos colegas do grupo LABSIN/LABMASSA, em especial ao Édipo Almeida, Márcia Michele F. F. Salim e Vódice A. Feisther, pela amizade, companheirismo e apoio.

A amiga Cecília Lenzi pela parceria, apoio mútuo e por compartilhar bons momentos nessa etapa da minha vida.

Aos amigos Carlos R. S. de Oliveira, Luís A. Lourenço e Tarcísio W. Leal, pela grande amizade, por compartilhar momentos especiais e principalmente pela grande ajuda na realização deste trabalho.

Aos amigos Gabriela Damaceno e Julian L. Farrapeira, pela amizade, alegrias compartilhadas quando moramos juntos e por me inspirarem a sempre correr atrás dos meus sonhos.

As amigas Juliana Amorim, Laiz Souza e Letícia Zarpellon pela grande amizade, companheirismo e grande apoio na finalização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, pelo suporte físico e acadêmico deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao LABSIN/LABMASSA, pela infraestrutura laboratorial disponibilizada.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos.”
(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

Com a crescente utilização de tecnologias limpas no setor industrial pode-se dizer que os compostos obtidos por síntese enzimática são considerados naturais e, portanto, configuram um processo sustentável, bem como, apresentam aplicações em indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosmética. Neste trabalho, foi avaliada a síntese enzimática do benzoato de benzila (BB) utilizando as lipases imobilizadas comerciais Novozym 435[®] e Lipozyme RM IM. Um estudo cinético prévio foi realizado visando determinar o tempo de reação (24 h) e a concentração de enzima (10 % baseado na massa total dos substratos). Um planejamento fatorial completo 2² foi proposto para avaliar o efeito da razão molar e da temperatura na conversão. Para a Novozym 435[®] a máxima conversão (32 %) foi obtida a 60 °C, utilizando uma razão molar de 1:5 (álcool benzílico para anidrido benzóico). Já para a Lipozyme RM IM, a conversão máxima de 51 % foi obtida a 40 °C e 1:5 (álcool benzílico para anidrido benzóico). A análise de variância (ANOVA) mostrou um efeito significativo positivo sobre a razão molar ($p < 0,05$). Os biocatalisadores apresentaram atividade enzimática até 5 ciclos de uso, porém com perda na conversão em produto. A purificação do benzoato de benzila ocorreu por meio de cromatografia em coluna aberta contendo sílica gel como fase estacionária e fase móvel uma mistura acetato de etila e ciclohexeno (1:14 v/v). Por fim, foi observada a ação antimicrobiana moderada para *Staphylococcus aureus* (CIM = 0,05 mg· μ L⁻¹).

Palavras-chave: Esterificação enzimática. Lipase. Benzoato de benzila.

ABSTRACT

According to the increasing demand for clean technology in the industrial sector, the compounds obtained by enzymatic processes are considered natural and constitute a sustainable process for food, pharmaceutical, and cosmetic industries. In this study, the enzymatic synthesis of benzyl benzoate was evaluated using the commercial immobilized lipases Novozym 435® and Lipozyme RM IM. Previously, a kinetic study was carried out to determine the reaction time (24 h) and enzyme concentration (10 % based on the mass of substrates). A 2² full factorial design was proposed to evaluate the effect of molar ratio and temperature on conversion. For the Novozym 435® maximum conversion (32 %) was achieved at 60 °C, applying a molar ratio of 1:5 (benzilic alcohol for benzoic anhydride). Maximum conversion of 51 % was obtained for Lipozyme RM IM at 40 °C and 1:5 (benzilic alcohol for benzoic anhydride). Analysis of variance (ANOVA) showed a significant and positive effect on the molar ratio for the process ($p < 0,05$). The biocatalysts demonstrated enzymatic activity up to 5 cycles of use, with product conversion loss. Benzyl benzoate purification was carried out through open-column chromatography containing silica gel as stationary phase, and mobile phase at a 1:14 ratio mixture of ethyl acetate for cyclohexene (v/v). Moderate antimicrobial action against *S. aureus* (MIC = 0,05 mg· μ L⁻¹) was obtained.

Keywords: Enzymatic esterification. Lipases. Benzyl benzoate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Reação de síntese do benzoato de benzila.....	33
Figura 2- Fluxograma esquemático do procedimento experimental adotado no estudo.....	36
Figura 3 - Câmara incubadora com agitação orbital utilizada para a síntese enzimática do benzoato de benzila.....	40
Figura 4 - Cromatógrafo gasoso utilizado para análise da concentração do benzoato de benzila.....	42
Figura 5- Fluxograma esquemático para o teste de reuso das enzimas utilizadas na síntese do benzoato de benzila.....	44
Figura 6 - Cromatografia em Coluna de Adsorção utilizada para o processo de purificação do Benzoato de Benzila.....	45
Figura 7- Fluxograma esquemático para purificação do benzoato de benzila.....	46
Figura 8- - Cinética para produção de benzoato de benzila. Condições reacionais: temperatura de 60 °C, razão molar 1:1 (AB:AnB), agitação de 150 rpm, concentração da enzima de 10 % [E] (p/p substratos) e 1 mL de terc-butanol.....	50
Figura 9a - Efeito da concentração da Novozym 435 [®] na cinética de conversão em benzoato de benzila. Condições reacionais: temperatura de 60 °C, razão molar 1:2,5 (AB:AnB), agitação de 150 rpm, concentração da enzima de 10 % [E] (p/p substratos) e 1mL de terc-butanol.....	52
Figura 10 - Superfície de resposta para produção de benzoato de benzila utilizando Novozym 435 [®] em função da temperatura e razão molar.....	57
Figura 11- Superfície de resposta para produção de benzoato de benzila utilizando Lipozyme RM IM em função da temperatura e razão molar.....	57
Figura 12- Ciclos de utilização das lipases Novozym 435 [®] e Lipozyme RM IM sobre a produção de benzoato de benzila.....	59
Figura 13- Atividade antimicrobiana utilizando a técnica de microdiluição em caldo em relação a <i>Staphylococcus aureus</i>	62
Figura 14 - Placa de Petri para avaliação da atividade antimicrobiana contra o <i>Staphylococcus aureus</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Trabalhos reportados na literatura de reações catalisadas por diferentes enzimas de interesse industrial.	28
Tabela 2 - Dados da literatura de estudos envolvendo síntese de ésteres utilizando lipases como biocatalisadores.	31
Tabela 3 - Condição para a síntese do a benzoato de benzila utilizando o Novozym 435® e NS 88011.	40
Tabela 4 - Condição para a síntese do a benzoato de benzila utilizando o Novozym 435® e Lipozyme RM IM.	41
Tabela 5 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2 ² para produção enzimática do benzoato de benzila.	43
Tabela 6 - Testes preliminares para determinação do solvente orgânico.....	49
Tabela 7- Matriz do planejamento experimental fatorial completo de 2 ² realizado com as conversões do benzoato de benzila para as duas enzimas comerciais utilizadas: Novozym 435® e Lipozyme RM IM.	55
Tabela 8 - Análise de variância para a produção de benzoato de benzila utilizando a Novozym 435® e a Lipozyme RM IM para o planejamento fatorial completo.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Álcool Benzílico
AcB	Ácido Benzóico
AnB	Anidrido Benzóico
ANOVA	Análise de variância
BB	Benzoato de Benzila
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CLSI	Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais
CR	Coefficiente de regressão
DMSO	Dietilsulfóxido
RM	Razão molar
UFC	Unidade de formação de colônias
ZSM5	ZeoliteSocony Mobil, sendo “5” a abertura dos poros da zeólita, em Angström

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVOS	24
1.1.1 Objetivo Geral	24
1.1.2 Objetivos Específicos	24
1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	27
2.2 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	29
2.3 LIPASES	29
2.4 BENZOATO DE BENZILA	31
2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 MATERIAL	36
3.1.1 Enzimas	37
3.1.2 Reagentes	37
3.1.3 Equipamentos	39
3.2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS	39
3.2.1 Testes preliminares para determinação do solvente orgânico para a síntese do benzoato de benzila	39
3.2.2 Determinação do tempo reacional	41
3.2.3 Efeito da concentração do biocatalisador na cinética de reação	42
3.2.4 Otimização da produção de benzoato de benzila	42
3.2.5 Reuso das enzimas utilizadas na síntese do benzoato de benzila	43
3.2.6 Purificação do benzoato de benzila	44
3.2.7 Determinação da conversão do benzoato de benzila	46
3.2.8 Avaliação da atividade antimicrobiana	47

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
4.1 TESTES PRELIMINARES PARA DETERMINAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO UTILIZADO NA SÍNTESE DO BENZOATO DE BENZILA.....	49
4.2 DETERMINAÇÃO DO TEMPO REACIONAL PARA PRODUÇÃO DE BENZOATO DE BENZILA	50
4.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA NA SÍNTESE DO BENZOATO DE BENZILA.....	51
4.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BENZOATO DE BENZILA	54
4.5 REUSO DAS ENZIMAS UTILIZADAS NA SÍNTESE DO BENZOATO DE BENZILA.....	58
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	61
5 CONCLUSÕES.....	65
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	66
REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, o estilo de vida saudável vem sendo adotado por um número cada vez maior de pessoas, incluindo principalmente uma alimentação baseada em produtos que oferecem benefícios à saúde. Assim, há uma tendência na preferência por alimentos, ingredientes e aditivos naturais, em especial por parte dos consumidores (MELO et al., 2004). Dessa forma, pelo fato dos compostos obtidos por catálise enzimática serem considerados naturais, promovem grande aceitação por parte do consumidor, agregando maior valor aos produtos que utilizam esses aditivos produzidos biotecnologicamente.

Segundo Paula et al. (2005), dentre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres apresenta-se como uma vertente bastante promissora, em função da importância de diferentes ésteres na vida cotidiana. Esses ésteres podem ser obtidos por três técnicas: extração de fontes naturais, sínteses químicas e enzimáticas. A maioria desses compostos podem ser obtidos diretamente de extração de plantas, porém devido ao alto custo e à pequena quantidade de produto obtido, essa técnica se torna inviável para aplicações industriais. (ROMERO et al., 2007).

O processo biotecnológico apresenta vantagens ambientais, uma vez que os ácidos inorgânicos utilizados geralmente como catalisadores na síntese química são substituídos pelas enzimas que podem ser reutilizadas, acarretando em uma diminuição na geração de resíduos da reação (ROMERO et al., 2007). Além disso, esses processos se mostram como uma alternativa competitiva aos métodos químicos devido à alta eficiência catalítica, condições operacionais brandas e à seletividade dos catalisadores naturais (PIRES-CABRAL et al., 2009), podendo garantir maiores rendimentos em reações com temperaturas próximas da ambiente, dependendo da metodologia e da enzima aplicada, o que proporciona produtos de qualidade, com economia de energia e ausência ou reduzida ocorrência de subprodutos.

Muitos estudos têm demonstrado a obtenção de ésteres sintetizados com altos rendimentos utilizando diversas lipases de origem microbiana (ROMERO et al., 2007; SHIH et al., 2007; DHAKE et al., 2012). Segundo Nogales (2005), as enzimas microbianas quando imobilizadas apresentam vantagens como biocatalisadores em meio orgânico devido à sua alta produtividade, estabilidade, fácil recuperação e reutilização. O campo de obtenção de ésteres por via enzimática tornou-

se promissor e o principal motivador do presente trabalho, que tem como foco a síntese enzimática do benzoato de benzila (BB) a partir do álcool benzílico e anidrido benzóico. O BB é um éster cuja a aplicação é bastante diversificada e antiga, de grande importância no tratamento de doenças, como a escabiose. Foi também usado na Guerra do Vietnã como repelente de carrapatos e ácaros e na medicina veterinária ainda hoje utilizado como escabicida e pediculicida. Suas aplicações vão além, como por exemplo, aditivo de produtos cosméticos e alimentícios (SHARMA et al., 2015).

Com base nesses aspectos, esse trabalho teve como objetivo a otimização da síntese do benzoato de benzila utilizando enzimas comerciais imobilizadas de origem microbiana (Novozym 435® e Lipozyme RM IM), a purificação do produto e a avaliação de sua atividade antimicrobiana.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma tecnologia de produção de benzoato de benzila por esterificação enzimática em modo batelada, bem como o estudo da atividade antimicrobiana.

1.1.2 Objetivos Específicos

Fase I – Produção de benzoato de benzila:

- a) Avaliação do comportamento do anidrido benzóico e álcool benzílico em meio orgânico na síntese enzimática do benzoato de benzila;
- b) Estudo cinético da produção de benzoato de benzila para determinação da condição do planejamento fatorial completo;
- c) Determinar as variáveis que interferem significativamente no processo de produção do benzoato de benzila;

- d) Otimizar a produção de benzoato de benzila na presença de solvente orgânico, utilizando planejamento fatorial completo.

Fase II – Caracterização do benzoato de benzila:

- a) Analisar o processo de purificação do produto;
- b) Avaliar a atividade antimicrobiana.

1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Este trabalho é dividido em cinco capítulos, ordenados de modo a facilitar e fornecer melhor entendimento das atividades desenvolvidas.

O primeiro capítulo descreve o contexto do trabalho, apresentando os principais motivos para o desenvolvimento da pesquisa bem como os objetivos gerais e específicos da proposta.

No Capítulo 2 é apresentado o referencial teórico, mostrando os principais aspectos e importância da síntese enzimática e suas vantagens comparada a síntese química.

São demonstrados no Capítulo 3, a descrição dos procedimentos metodológicos adotados para a análise da produção enzimática do benzoato de benzila utilizando lipases imobilizadas comerciais em meio orgânico.

Os principais resultados obtidos nos estudos da produção do benzoato de benzila na presença de solvente orgânico utilizando enzimas comerciais são abordados e discutidos no Capítulo 4.

No último capítulo são apresentadas as principais conclusões deste trabalho, bem como as sugestões e perspectivas para trabalhos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é realizado uma breve abordagem teórica sobre o estado da arte referente a síntese enzimática dos ésteres e sua importância. Além disso, é apresentado um levantamento bibliográfico sobre a catálise enzimática e suas vantagens, assim como a produção de ésteres utilizando lipases comerciais imobilizadas e sua eficiência. Conforme apresentado na introdução, tendo como base os objetivos elencados para esse trabalho. Por fim, são apresentados os desafios e perspectivas futuras para a síntese enzimática do benzoato de benzila, focando na otimização e viabilidade econômica do processo.

2.1 CATÁLISE ENZIMÁTICA

Para que uma reação química aconteça é necessário que as moléculas dos reagentes atinjam um nível energético suficiente para vencer a energia de ativação, sendo esta uma “barreira” de energia potencial. Quanto menor for esta barreira, mais moléculas dos reagentes terão energia o suficiente para atingir o estado de transição e, portanto, mais rapidamente a reação ocorrerá. Todos os catalisadores, incluindo as enzimas, funcionam diminuindo a demanda energética para que a formação dos produtos seja favorecida, aumentando as taxas de conversão, sem alterar a proporção entre reagentes e produtos (FOGLER, 2012).

Os catalisadores enzimáticos são de origem biológica e são altamente seletivas graças à sua estrutura complexa; cada enzima reage especificamente com um grupo muito restrito de moléculas. Esta característica confere vantagens sobre os catalisadores inorgânicos amplamente utilizados pela indústria. Além disso, as enzimas possuem atividade modulada, permitindo ajuste contínuo da velocidade da reação catalisada. É estabelecido que as enzimas formam um complexo ligado aos substratos (ou reagentes) durante o decurso da sua catálise e antes da libertação dos produtos. Este mecanismo é ilustrado no modelo proposto de Michaelis e Menten (Equação 1), onde a enzima (E) liga-se ao substrato (S) formando um complexo denominado enzima-substrato (ES), transformando o substrato em produto (P). Para que ocorra a catálise enzimática, as moléculas de substratos devem possuir forma adequada para ligarem-se aos sítios ativos da enzima, conferindo especificidade (BORZANI et al., 2001).



Um grande número de enzimas, como lipases, esterases, proteases e celulases, obtidas de animais, plantas e micro-organismos podem ser usadas como biocatalisadores. Na tabela 1 são apresentados dados reportados da literatura referentes às reações catalisadas por enzimas na síntese de diferentes compostos. Entre todas as classes de enzimas, as lipases estão atualmente atraindo muita atenção. Elas são uma classe muito importante de biocatalisadores para reações biotecnológicas, produzidas por muitas espécies de leveduras, bactérias e fungos filamentosos.

Tabela 1- Trabalhos reportados na literatura de reações catalisadas por diferentes enzimas de interesse industrial.

Enzima	Substrato	Produto	Fonte
Fosfolipase	Fosfatidilcolina	Nucleosídeo	(GUDIÑO et al., 2018)
Lipase	Fitosterol	Fitoesterillipoato	(WANG et al., 2018)
Lipase	Xilose	Ésteres de xilose	(MÉLINE et al., 2018)
	ϵ -caprolactona	Policaprolactona	(VENERAL et al., 2018)
Lipase	Ácidos graxos	Biodiesel	(XU et al., 2017)
	Triptofano	Derivados metílicos de triptofano	(WINNICKA; KAŃSKA, 2018)
Celulase	Resíduo de espiga de milho	Gluconato de sódio	(HAN et al., 2018)
	Nitrato de prata	Nanopartículas de prata	(MISHRA; SARDAR, 2015)
Protease	Ácido butírico	Glicinamida	(SAHU et al., 2016)
Esterase	Álcool isoamílico	Acetato de isoamila	(TORRES et al., 2009)

2.2 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A reação de esterificação ocorre pela condensação de álcool e ácido carboxílico livre, obtendo-se como produto dessa reação a formação de éster e água. O meio reacional de esterificação se dá em presença de diferentes solventes ou na ausência deles e em baixos teores de água, e por ser uma reação lenta, é natural a utilização de catalisadores (MACRAE, 1983; RAJENDRAN et al., 2009).

Como catalisadores dessa reação, enzimas podem ser empregadas em substituição de outros catalisadores inorgânicos por permitirem que os processos sejam conduzidos em condições mais brandas de pH, temperatura e pressão (DALLAVECHIA et al., 2004; SCHMID; VERGER, 1998; KUMARI et al., 2009).

A síntese enzimática empregando lipases para obtenção do éster vem apresentando diversas vantagens, sendo uma delas, o maior rendimento na formação de produto de qualidade e menor formação de subprodutos utilizando menos energia em relação aos processos convencionais (KUMARI et al., 2009).

A inconveniência do processo que emprega enzimas é manter garantida durante todo o processo a atividade enzimática, que depende diretamente de fatores, tais como, a natureza do substrato e do solvente utilizando, temperatura, pH e quantidade de água (KUMARI et al., 2009).

Segundo Yahya et al. (1998) e Graebin et al. (2012), embora a água presente na síntese de esterificação seja importante para a manutenção da atividade e estabilidade da enzima, estudos têm mostrado que a quantidade de água deve ser mínima, isso porque em excesso ela diminui a atividade enzimática, como está apresentado no trabalho de Ognjanovic et al. (2009). De acordo com Graebin et al. (2009), o rendimento da esterificação enzimática pode ser melhorado quando esta ocorre na presença do excesso de álcool.

2.3 LIPASES

As lipases geralmente são encontradas na natureza e sua fonte de origem pode ser: microbiana, animal e vegetal (KRISHNA et al., 2002). Pelo fato de conseguir reconhecer uma variedade grande de substratos e

capacidade de catalisar um elevado número de reações importantes, as lipases são de grande interesse para as indústrias de cosméticos (KHAN et al., 2015; KOSHIKEN et al., 1996). Além dessa aplicação, essas enzimas também podem atuar na indústria oleoquímica, na indústria têxtil (melhorar a qualidade dos tecidos), indústria de detergentes, síntese de biodiesel, entre outras (MELO et al., 2004).

Uma das razões dessa enzima ser considerada um potencial biotecnológico é a alta seletividade, o que pode ocasionar uma redução no custo do processo, podem ser trabalhadas em condições brandas, temperaturas variando entre 30 °C à 70 °C, alta estabilidade em solventes orgânicos, não necessitam da presença de cofatores, alta enantioseletividade e alta especificidade em relação ao substrato, ocasionando um elevado rendimento no processo. Além de obterem produtos biodegradáveis, o que corrobora na redução da geração de resíduos (CASTRO et al., 2004).

De acordo com Castro et al. (2004), as lipases são um importante grupo de biocatalisadores que atuam nas reações de esterificação com elevada enantioseletividade. Um exemplo são as quebras das ligações éster de triacilgliceróis por hidrólise, além disso são enzimas capazes de catalisar a reação reversa em condições com baixo teor de água, tal como a formação de ligações ésteres utilizando um meio reacional contendo ácido carboxílico e álcool.

Apesar das vantagens dos processos biocatalíticos comparado aos processos químicos convencionais, a utilização de lipases pode apresentar um alto custo principalmente quando empregado enzimas livres. Como alternativa para esse problema, o uso de enzimas imobilizadas permite a reutilização, o que torna o processo enzimático economicamente viável (WAGHMARE et al., 2015).

Além do reciclo da enzima e melhora no controle da reação, essa imobilização atua na redução da inibição enzimática, melhora a seletividade ou especificidade e evita a contaminação microbiana (GARCIA et al., 2011).

Dados mencionados na literatura sobre esterificações e transesterificações utilizando lipases na síntese de diferentes ésteres estão representados na Tabela 2. As lipases são os biocatalisadores mais comumente utilizados na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia, pela capacidade de reconhecer uma variedade de substratos e um grande número de reações (KHAN et al., 2015).

Tabela 2 - Dados da literatura de estudos envolvendo síntese de ésteres utilizando lipases como biocatalisadores.

Lipases	Produto	Conversão (%)	Fonte
<i>Rhizopus</i> sp	Laurato de isoamila	88	(MACEDO et al., 1997)
<i>Alcaligenes</i> sp	Propionato de isoamila	72	
	Acetato de isopropila	82	
<i>Candida antarctica</i>	Butirato de etila	73	(NOGALES et al., 2005)
<i>Mucor miehei</i>	Acetato de vinila	100	(MAJUMDER et al., 2006)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Acetato de butila	80	(SALAH et al., 2007)
<i>Candida rugosa</i> <i>Geotrichum candidum</i>	Butirato de isoamila	80	(ARAGÃO et al., 2009)
<i>Candida antarctica</i>	Palmitato de ascorbila	27	(LERIN et al., 2011)
<i>Candida antarctica</i>	Carbonato de glicerol	99	(WAGHMARE et al., 2015)
<i>Candida antarctica</i>	Ascorbiloleato	90	(BALEN, 2016)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Benzoato de eugenila	66	(MANAN et al., 2018)

2.4 BENZOATO DE BENZILA

O benzoato de benzila (BB) é uma das mais antigas drogas usadas para o tratamento da escabiose e este é considerado como a opção de tratamento preferida para a mesma (BACHEWAR et al., 2009). A terapia tópica de benzoato de benzila tem sido amplamente utilizado em adultos e também em forma diluída para crianças, bebês e para mães que amamentam (HENGGE et al., 2006). A aplicação tópica do benzoato de

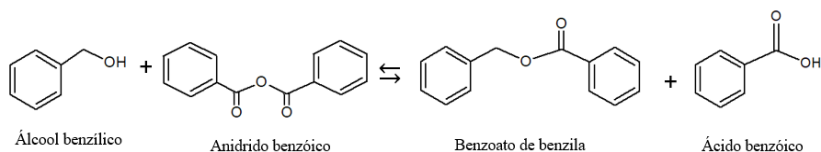
benzila mostrou-se mais eficaz e segura para o tratamento de escabiose do que para a ivermectina por via oral (LY et al., 2009). Conforme Sharma et al. (2015), a formação de nanopartículas contendo benzoato de benzila em microemulsão a base de hidrogel pode ser um promotor eficiente para o aumento da sua disponibilidade no local da ação, devido a excelente capacidade de liberação lenta e nenhuma irritação, o que propicia uma maior probabilidade para aplicação clínica.

Para conhecimento, a sarna é uma infecção de pele altamente contagiosa e é uma das doenças de pele pruriginosas mais comuns (CHOSIDOW et al., 2000). É comum em todo o mundo, mas é mais visível nas áreas com falta de saneamento e superlotação. A predominância global da sarna é de cerca de 300 milhões de casos, com variações maiores entre os países (HENGGE et al., 2006; TAPLIN et al., 1990). É uma doença parasitária negligenciada e um problema de saúde dos países em desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou números alarmantes de incidência de 9,7-13 % na Índia, 23-30 % em crianças com menos de 6 anos em favelas em Bangladesh, 4,3 % no Camboja, e 0,7 % no Malawi. Esta doença é causada pelo ácaro *Sarcoptes scabiei*, que se enterra na pele e consome epiderme e o soro do hospedeiro, resultando em inflamação, reações de tipo alérgico, e pruriginosas (GUGGISBERG et al., 1998; MCCARTHY et al., 2004).

A escabiose é um problema social enorme na América do Sul. Essa doença é hiperendêmica em inúmeras comunidades carentes no Brasil, país mais afetado pela doença na América do Sul, e é comumente associado com considerável morbidade e do sistema de saúde pública enfraquecimento do continente (HEUKELBACH et al., 2003).

Geralmente a síntese de ésteres na indústria é baseada na esterificação química direta de ácidos orgânicos (cadeia carbônica curta ou longa) com álcool na presença de catalisadores inorgânicos em temperatura elevadas (± 100 °C). Porém, essas reações químicas não são seletivas, além de consumirem uma grande quantidade de energia. Logo, neste trabalho, foram empregadas as enzimas como biocatalisadores na síntese do benzoato de benzila. A Figura 1 ilustra a reação de síntese do éster que será apresentado nesse estudo.

Figura 1 - Reação de síntese do benzoato de benzila



Fonte: Autor (2017).

As variáveis de processo (razão molar, temperatura, agitação e tempo) possuem um papel importante no rendimento da síntese de ésteres benzílicos por meio de esterificações e/ou transesterificações. Além disso, o produto secundário da reação é a água, exceto quando utilizado anidrido, em que o produto secundário será um ácido, como é o caso do presente trabalho, onde foi utilizado o anidrido benzóico e álcool benzílico como substratos (Figura 1). Para atingir os rendimentos ótimos destes ésteres aromáticos, deve-se ter conhecimento dos efeitos individuais e das interações das variáveis do processo na síntese de ésteres benzílicos. Essas análises dos efeitos das variáveis serão vistas no capítulo 4.

2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

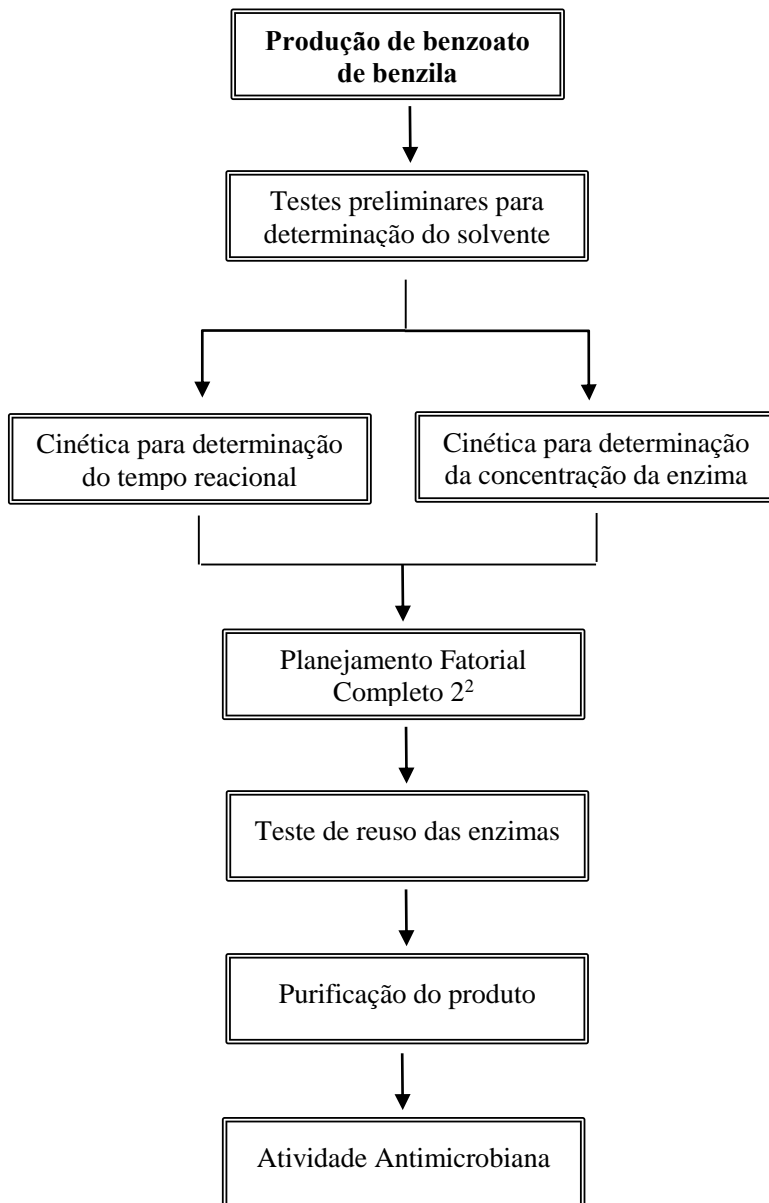
Diante do exposto neste capítulo, nota-se que a produção enzimática de ésteres tem sido muito bem investigada. Porém, poucos estudos mencionam a síntese de ésteres benzílicos. Os trabalhos encontrados abordam a transesterificação do álcool benzílico com acetato de vinila (MAJUMDER et al., 2006; DHAKE et al., 2012; GARLAPATI et al. 2013), benzoato de metila (GRYGLEWICZ et al., 2000) e acetato de butila (TEWARI et al., 2004). Entretanto, nenhum a respeito da síntese enzimática de éster benzílico realizada por esterificação direta de álcool e anidrido. Ainda em consideração do levantamento bibliográfico alguns estudos têm demonstrado a obtenção de ésteres de aroma sintetizados com altos rendimentos utilizando diversas lipases de origem microbiana (ROMERO et al., 2007; SHIH et al., 2007). Além disso, as lipases imobilizadas possuem uma grande vantagem em relação a sua reutilização no processo e contribuição em sua viabilidade econômica.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo principal avaliar a produção de benzoato de benzila empregando lipases comerciais imobilizadas e atividade antimicrobiana do BB.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados, assim como os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental deste trabalho, visando a otimização da conversão da reação de esterificação enzimática para produção de benzoato de benzila (BB) em meio orgânico. Para ilustrar melhor o procedimento experimental adotado nesta pesquisa, na Figura 2 apresenta um fluxograma esquemático.

Figura 1- Fluxograma esquemático do procedimento experimental adotado no estudo



3.1 MATERIAL

3.1.1 Enzimas

Como biocatalisador de origem microbiana foram utilizadas as seguintes lipases comerciais:

- a) Novozym 435® - produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa;
- b) Lipozyme RM IM - sintetizada a partir do *Rhizomucor miehei*, imobilizada em resina fenólica.
- c) NS 88011 - produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa.

As enzimas foram gentilmente cedidas pela Novozymes (Araucária – Brasil).

3.1.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes:

I. Substratos empregados na reação de esterificação:

- a) Ácido acético glacial PA (Synth);
- b) Ácido benzóico PA (99 %, Lafan);
- c) Anidrido benzóico (98 %, Acros);
- d) Álcool Benzílico PA (Neon);
- e) Álcool Butílico Terciário PA (99 %, Vetec);

- f) Anidrido acético (Vetec).

II. Para análise em Cromatografia Gasosa (FID):

- a) Acetato de etila (Sigma Aldrich, 99,7 %).

III. Para a purificação do benzoato de benzila:

- a) SilicaGel 60 (Macherey - Nagel);
- b) Acetato de etila(Sigma Aldrich, 99,7 %);
- c) Cicloexeno (Nuclear, 99 %);
- d) Cromatofolha de alumínio para CCD com Silicagel (Macherey-Nagel);
- e) Ácido acético glacial PA (Synth).

IV. Para a atividade antimicrobiana:

- a) Corante Resazurina (7- hidroxí-3H-phenoxazin-3-oná10-óxido);
- b) Álcool Etilico (Neon, 99 %);
- c) Cloreto de Sódio (Lafan, 99 %);
- d) Ágar Muller Hinton (KASVI);
- e) Dimetilsulfóxido (DMSO);
- f) Placa de Petri;
- g) Ponteiras para micropipetas;
- h) Eppendorfs de 2 mL;

- i) Tubos de ensaio de 5 mL;
- j) Microplacas com 96 poços.

Todos os reagentes foram utilizados sem nenhuma etapa prévia de tratamento ou purificação.

3.1.3 Equipamentos

Este trabalho foi realizado com o auxílio dos seguintes equipamentos:

- a) Balança analítica (Mettler Toledo, AB204-S);
- b) Câmara Incubadora com Agitação Orbital (Excella, E25);
- c) Cromatografia gasosa FID (Shimadzu – GC-17A);
- d) Rotaevaporador (IKA, RV 8);
- e) Gabinete Revelador Cromatográfico (Dist, Modelo GRC - 03);
- f) Câmara de Fluxo Laminar Vertical (Pachane, Pa 310 ECO);
- g) Autoclave Vertical AV (Phoenix Luterco);
- h) Estufa de Cultura (Fanem, Modelo 002 CB).

3.2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Testes preliminares para determinação do solvente orgânico para a síntese do benzoato de benzila

Com intuito de definir o solvente orgânico que obtivesse uma maior conversão do benzoato de benzila, realizou-se o teste com três

solventes orgânicos: tolueno, iso-octano e ciclohexano. Como substratos foram utilizados o álcool benzílico (AB) e ácido benzóico (AcB), assim como biocatalisadores: Novozym 435[®] e NS 88011. Todos os experimentos foram realizados em agitador orbital (Figura 3) com agitação constante de 150 rpm, com tempo de reação de 24 h e condição reacional ilustradas na Tabela 3. Para cada amostra coletada foi medido a conversão do éster desejado por meio da cromatografia gasosa.

Tabela 3 - Condição para a síntese do a benzoato de benzila utilizando o Novozym 435[®] e NS 88011.

Variáveis	Valores
Razão molar (AB: AcB)	5:1
Concentração de enzima (%) (m/m)	10
Temperatura (°C)	60

Figura 2 - Câmara incubadora com agitação orbital utilizada para a síntese enzimática do benzoato de benzila



Fonte: Autor (2017).

3.2.2 Determinação do tempo reacional

Com o objetivo de definir o tempo da reação com as enzimas comerciais imobilizadas: Novozym 435[®] e Lipozyme RM IM, um estudo cinético prévio foi realizado utilizando como substrato o álcool benzílico (AB) e o anidrido benzóico (AnB) com agitação constante de 150 rpm e condição reacional ilustradas na Tabela 4. Com base no trabalho de Balen et al. (2016), o solvente que obteve um melhor resultado em relação a taxa de conversão do éster estudado foi o terc-butanol, para esse estudo todas as reações foram realizadas na presença deste solvente (1 mL). As alíquotas foram retiradas periodicamente, nos tempos de 6, 12, 18, 24, 36 e 48 h. A conversão de benzoato de benzila foi determinada por meio de análise em cromatografia gasosa (CG), ilustrado na Figura 4.

Tabela 4 - Condição para a síntese do a benzoato de benzila utilizando o Novozym 435[®] e Lipozyme RM IM.

Variáveis	Valores
Razão molar (AB: AnB)	1:1
Concentração de enzima (%) (m/m)	10
Temperatura (°C)	60

Figura 3 - Cromatógrafo gasoso utilizado para análise da concentração do benzoato de benzila



Fonte: Autor (2017).

3.2.3 Efeito da concentração do biocatalisador na cinética de reação

Com o objetivo de definir a concentração de enzima utilizada para a avaliação do efeito da temperatura e da razão molar na produção do benzoato de benzila (item 2.5), realizou-se um estudo cinético utilizando a Novozym 435[®] e a Lipozyme RM IM, onde os intervalos para retirada de cada amostra foram de 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, 36 e 48 h de reação. A concentração para cada enzima variou em: 2,5, 5 e 10 % (m/m), mantendo fixa a temperatura (60 °C), a agitação (150 rpm) e a razão molar (AB:AnB) (1:2,5). Para cada amostra foi avaliada a conversão em benzoato de benzila por meio do CG. Assim como nas esterificações citadas anteriormente, às reações foram realizadas em câmara incubadora com agitação orbital.

3.2.4 Otimização da produção de benzoato de benzila

Para avaliar o efeito da temperatura e da razão molar entre os substratos (álcool benzílico e anidrido benzoico) na produção de benzoato

de benzila, foi realizado o Planejamento Fatorial Completo 2^2 com triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos (Tabela 5) para a Novozym 435[®] e a Lipozyme RM IM estudada. As reações foram conduzidas em incubadora shaker em condições de agitação e concentração de enzima constantes de 150 rpm e 10 % (m/m), respectivamente, durante 24 h na presença de terc-butanol como solvente orgânico.

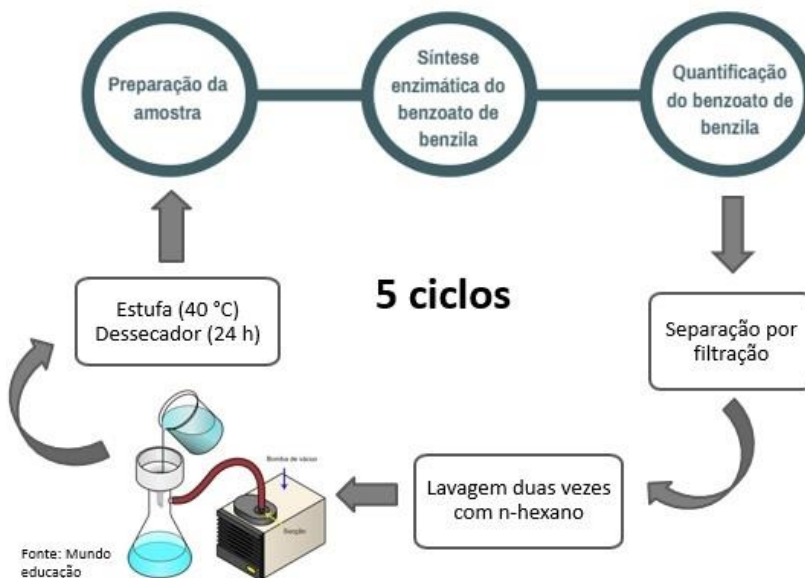
Tabela 5 - Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2^2 para produção enzimática do benzoato de benzila.

Níveis	Temperatura (°C)	Razão Molar (AB: AnB) (mol/mol)
-1	40	1:1
0	50	1:2,5
1	60	1:5

3.2.5 Reuso das enzimas utilizadas na síntese do benzoato de benzila

Com a finalidade de analisar a estabilidade da Novozym 435[®] e Lipozyme RM IM, foram realizadas sínteses enzimáticas a temperatura de 40 °C, agitação de 150 rpm, concentração de enzima 10 % (m/m) e razão molar de 1:5 (AB: AnB) na presença de terc-butanol. O tempo de reação para as duas enzimas foi fixado 24 h. Com base no procedimento utilizado por Lerin et al. (2011), após o término de cada ciclo, o catalisador foi separado por filtração. Em seguida, o mesmo foi lavado duas vezes com n-hexano e filtrado a vácuo. O biocatalisador foi mantido em estufa a 40 °C durante uma hora e colocado em um dessecador por 24 h. Esse procedimento foi repetido após o término de cada ciclo para ambas as enzimas (Figura 5). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Ao término de cada batelada foi determinada a conversão em benzoato de benzila por cromatografia gasosa.

Figura 4- Fluxograma esquemático para o teste de reuso das enzimas utilizadas na síntese do benzoato de benzila



Fonte: Autor (2018).

3.2.6 Purificação do benzoato de benzila

A purificação do benzoato de benzila foi realizada por meio de cromatografia em coluna de adsorção (Figura 6) contendo Sílica Gel como fase estacionária. A fase móvel, por sua vez, consistiu em uma mistura de acetato de etila e ciclohexeno na razão de 1:14 (v/v) acidificada com ácido acético (2 %, v/v). O procedimento consistiu na aplicação de 1 mL de amostra bruta na parte superior da coluna com eluição constante da fase móvel a fim de separar os componentes da amostra. Em períodos preestabelecidos coletaram-se amostras em frascos de 2 mL, nos quais analisaram-se as frações do BB através de cromatografia em camada delgada (CCD). O benzoato de benzila foi determinado por meio do valor da razão de frente quando comparado a um padrão da substância. Após separadas as alíquotas que possuíam maior conversão em benzoato de benzila, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Por fim, fez-se a

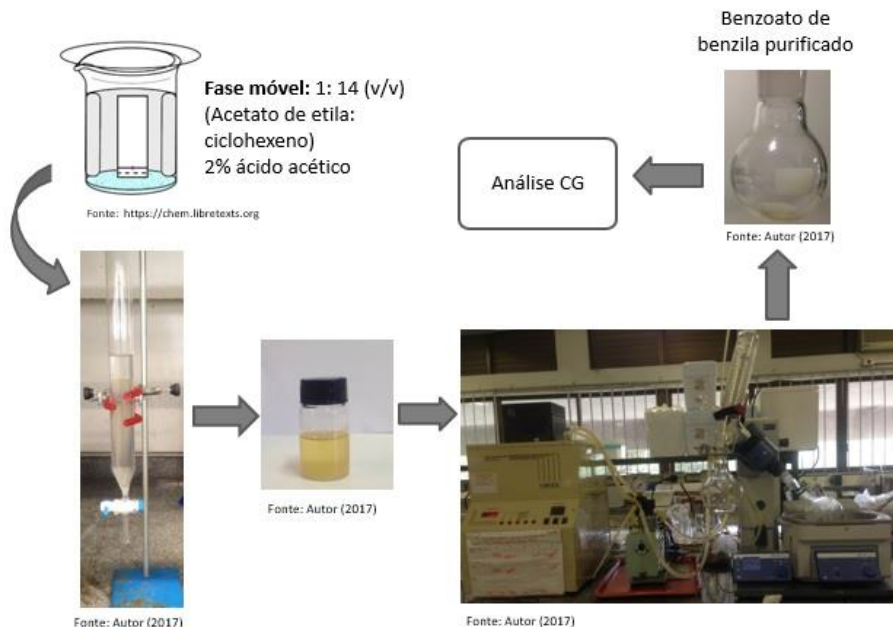
análise em CG para comprovar a purificação do produto. Na Figura 7 pode-se observar o procedimento do teste de purificação do benzoato de benzila.

Figura 5 - Cromatografia em Coluna de Adsorção utilizada para o processo de purificação do Benzoato de Benzila.



Fonte: Autor (2017).

Figura 6- Fluxograma esquemático para purificação do benzoato de benzila.



Fonte: Autor (2017).

3.2.7 Determinação da conversão do benzoato de benzila

A quantificação do éster produzido foi realizada com base no trabalho de Chiaradia et al. (2012), no qual utilizou-se a técnica de cromatografia em fase gasosa por meio de um equipamento da Shimadzu modelo GC-17A com detector FID. As análises foram realizadas utilizando uma coluna capilar de sílica fundida INOWAX (30 m x 0,25 mm i.d.), 0,25 µm de espessura de filme, com a seguinte programação de temperatura: 100-135 °C (3 °C.min⁻¹), 135-250 °C (10 °C.min⁻¹), 250 °C (15 min), temperatura do injetor 250 °C, detector 275 °C. O modo de injeção selecionado foi o split com razão de 1:100, utilizando o N₂ como gás de arraste. O volume amostral foi de 0,4 µL de amostra diluída em acetato de etila (1:10).

A conversão do benzoato de benzila foi realizada ao acompanhar a redução na área do sinal do agente limitante (álcool benzílico), assim como o pico do BB.

3.2.8 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana do benzoato de benzila purificado foi avaliada contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922). Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, com microplacas de 96 poços, conforme recomendado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2012). As amostras de benzoato de benzila purificado, diluídas à $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em dimetilsulfóxido (DMSO) 10 %, foram colocadas nos primeiros micropoços, e em seguida transferidas para os micropoços adjacentes, os quais contêm caldo Müller-Hinton (MH), com o objetivo de se obter diluição seriada de ordem dois. O inóculo bacteriano (0,1 mL) foi utilizado à concentração de 5×10^8 unidades formadoras de colônia por mL ($UFC \cdot \text{mL}^{-1}$) do microorganismo a ser testado. Alguns poços de cada microplaca foram reservados para realização dos controles negativos contendo solução de DMSO. Já como controle positivo, as bactérias em estudo foram incubadas com o antibiótico comercial amoxicilina ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em solução de DMSO). As microplacas foram incubadas aerobiamente a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, por 24 h. Após a incubação, o crescimento bacteriano foi verificado adicionando-se 10 μL em cada micropoço de uma solução de resazurina (7- hidroxí- 3H- phenoxazin-3-ona10-óxido) ($6,75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) (SARKER et al., 2007) observando-se a presença do “botão” bacteriano avermelhado no fundo de cada micropoço. A CIM foi definida como a última concentração do éster capaz de inibir o crescimento bacteriano.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 TESTES PRELIMINARES PARA DETERMINAÇÃO DO SOLVENTE ORGÂNICO UTILIZADO NA SÍNTESE DO BENZOATO DE BENZILA

Nesta etapa foram realizados experimentos com intuito de escolher o solvente orgânico a ser aplicado ao longo do estudo. Foram testados os solventes orgânicos (Tabela 6) com agitação constante de 150 rpm, tempo de reação de 24 h, razão molar (AB: AcB) (5:1), concentração de enzima de 10% e temperatura fixa de 60 °C. Porém nenhum deles forneceu um resultado significativo para a síntese enzimática do benzoato de benzila. Essas conversões são mostradas na tabela abaixo.

Tabela 6 - Testes preliminares para determinação do solvente orgânico

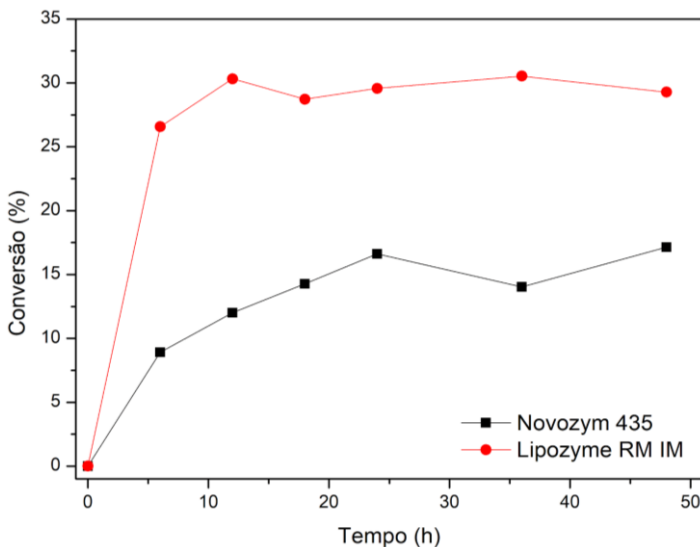
Solvente	Razão Molar (mol/mol) (AcB: AB)	Conversão (%) Sem solvente		Conversão (%) Com solvente	
		Novozym 435®	Novozym NS 88011	Novozym 435®	Novozym NS 88011
		Tolueno	1:1	-	-
Tolueno	1:5	-	-	-	4
Isooctano	1:1	-	-	-	-
Isooctano	1:5	-	-	-	-
Ciclohexano	1:1	1	1	1	-
Ciclohexano	1:5	-	-	-	9

Segundo Balen et al. (2016), o solvente que se mostrou promissor na otimização das condições para a conversão do produto na síntese enzimática foi o terc-butanol. Logo, com base nos testes preliminares e estudos reportados pela literatura o solvente escolhido foi o álcool butílico terciário.

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEMPO REACIONAL PARA PRODUÇÃO DE BENZOATO DE BENZILA

A fim de determinar o tempo reacional para a síntese do benzoato de benzila foi realizada uma cinética prévia utilizando as enzimas Novozym 435® e a Lipozyme RM IM. Para tal, 1 mL de terc-butanol entrou em contato com 1:1 (mol/mol) de álcool benzílico e anidrido benzóico e 10 % (m/m) de enzima. As amostras foram submetidas a agitação em um agitador orbital a 150 rpm e temperatura de 60 °C. Foram retiradas as amostras em tempos preestabelecidos até 48 h de reação (item 3.2.3). Para cada intervalo mediu-se a conversão do produto. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 8.

Figura 7 - - Cinética para produção de benzoato de benzila. Condições reacionais: temperatura de 60 °C, razão molar 1:1 (AB:AnB), agitação de 150 rpm, concentração da enzima de 10 % [E] (p/p substratos) e 1 mL de terc-butanol.



Segundo os resultados da cinética enzimática com a Novozym 435® e a Lipozyme RM IM, percebeu-se que os intervalos de maiores conversões para a Novozym 435® foram no tempo de 24 h (16,6 %) e 48 h

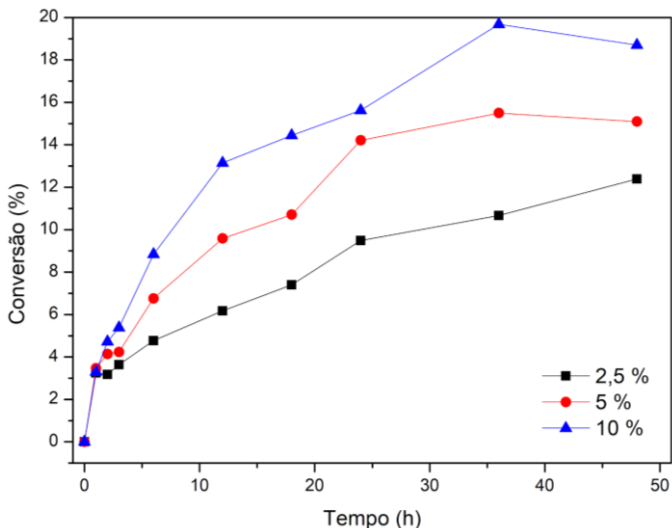
h (17,2 %). Comparando a conversão do benzoato de benzila para os dois tempos de reação citados, não houve uma diferença expressiva, por isso optou-se por utilizar para os próximos experimentos o menor tempo de reação (24 h). Já para a Lipozyme RM IM a máxima conversão foi em 12 h (30,3 %). No entanto, a fim de definir um tempo de reação a ser utilizado no planejamento fatorial completo para as duas enzimas, o intervalo estabelecido foi de 24 h, uma vez que para a Lipozyme RM IM a diferença na conversão obtida no tempo de 12 h e 24 h foi de aproximadamente 1 %.

4.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA NA SÍNTESE DO BENZOATO DE BENZILA

Com o intuito de avaliar o efeito da concentração de enzima foi realizado um estudo cinético, onde mantiveram-se fixas: temperatura de 60 °C, agitação de 150 rpm e razão molar de 1:2,5 (mol/mol) (AB:AnB) variando a concentração de enzima em 2,5, 5 e 10 % (m/m). Essa avaliação foi realizada para as enzimas Novozym 435® e Lipozyme RM IM.

Segundo a Figura 9a, a condição de ensaio que obteve a melhor performance na produção de benzoato de benzila foi a utilizada em uma maior concentração de Novozym 435® (10 % (m/m)). Neste gráfico pode-se observar que o aumento do teor de catalisador utilizado pode afetar positivamente a síntese de benzoato de benzila.

Figura 8a - Efeito da concentração da Novozym 435® na cinética de conversão em benzoato de benzila. Condições reacionais: temperatura de 60 °C, razão molar 1:2,5 (AB:AnB), agitação de 150 rpm, concentração da enzima de 10 % [E] (p/p substratos) e 1mL de terc-butanol.

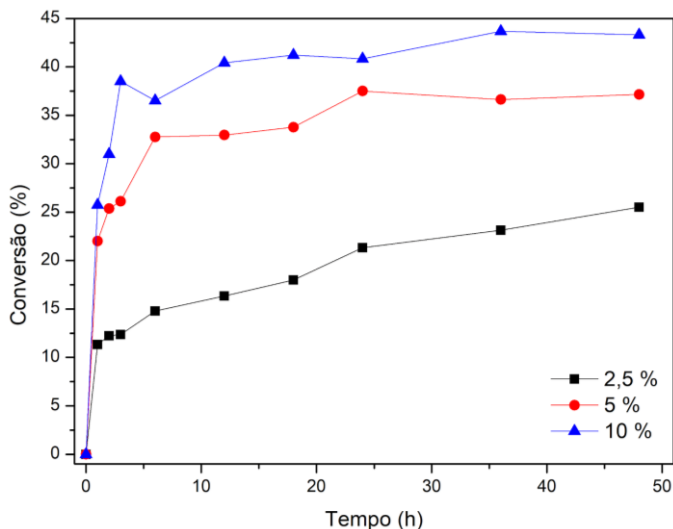


O mesmo experimento foi realizado para analisar o efeito da concentração de Lipozyme RM IM para a produção de benzoato de benzila. As condições reacionais (temperatura, agitação e razão molar) para esses ensaios foram as mesmas utilizadas para a Novozym 435®. A Figura 9b ilustra os dados experimentais e os resultados obtidos na avaliação cinética.

Assim como na cinética da Novozym 435®, a Lipozyme RM IM teve comportamento similar, onde a maior conversão do éster desejado foi obtida com a maior concentração de enzima (10 % (m/m)). Uma possível explicação para o aumento da conversão em benzoato de benzila utilizando a máxima concentração de enzima para esse experimento é a maior disponibilidade de sítios ativos na reação, aumentando a conversão do produto desejado.

O mesmo comportamento foi observado no estudo de Kirumakki, Nagaraju e Narayanan (2004), onde aumentou-se o teor de catalisador (zeólita ZSM5) de 0,5 para 1,5 g·g⁻¹ resultando um aumento da conversão de 38 para 75 % de acetato de benzila durante 1 h de reação.

Figura 9b - Efeito da concentração da Lipozyme RM IM na cinética de conversão em benzoato de benzila. Condições reacionais: temperatura de 60 °C, razão molar 1:1 (AB:AnB), agitação de 150 rpm, concentração da enzima de 10 % [E] (p/p substratos) e 1 mL de terc-butanol.



Na Figura 9b observou-se que para a concentração de 10 % (m/m) de Lipozyme RM, a conversão em benzoato de benzila para o tempo reacional de 36 h e 48 h permaneceu constante. O mesmo pôde ser observado no estudo de Paroul et al. (2011), onde foi testado o efeito da concentração da enzima na síntese de geranyl oleato. Os autores observaram uma influência significativa do teor de enzima na conversão do éster desejado. Obteve uma conversão de 98,9 % a uma concentração de 10 % (m/m) de enzima em 30 min de reação; a partir de 3 h de reação, notou-se uma estabilidade na conversão do produto.

Já na Figura 9a, comparando os tempos reacionais de 36 e 48 h, para a concentração de Novozym 435[®] de 10 % (m/m), observou-se uma leve queda na conversão em benzoato de benzila. Essa redução na conversão do produto se deve ao fato de acima de uma certa quantidade de catalisador, o número de sítio ativo pode ser superior ao necessário para o substrato, o que pode provocar a inibição da reação (LAROQUE et al., 2015).

Segundo os estudos de Karra-Châabouni et al. (2006) uma outra hipótese que pode ser considerada para a diminuição no percentual de produto é a quantidade excessiva de enzima no meio reacional que faz com que tenha uma aglomeração das partículas das enzimas imobilizadas, diminuindo a exposição de sítio ativo aos substratos, ocasionando assim uma distribuição não homogênea das enzimas. Além disso, as moléculas de enzima na superfície externa de tais partículas são expostas a altas concentrações de substrato, mas o transporte de massa dentro da partícula do biocatalisador pode ainda limitar a concentração de substratos no interior da partícula. Menores atividades de uma fração de biocatalisador reduzem a eficiência por unidade de massa do biocatalisador, corroborando para uma redução na conversão do produto.

4.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BENZOATO DE BENZILA

Após definido o tempo da reação e a concentração de enzima para síntese do benzoato de benzila, foi analisada a influência dos fatores temperatura e razão molar dos substratos no processo. Para isso, foi realizado o planejamento experimental fatorial completo 2^2 , sendo que foram fixados a concentração da enzima (10 % (m/m)), agitação (150 rpm) e tempo reacional (24 h). Todos os ensaios foram realizados na presença de terc-butanol. A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento com os valores de cada ensaio para a conversão em benzoato de benzila.

Levando em consideração os resultados da Tabela 7, verificou-se que a maior conversão do produto empregando a Novozym 435[®] foi obtida na condição 7, correspondendo a uma temperatura de 60 °C e razão molar de 1:5 (AB: AnB), com conversão em benzoato de benzila de 32,1 %. Já para a Lipozyme RM IM, o ensaio 6 conduziu à máxima conversão em benzoato de benzila (51 %) em uma temperatura de 40 °C e razão molar de 1:5 (AB:AnB).

Os resultados do planejamento experimental foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 8) para avaliar o efeito de variáveis na reação de esterificação. A partir dessa análise, foi realizado um teste *F*, que indica se existem diferenças significativas entre as médias. Os valores encontrados neste teste foram $F_{\text{tabelado}} = 4,34$ e $F_{\text{calculado}}$ de aproximadamente 22 para ambas as enzimas e como o $F_{\text{calculado}}$ foi 5 vezes maior que o F_{tabelado} o que significa que existem diferenças estatisticamente significantes entre as médias. Também foi possível verificar o percentual do modelo de variância total,

avaliado pelo R^2 , que apresentou valor de 0,90 para as reações com as duas enzimas.

Tabela 7- Matriz do planejamento experimental fatorial completo de 2^2 realizado com as conversões do benzoato de benzila para as duas enzimas comerciais utilizadas: Novozym 435[®] e Lipozyme RM IM.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão Molar (mol/mol) (AB: AnB)	Conversão (%)	
			Novozym 435 [®]	Lipozyme RM IM
1	-1 (40)	-1 (1:1)	10	21,1
2	-1 (40)	-1 (1:1)	9,5	20,7
3	1 (60)	-1 (1:1)	8,6	21,8
4	1 (60)	-1 (1:1)	10,1	20,1
5	-1 (40)	1 (1:5)	22,5	50,5
6	-1 (40)	1 (1:5)	21,9	51
7	1 (60)	1 (1:5)	32,1	48,9
8	1 (60)	1 (1:5)	23	49,1
9	0 (50)	0 (1:2,5)	19	43,4
10	0 (50)	0 (1:2,5)	19,4	44,1
11	0 (50)	0 (1:2,5)	19,4	45,1

Tabela 8 - Análise de variância para a produção de benzoato de benzila utilizando a Novozym 435[®] e a Lipozyme RM IM para o planejamento fatorial completo.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	$F_{\text{calculado}}$
Novozym 435 ^{®*}				
Regressão	498.5	3	166.16	22.33
Resíduo	52.14	7	7.44	
Total	550.64			
Lipozyme RM IM**				
Regressão	1679,27	3	559,75	22,62
Resíduo	173,21	7	24,74	
Total	1852,48			

Coefficiente de regressão: $R^2 = 0,90$; $F_{\text{tabelado}(0,95;3;7)} = 4,34$; nível de significância $p = 95\%$.

Com base na ANOVA, pode-se concluir que o modelo gerado através dos resultados da Tabela 8 é preditivo. Com esses resultados foi possível gerar os modelos demonstrados pelas Equações 2 e 3. Portanto, os modelos codificados expressos pelas Equações 2 e 3 foram usados para gerar as curvas de contorno (Figura 10 e 11). Os resultados do planejamento experimental da Tabela 7 sugerem que é conveniente usar a razão molar de álcool benzílico para anidrido benzóico de 1:5 e temperatura de 60 °C para obter a mais alta conversão (32,1 %) utilizando a Novozym 435® (Tabela 7, ensaio 7), já para a Lipozyme RM IM as maiores conversões (51 %) foram atingidas usando razão molar de 1:5 e temperatura de 40 °C (Tabela 7, ensaio 6).

$$Y_1 = 17,77 + 1,23 * T + 7,66 * RM + 1,43 * T * RM \quad (2)$$

$$Y_2 = 37,80 - 0,42 * T + 14,47 * RM - 0,45 * T * RM \quad (3)$$

Onde: Y_1 é a conversão do benzoato de benzila para a Novozym 435® (%); Y_2 é a conversão do benzoato de benzila para a Lipozyme RM IM (%); T é a temperatura (°C) e RM é a razão molar (álcool para anidrido).

Como pode ser observado nas Figuras 10 e 11, o aumento da temperatura não levou a um aumento na síntese de benzoato de benzila, contudo a razão molar apresentou efeito significativo positivo sobre conversão, permitindo concluir que um aumento da razão molar leva a conversões mais altas de benzoato de benzila, isto pode ser visto na Tabela 7 onde as maiores razões molares estudadas levaram as maiores conversões.

Figura 9 - Superfície de resposta para produção de benzoato de benzila utilizando Novozym 435[®] em função da temperatura e razão molar.

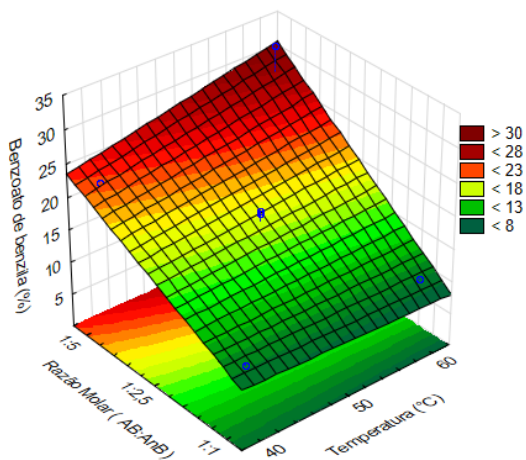
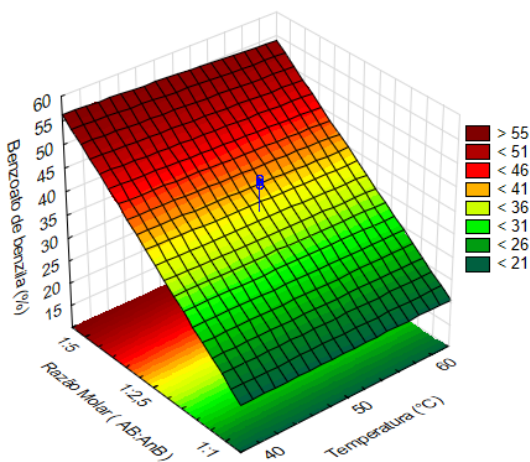


Figura 10- Superfície de resposta para produção de benzoato de benzila utilizando Lipozyme RM IM em função da temperatura e razão molar.



Além disso, como a temperatura não apresentou um efeito significativo nas condições testadas, pode-se utilizar qualquer temperatura dentro do intervalo estudado. Então, a síntese enzimática pode ser conduzida em temperaturas mais amenas, acarretando uma economia no processo de esterificação.

Assim como o presente trabalho, Chiaradia et al. (2012) também observaram que as maiores taxas de conversão de éster de mentol (49,5 e 49,7 %) foram obtidas com altas concentrações de enzima e excesso de anidrido acético. Além disso, observaram que em 6 h de reação somente a razão molar obteve um efeito significativo positivo. O trabalho de Vanin et al. (2014) também analisa os efeitos da temperatura, concentração de enzima e razão molar dos substratos para a síntese de acetato de eugenila utilizando a Novozym 435[®] como biocatalisador. Para esse estudo, a condição que obteve maior conversão (aproximadamente 100 % de produto) foi na razão molar de 5:1 (anidrido acético:eugenol), concentração de enzima de 10 % (m/m) e temperatura de 60 °C. Conforme os resultados estatísticos analisados pela superfície de resposta, observou-se um grande aumento na conversão do éster benzílico em elevados teores de enzima e razão molar dos substratos da reação. Porém não houve um aumento expressivo quando se utiliza uma quantidade de lipase superior a 295 UI, fato que pode estar relacionado com a aglomeração de partículas das enzimas imobilizadas (KARRA-CHÂABOUNI et al., 2006).

Embora nenhum trabalho tenha sido encontrado na literatura para análise de fatores que influenciam na produção de benzoato de benzila empregando enzimas comerciais imobilizadas, existem, além dos trabalhos citados acima, vários outros estudos sobre a análise de quais parâmetros podem impactar na síntese de ésteres empregando lipases como biocatalisadores (LERIN et al., 2011; PAROUL et al., 2011; SILVA et al., 2014; LOSS et al., 2016).

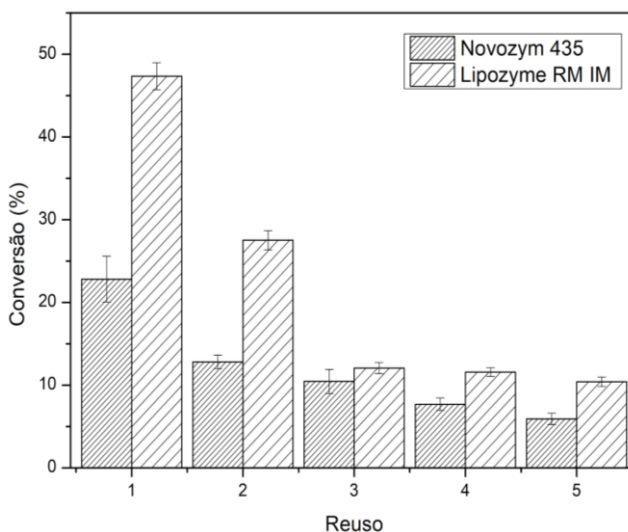
4.5 REUSO DAS ENZIMAS UTILIZADAS NA SÍNTESE DO BENZOATO DE BENZILA

Uma das vantagens na utilização de enzimas comerciais imobilizadas para a síntese de éster é o fato de poder reutilizá-la com intuito de aumentar a viabilidade do processo bem como reduzir a geração de resíduos na reação. Segundo Dhake et al. (2012), o reuso das enzimas é um dos principais aspectos para conseguir aplicar a síntese enzimática

em grande escala. Apesar dessa vantagem, a utilização de enzimas imobilizadas como biocatalisadores na reação ainda é um processo caro, devido ao custo elevado da enzima. Logo, para a aplicação da reutilização da enzima no setor industrial pode se tornar um fator importante para a viabilidade econômica do projeto (LOSS et al., 2016; TRUBIANO et al., 2007).

Assim, o reuso das lipases foi estudado para a síntese do benzoato de benzila na condição de reação otimizada no planejamento de experimentos (Tabela 7). Para esse experimento, a condição que melhor obteve conversão em benzoato de benzila para a Novozym 435® foi o ensaio 7 e para a Lipozyme RM IM foi o ensaio 6. Após o término de cada ciclo (24 h), as enzimas foram recuperadas seguindo o procedimento proposto por Lerin et al. (2011). Esse processo foi realizado para ambas as enzimas. Todos os ensaios foram feitos em triplicata. No final de cada ciclo foi medida a conversão em benzoato de benzila. Foram avaliados 5 ciclos de uso para cada enzima. Os resultados são apresentados na Figura 12.

Figura 11- Ciclos de utilização das lipases Novozym 435® e Lipozyme RM IM sobre a produção de benzoato de benzila.



No decorrer dos ciclos, principalmente do primeiro para o segundo, percebeu-se que para ambas as enzimas houve um declínio em relação ao percentual de éster produzido. Essa diminuição da conversão em benzoato de benzila foi cerca de 40 % se comparados os dois primeiros ciclos para as duas enzimas. Porém, a partir do terceiro ciclo observou-se que a conversão do produto desejado se tornou constante (variação de aproximadamente 2 %).

Segundo Lerin et al. (2011) um dos motivos para a redução da atividade catalítica no decorrer dos ciclos pode ser causado pela desativação da enzima em virtude dos efeitos térmicos e da conversão do produto. Além disso, conforme Gomes et al. (2006) o aumento da temperatura ocasiona um aumento na velocidade de reação por unidade de enzima. Entretanto, a utilização da enzima em uma temperatura elevada durante um tempo prolongado pode acarretar a desativação da enzima, reduzindo a conversão do produto.

O estudo de Lerin et al. (2011) demonstra que os testes de sucessivos ciclos para a reação de ácido ascórbico e ácido palmítico, tendo como biocatalisador a Novozym 435[®] na presença de terc-butanol, mostrou que após 4 ciclos a atividade enzimática residual foi de aproximadamente 100 %, porém do quinto ciclo em diante houve um declínio em relação a atividade enzimática e a conversão do éster desejado.

Loss et al. (2016) também observou um declínio no teste de sucessivos ciclos para a produção de acetato de eugenila utilizando como catalisador a Lipozyme TL IM, onde obteve 94,3 % de conversão para o primeiro ciclo, já para o segundo ciclo 75,2 % e para o terceiro 53,2 %. Essa redução na conversão do éster se repetiu até o quinto ciclo.

Com o objetivo de avaliar a estabilidade da enzima, Majumder et al. (2006) realizaram o teste de reutilização da transesterificação do acetato de benzila empregando a Lipozyme RM IM como biocatalisador em sistema livre de solvente. Os experimentos foram realizados durante 21 ciclos, sendo que em 18 ciclos a atividade residual da enzima permaneceu constante em 100 %.

Os experimentos de reutilização de Yadav et al. (2004) observaram um declínio na conversão de laurato de citroneila após três ciclos utilizando como catalisador a Novozym 435[®] na presença de heptano. Ferraz et al. (2015) também observaram uma redução progressiva na conversão de propionato de geranil utilizando lipase de *Penicillium crustosum* imobilizada em alginato de sódio em sistema livre

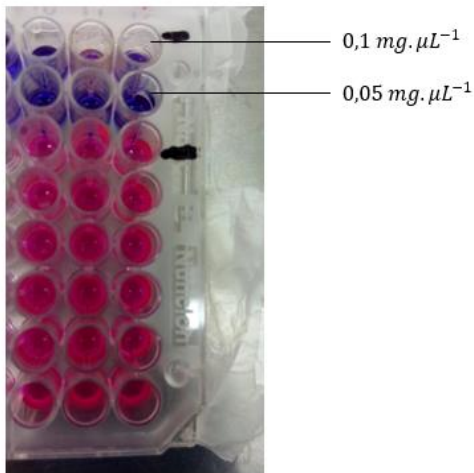
de solvente. Ao todo foram realizados 6 ciclos, sendo que no terceiro para o quarto ciclo a conversão se manteve constante.

Os testes de reutilização de Balen et al. (2016), para a síntese de oleato de ascorbila foram testados a 60 e 70 °C, usando como catalisador a Novozym 435® na presença de terc-butanol com irradiação de microondas. Para esses experimentos, observaram que para ambas as temperaturas houve um forte declínio da conversão do produto a partir do terceiro ciclo, uma vez que foram realizados 6 ciclos.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

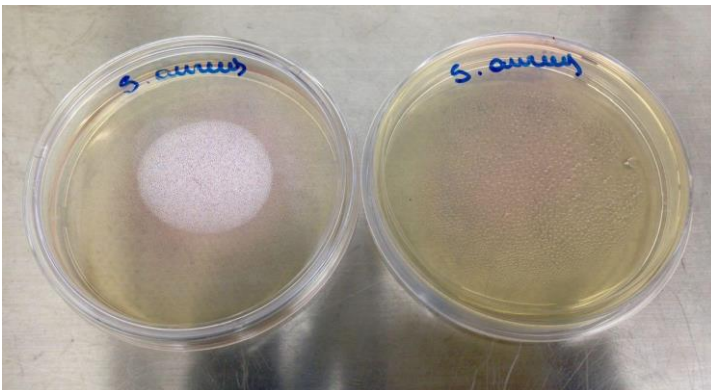
Depois de purificado, o benzoato de benzila foi avaliado em relação à atividade antibacteriana contra as bactérias gram-positiva *Staphylococcus aureus* e gram-negativa *Escherichia coli* através da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando a técnica de microdiluição em caldo. Comparando as técnicas de avaliação da atividade antimicrobiana de difusão de discos com a de microdiluição em caldo, a mesma possui um maior ganho em virtude da economia de espaço, quantidade de reagente utilizado, agilidade nos resultados por conta da quantidade de placas preparadas a partir de uma série de diluições de antimicrobianos, além da quantificação do resultado gerado. A identificação da inibição das bactérias se deve a mudança na coloração, a cor rosa indica o crescimento das bactérias, já quanto mais próximo da cor azul maior a inibição.

Figura 12- Atividade antimicrobiana utilizando a técnica de microdiluição em caldo em relação a *Staphylococcus aureus*



Fonte: Autor (2017).

Figura 13 - Placa de Petri para avaliação da atividade antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Autor (2017).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a concentração mais baixa de benzoato de benzila capaz de inibir o crescimento das bactérias

S. aureus e *E. coli* identificados pelos poços com cor azulada. No presente trabalho a CIM contra *S. aureus* foi de 0,05 mg/ μ L, como observado na Figura 13 e 14. Segundo critérios estabelecidos por Machado et al. (2005), verificou-se uma atividade antibacteriana moderada do benzoato de benzila contra *S. aureus*. Entretanto, não foi detectada atividade antibacteriana contra *E. coli*.

Segundo Morris et al. (1978), dos 521 materiais de fragrância analisados, identificaram-se 44 % com atividade antimicrobiana significativa contra pelo menos um dos organismos de teste (*S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*). Para os mesmos autores, o benzoato de benzila obteve atividade moderada para o *Difteroide* e atividade fraca para as bactérias citadas anteriormente.

Na literatura poucos estudos discorrem a respeito do potencial antimicrobiano do benzoato de benzila para que possa ser comparado e analisado a este estudo. Porém é possível encontrar trabalhos avaliando a atividade antimicrobiana de alguns ésteres. Pode-se citar o estudo de Balen et al. (2016), onde obteve inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* para o ascorbiloleato, além das bactérias *E. coli*, *E. faecalis*, *K. oxytoca*, *L. grayi*, *M. luteus* e *P. vulgaris*. Zanetti et al. (2016) obtiveram resultado satisfatório para a atividade antimicrobiana para o éster geranilcinamato para a *S. aureus* e *E. coli*. Além desses ésteres, para Loss et al. (2016), foi possível observar a inibição do crescimento das seguintes bactérias Gram positiva: *B. subtilis*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *S. mutans*, *S. aureus*, *S. epidermis* e Gram negativas: *Aeromonas sp.*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis* para o acetato de eugenila.

O estudo de Chiaradia et al. (2012) avaliou a atividade antimicrobiana do acetato de eugenila obtido via síntese enzimática contra algumas bactérias dentre elas pode citar: Gram positiva (*B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis*) e Gram negativa (*Aeromonas sp.*, *E. coli*, *Salmonella sp.*), sendo que para todas as bactérias avaliadas o acetato de eugenila apresentou um maior halo de inibição se comparada ao eugenol e o cloranfenicol. Os mesmos autores compararam o efeito inibitório sobre as bactérias Gram positiva (*B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. faecalis*) e Gram negativa (*C. freundii*, *E. coli*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*) do óleo essencial do cravo da índia e do acetato de eugenila. A média do halo de inibição apresentada pelo óleo de cravo da índia foi superior a 15,73 mm, já para o acetato de eugenila essa média foi de 13,1 mm para as bactérias Gram

negativas. Já para as bactérias Gram positivas esse comparativo entre o óleo essencial e o éster não apresentou resultado expressivo. Assim como os trabalhos citados anteriormente foi possível verificar a inibição satisfatória do crescimento da bactéria *S. aureus* para alguns ésteres. Porém, não foram encontrados na literatura mais trabalhos que verificasse a eficiência do efeito de inibição de algumas bactérias para o benzoato de benzila que possam ser comparados ao presente estudo.

5 CONCLUSÕES

Novos dados experimentais para a produção de benzoato de benzila são relatados neste trabalho, onde mostram uma perspectiva promissora no uso de tecnologias limpas e possível substituição na produção de ésteres catalisados por ácidos inorgânicos por enzimas imobilizadas na síntese deste produto.

No presente trabalho foi proposta a análise da condição ótima para a síntese do benzoato de benzila empregando as enzimas comerciais imobilizadas Novozym 435[®] e Lipozyme RM IM. Com base nos resultados obtidos, o substrato que mostrou um melhor comportamento para a síntese do benzoato de benzila foi o anidrido benzoico. E com base no estudo proposto por Balen et al. (2016), comprovou-se que o solvente terc-butanol apresentou apropriado e obteve um melhor resultado na produção do éster comparado a outros solventes orgânicos testados.

A produção ótima de benzoato de benzila (51 %) foi alcançada utilizando a Lipozyme RM IM a 40 °C, 150 rpm, razão molar do álcool benzílico:anidrido benzóico 1:5 e concentração de enzima de 10 % (m/m) em 24 h de reação. Além disso, o único fator que se mostrou significativo com um efeito positivo foi a razão molar dos substratos. Observou-se ainda que dentre as duas enzimas empregadas na síntese do BB, a que mais forneceu melhores resultados na conversão do éster desejado foi a Lipozyme RM IM.

Com intuito de avaliar a estabilidade de cada lipase comercial foi realizado teste de reutilização ao longo de 5 ciclos, o que apresentou um processo não tão eficaz devido à grande perda na conversão em benzoato de benzila.

Em relação a avaliação da atividade antimicrobiana foi verificada uma atividade moderada contra *S.aureus* (Gram- positiva) e contra *E. coli* (Gram- negativa) não foi detectada atividade antibacteriana.

Estes resultados reforçam a potencialidade na utilização de enzimas comerciais imobilizadas como catalisadores na síntese de ésteres. Além disso, promove o incentivo de mais estudos relacionado a essa tecnologia limpa.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se para trabalhos futuros:

- a) Propor estratégias para utilização de outras alternativas na síntese enzimática do benzoato de benzila entre elas o uso líquidos iônicos, ultrassom e micro-ondas;
- b) Pesquisar novos métodos para recuperação dos biocatalisadores, para que aumente o número de ciclos para reutilização do mesmo, diminuindo o custo do processo;
- c) Realizar o encapsulamento do benzoato de benzila para obtenção de micro e nano partículas de polímero e coprecipitação do éster benzílico com polímero;
- d) Avaliar condições operacionais que corroboram a maior eficiência neste encapsulamento;
- e) Propor estudos que envolvam a viabilidade econômica da síntese enzimática do benzoato de benzila aplicada em escala industrial;
- f) Testar a atividade antimicrobiana para mais tipos de bactérias.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, A. L.; SCHWAN, R.F.; DIAS, D.R.; Schwanestrada, K.R.F.; Bravo-martins, C.E.C. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.9, p.86-91, 2007.

ANSORGE-SCHUMACHER M.B.; THUM O. **Immobilised lipases in the cosmetics industry.** Chem. Soc. Rev., v.42 p. 6475–6490, 2013.

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

BACHEWAR, N.P.; THAWANI, V.R.; MALI, S.N.; GHARPURE, K.J.; SHINGHADE, V.P.; DAKHALE G.N. **Comparison of safety, efficacy, and cost effectiveness of benzyl benzoate, permethrin, and ivermectin in patients of scabies.** Indian Journal of Pharmacology, v. 41, p. 9-14, 2009.

BALEN M.; GOMES G. R.; KRATZ J. M.; SIMÕES C. M. O.; VALÉRIO A.; OLIVEIRA D. **Enzymatic synthesis of ascorbyl ester derived from linoleic acid.** Bioprocess Biosyst Eng, v. 40, p. 265-270, 2016.

BALEN, M. **Síntese enzimática de ascorbil oleato utilizando tecnologias alternativas.** Florianópolis, 2016. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico Departamento de Engenharia Química E Engenharia De Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

BORNSCHEUER U, KAZLAUSKAS R. **Hydrolases in Organic Synthesis.** Weinheim: Wiley-VCH, 1999

BORZANI W.; SCHMIDELL N.; WILLIBALDO; LIMA,URGEL DE ALMEIDA; AQUARONE, EUGÊNIO. **Biotecnologia industrial.** São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

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

CHIARADIA, V.; PAROUL, N.; CANSIAN, R. L.; JÚNIOR, C. V; DETOFOL, M.R.; LERIN, L.A.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; OLIVEIRA, D. **Synthesis of eugenol esters by lipase-catalyzed reaction in solvent-free system.** Applied Biochemistry and Biotechnology, n.168, v. 4, p. 742 - 751, 2012.

CHOSIDOW O. **Scabies and pediculosis.** Lancet. v.355, n. 9206, p.819–26, 2000.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement.** 184 p. 2012.

DHAKE KISHOR P., KRISHNA M. DESHMUKHA, YOGESH S. WAGHA, REKHA S. SINGHAL , BHALCHANDRA M. Bhanagea **Investigation of steapsin lipase for kinetic resolution of secondary alcohols and synthesis of valuable acetates in non-aqueous reaction medium.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 77, p. 15-23, 20012.

EFSA (European Food Safety Authority). **Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP).** EFSA Journal, v.9, n. 12, p. 2440, 2011.

ENCYCLOPEDIA OF TOXICOLOGY. USA, Third edition, v.1, p.433-434, 2014.

FERRAZ, L.I.R.; POSSEBOM, G.; ALVEZ, E.V.; CANSIAN, R.L.; PAROUL, N.; OLIVEIRA D.; TREICHEL, H. **Application of home-made lipase in the production of geranyl propionate by esterification of geraniol and propionic acid in solvent free system.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 4, p.44- 48, 2014.

FOGLER, H. SCOTT. **Elementos de engenharia das reações químicas.** 3. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

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

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ LA FUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. **Potential of Different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance.** *Advanced Synthesis e Catalysis*. v. 353, p. 2885-2904, 2011.

GARLAPATI, V.K.; KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; BANERJEE, R. **Modeling, simulation, and kinetic studies of solvent-free biosynthesis of benzyl acetate.** *Journal of Chemistry*, p. 1-9, 2013

GOMES, F, M.; PAULA, A.V.; SILVA, G.S.; CASTRO, H.F. **Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidzol.** *Química Nova*, v. 29,p. 710-718, 2006.

GOVIND V. WAGHMARE; MANGESH D. VETAL ;VIRENDRA K. RATHOD. **Ultrasound assisted enzyme catalyzed synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.22, p. 311-316, 2015.

GRYGLEWICZ, S.; JADOWNICKA, E.; CZERNIAK, A. **Lipase catalysed synthesis of aliphatic, terpene and aromatic esters by alcoholysis in solvent-free medium.** *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 1379–1382, 2000.

HENGGE, U.R.; CURRIE, B.J.; JÄGER, G.; LUPI, O.; SCHWARTZ, R.A. **Scabies: a ubiquitous neglected skin disease.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 6, p. 769–779, 2006.

GUDIÑO, E. D.; SANTILLÁN, J. Y.; IGLESIAS, L. E.; IRIBARREN, A. M. **An enzymatic alternative for the synthesis of nucleoside 5'-monophosphates.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 111, p. 1–6, 2018.

GUGGISBERG D, DE VIRAGH PA, CONSTANTIN C, PANIZZON RG. **Norwegian scabies in a patient with acquired immunodeficiency syndrome.** *Dermatology*. v. 197, p.306–8, 1998.

HAN, X.; LIU, G.; SONG, W.; QU, Y. **Production of sodium gluconate from delignified corn cob residue by on-site produced cellulase and co-immobilized glucose oxidase and catalase.** *Bioresource Technology*, v. 248, p. 248–257, 2018.

HENGGE, U.R.; CURRIE, B.J.; JÄGER, G.; LUPI, O.; SCHWARTZ, R.A. **Scabies: a ubiquitous neglected skin disease.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 6, p. 769–779, 2006.

HEUKELBACH J, OLIVEIRA FA, FELDMEIER H. **Ecoparasitoses and public health in Brazil: challenges for control.** *Cad Saude Publica*, v.19, p.1535–40, 2003

HORCHANI, H., SALEM, N. B., ZARAI, Z.; SAYARI, A. **Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized *Staphylococcus aureus* lipase: Optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity.** *Bioresource Technology*, v.10, p. 2809 - 2817, 2010.

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

KHAN N. R., RATHOD V. K. **Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review.** *Process Biochemistr*, v.50 , p.1793–1806, 2015

KIRUMAKKI, S.R.; NAGARAJU, N.; NARAYANAN, S. **A comparative esterification of benzyl alcohol with acetic acid over zeolites H β , HY and HZSM5.** *Applied Catalysis A: General*, v. 273, p. 1-9, 2004.

KOSKINEN A.M.P.; KLIBANOV, A.M. **Enzymatic Reactions in Organic Media**, Blackie, Glasgow, 1996.

KRISHNA HARI S., KARANTH N. G. **Cataly.** *Rev. Sci. Eng.* v.44 p. 499–591, 2002.

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

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V.K.; BANERJEE, R.; DASGUPTA, S. **Lipase mediated isoamyl acetate synthesis in solvent-free system using vinyl acetate as acyl donor.** *Food Technology and Biotechnology*, v. 47, p. 13–18, 2009.

LAROQUE, D. A.; LOSS R. A.; SILVA JA M.; PEREIRA G. N.; VALERIO A.; HENSE H., OLIVEIRA D.; OLIVEIRA J. V. **Synthesis of Eugenyl Acetate in Solvent - Free Acetylation: Process Optimization and Kinetic Evaluation.** *J Chem Eng Process Technol*,6:4, 2015.

LERIN L., CENI G., RICHETTI A., KUBIAK G., OLIVEIRA VLADIMIR J., TONIAZZO G., TREICHEL H., OESTREICHER E. G. E OLIVEIRA D. **Successive cycles of utilization of Novozym 435® in three different reaction systems.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. v. 28, n.02, p. 181 - 188, 2011.

LERIN, L.A.; FEITEN, M.C.; RICHETTI, A.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, J.V.; OESTREICHER, E.G.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, D. **Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in ultrasound-assisted system: Process optimization and kinetic evaluation.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, p. 988-996, 2011.

LOSS A. R.; PEREIRA G. N.; BOSCHETTO D. L.; AGUIAR G. S. P.; MACHADO J. R.; CHAVES L. M. P. C.; SILVA M. J. A.; OLIVEIRA D.; OLIVEIRA J. V. **Encapsulation of eugenyl acetate in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation.** *J Food Sci Technol*, 2016.

LY, F.; CAUMES, E.; NDAW, C.A.T.; NDIAYE, B.; MAHÉ, A. **Invermectin versus benzyl benzoate applied once or twice to treat human scabies in Dakar, Senegal: a randomized controlled trial.** *Bulletin of the World Health Organization*, v. 87, p. 424-430, 2009.

MACEDO A. G.; PASTORE I G. M. **Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma.** Ciênc. Tecnol. Aliment., v.17, n.2 , 1997.

MACHADO, K. E.; CECHINEL F. V.; TESSAROLO M. L.; MALLMANN, R.; MEYRE-SILVA C.; BELLA C., A. **Potent Antibacterial Activity of Eugenia umbelliflora.** Pharmaceutical Biology, v. 43, n. 7, p. 636–639, 2005.

MACRAE, A. R. **Lipase – catalyzed inter esterification of oils and fats.** J. Am. Oil. Chem. Soc., 60, 243-246, 1983.

MAJUMDER, A. B., SINGH, B., DUTTA, D.; SADHUKHAN, S. **Lipase catalyzed synthesis of benzyl acetate in solvent-free medium using vinyl acetate as acyl donor.** Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v.16, p.4041-4044, 2006.

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

MCCARTHY JS, KEMP DJ, WALTON SF, CURRIE BJ. **Scabies: more than just an irritation.** Postgrad Med J., v.80, p.382–7, 2004.

MÉLINE, T.; MUZARD, M.; DELEU, M.; RAKOTOARIVONINA, H.; PLANTIER-ROYON, R.; RÉMOND, C. **d-Xylose and l-arabinose laurate esters: Enzymatic synthesis, characterization and physico-chemical properties.** Enzyme and Microbial Technology, v. 112, p. 14–21, 2018.

MELO, L. L. M. M. **Síntese enzimática dos ésteres de aroma butirato e valerato de citronelila por lipase de *Rhizopus sp.*** Campinas, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MISHRA, A.; SARDAR, M. **Cellulase assisted synthesis of nano-silver and gold: Application as immobilization matrix for biocatalysis.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 77, p. 105–113, 2015.

MORRIS J.A.; A. KHETTRY E SEITZ E. W. **Antimicrobial Activity of Aroma Chemicals and Essential Oils.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 56, p. 595- 603, 1978

NOGALES, J. M. R.; ROURA, E.; CONTRERAS, E. **Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach.** Process Biochem. v.40, p. 63 - 68, 2005.

PAULA, A.V.; BARBOZA, J.C.S.; CASTRO, H.F. **Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares.** Química Nova, v. 28, p. 792-796, 2005.

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI L.; CHIARADIA V.; TREICHEL H.; CANSIANL.P. ; OLIVEIRA J. V.; OLIVEIRA D. **Solvent-Free Production of Bioflavors by Enzymatic Esterification of Citronella (Cymbopogon winterianus) Essential Oil.** Appl Biochem Biotechnol. V. 166, p.13–21, 2012

PIRES-CABRAL, P.; FONSECA DA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. **Biochem. Eng. J.**v.43, p. 327, 2009.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. **Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries.** Bras. Arch. Biol. Technol. v.52 p. 201-219, 2009.

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

SALAH R.B., GHAMGHUI H., MILED N., MEJDOUB H., GARGOURI Y. **Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of Rhizopus oryzae.** J. Biosci. Bioeng. v.103, p.368–372, 2007.

SAHU, A.; BADHE, P. S.; ADIVAREKAR, R.; LADOLE, M. R.; PANDIT, A. B. **Synthesis of glycinamides using protease immobilized magnetic nanoparticles.** Biotechnology Reports, v. 12, p. 13–25, 2016.

SARKER, S. D., NAHAR, L., KUMARASAMY, Y. **Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals.** *Methods*, v.42, p. 321 e 324, 2007

SHARMA, G.; DHANKAR, G.; THAKUR, K.; RAZA, K.; KATARE, O. P. **Benzyl benzoate-loaded microemulsion for topical applications: enhanced dermatokinetic profile and better delivery promises.** *AAPS PharmSciTech*, v. 17, p. 1221- 31, 2015.

SHIH, I. L.; HUNG, S. H.; CHEN, F. Y.; JU, H. Y.; SHIEH, C. J. **Food Chem.**, v.100, p.1223, 2007.

SILVA, N. C. A., MIRANDA, J. S., BOLINA, I. C. A., SILVA, W. C. **Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor.** *Biochemical Engineering Journal*, v.82, p. 1139 -1149, 2014.

TAPLIN D, MEINKING TL, CHEN JA, SANCHEZ R. **Comparison of crotamiton 10 % cream (Eurax) and permethrin 5 % cream (Elimite) for the treatment of scabies in children.** *Pediatr Dermatol.* v.7, p. 767–73, 1997.

TEWARI, Y.B.; IHARA, T.; PHINNEY, K.W.; MAYHEW, M. P. **A thermodynamic study of the lipase-catalyzed transesterification of benzyl alcohol and butyl acetate in supercritical carbon dioxide media.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, p. 131–136, 2004.

TORRES, S.; BAIGORÍ, M. D.; SWATHY, S. L.; CASTRO, G. R. **Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase.** *Food Research International*, v. 42, n. 4, p. 454-460, 2009.

TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. **Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase.** *Enzyme Microb. Technol.* v. 40, p. 716 - 722, 2007.

VANIN, A. B., ORLANDO, T., PIAZZA, S. P., PUTON, B. M. S. **Antimicrobial and antioxidant activities of clove essential oil and eugenyl acetate produced by enzymatic esterification.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v.174, p. 1286 e 1298, 2014.

VCF - Volatile Compounds in Food: database/Nijssen, L.M.; Ingen-Visscher, C.A. van; Donders, J.J.H. [eds]. – Version 16.2 – **Zeist (The Netherlands): TNO Triskelion**, 1963-2016.

VENERAL, J. G.; OLIVEIRA D.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. **Continuous enzymatic synthesis of polycaprolactone in packed bed reactor using pressurized fluids.** Chemical Engineering Science, v. 175, p. 139–147, 2018.

WAGHMARE, G. V.; VETAL, M. D.; RATHOD, V. K. **Ultrasound assisted enzyme catalyzed synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 22, p. 311-316, 2015.

WANG, H.; JIA, C.; XIA, X.; KARANGWA, E.; ZHANG, X. **Enzymatic synthesis of phytosteryl lipoate and its antioxidant properties.** Food Chemistry, v. 240, p. 736–742, 2018.

WHO (World Health Organization). **Evaluation of certain food additives: seventy-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.** WHO Technical Report Series, n. 990, p. 124, 2014.

WINNICKA, E.; KAŃSKA, M. **Enzymatic synthesis of methyl derivatives of L-tryptophan selectively labeled with hydrogen isotopes.** Applied Radiation and Isotopes, v. 137, p. 118–122, 2018.

XU, J.; LIU, C.; WANG, M.; SHAO, L.; DENG, L.; NIE, K.; WANG, F. **Rotating packed bed reactor for enzymatic synthesis of biodiesel.** Bioresource Technology, v. 224, p. 292–297, 2017.

YADAV G. D. YADAV ; LATHI P. S. **Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 27,p. 113–119, 2004.

YAHYA, A.R.M.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. **Ester synthesis in lipase catalyzed reactions.** Enzyme and Microbial Technology, v. 23, p. 438-450, 1998.

ZANETTI M., CARNIEL T. K., VALÉRIO A., OLIVEIRA J. V., OLIVEIRA D., ARAÚJO P. HH., RIELLAC G. H. AND FIORI M. A. **Synthesis of geranyl cinnamate by lipase-catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2016.