



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA
DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

ELOISE DE SOUSA CORDEIRO

**SÍNTESE DE ÉSTERES EMOLIENTES EM SISTEMA LIVRE
DE SOLVENTE UTILIZANDO LIPASES IMOBILIZADAS**

FLORIANÓPOLIS-SC
2019

ELOISE DE SOUSA CORDEIRO

**SÍNTESE DE ÉSTERES EMOLIENTES EM SISTEMA LIVRE
DE SOLVENTE UTILIZANDO LIPASES IMOBILIZADAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior.

Coorientador:
Prof. Dr. Lindomar Alberto Lerin.

FLORIANÓPOLIS-SC
2019

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

Cordeiro, Eloise de Sousa

Síntese de Ésteres Emolientes em Sistema Livre de Solvente Utilizando Lipases Imobilizadas / Eloise de Sousa Cordeiro; orientador, Agenor Furigo Junior; coorientador, Lindomar Alberto Lerin. Florianópolis, SC, 2019.

92 p.

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

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. oleato de etilenoglicol. 3. estearato de benzila. 4. NS 88011. 5. Novozym 435®. I. Furigo Junior, Agenor. II. Lerin, Lindomar Alberto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

**Síntese de Ésteres Emolientes em Sistema Livre de Solvente
Utilizando Lipases Imobilizadas**

por

Eloise de Sousa Cordeiro

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.

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - Pós-ENQ

Cíntia Soares
Prof.ª Dr.ª Cíntia Soares
Coordenadora

Portaria 1122/2019 de 07/05/2019
Orientador

Lindomar Alberto Lerin

Prof. Dr. Lindomar Alberto Lerin
coorientador

Cíntia Soares

Prof.ª Dr.ª Cíntia Soares
coordenadora

Banca Examinadora:

José Miguel Müller
Prof. Dr. José Miguel Müller

Manuêla Balen
Dr.ª Manuêla Balen

Florianópolis, 30 de maio de 2019.

“Dedico este trabalho as pessoas que sempre me apoiaram e acreditaram em meu potencial, meus pais Alice Gomes e Luiz Cordeiro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças para perseverar e jamais desistir do meu objetivo nos momentos de dificuldade.

A minha família especialmente aos meus pais, Alice Gomes e Luiz Cordeiro que me deram todo o incentivo para que eu pudesse conquistar mais esse objetivo em minha vida.

Aos meus irmãos, que sempre me apoiaram e sentem orgulho de mim, Andrea Souza e Leandro Cordeiro; e meus sobrinhos Hellena de Souza, Alicia Cordeiro e Pedro Souza, nos quais me espelhei para manter a alma pura.

Ao meu orientador Agenor Furigo Junior e coorientador Lindomar Alberto Lerin, por todo o incentivo, dedicação, orientação, apoio e ensinamentos que foram essenciais para o desenvolvimento desta dissertação.

À banca e ao Programa Institucional de Bolsas - CNPQ.

Ao aluno de iniciação científica Eduardo Deucher, que me acompanhou nas etapas experimentais.

Aos meus amigos Gabriela Nayara Pereira, Maick Meneguzzu e Thalles Trevisol, por sempre estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis. Obrigada pela amizade!

A pós doutoranda Rosana Henriques por ser uma pessoa que jamais hesitou em me auxiliar em momentos de dúvidas.

A todo o grupo do LIEB.

A todos que de alguma forma estiveram ao meu lado nessa etapa tão importante de minha vida.

RESUMO

A utilização de catalisadores enzimáticos são uma alternativa aos catalisadores químicos, pois podem ajudar a obter produtos com menor impacto ambiental, considerados sustentáveis dentro do conceito da química verde. Neste trabalho, avaliou-se a viabilidade de produção dos ésteres estearato de benzila e oleato de etilenoglicol, ésteres emolientes utilizados na formulação principalmente de cosméticos, a partir da reação de esterificação enzimática, utilizando lipases comerciais imobilizadas em sistema livre de solvente. A síntese de oleato de etilenoglicol foi realizada a partir do ácido oleico e do álcool monoetilenoglicol utilizando a lipase comercial *Candida antarctica* (NS 88011) como catalisador. A síntese do estearato de benzila foi realizada a partir do ácido esteárico e o álcool benzílico utilizando principalmente a lipase comercial *Candida antarctica* Novozym 435®. A síntese de oleato de etilenoglicol foi estudada por meio de planejamento experimental, utilizando as variáveis temperatura (40-70 °C), razão molar entre o ácido e o álcool (1:2, 1:4, 1:6) e agitação (200-600 rpm). Além disso, realizou-se ensaios cinéticos com diferentes concentrações de derivado enzimático e teste de reúso. Diferentes enzimas comerciais (Novozym 435®, Lipozyme RMIM, Lipozyme TLIM e NS 88011) foram testadas na síntese de estearato de benzila, sendo que ensaio cinético foi realizado para diferentes razões molares de reagentes para o derivado Novozym 435®. Foi possível produzir o éster oleato de etilenoglicol e também estearato de benzila com excesso de álcool em sistema livre de solventes com conversão praticamente total para o oleato de etilenoglicol e acima de 90% para o estearato de benzila. A cinética da reação de síntese de oleato de etilenoglicol apresentou duas fases: a primeira em que as velocidades e os níveis de conversão atingidos dependem da concentração do derivado enzimático e a segunda em que a inibição atingida na primeira fase cessa e há uma retomada da reação com velocidades inferiores. A temperatura mostrou ser a variável mais importante para atingir-se altas conversões da reação de esterificação de oleato de etilenoglicol e foi possível reutilizar o catalisador enzimático lipase NS 88011 com conversões similares em dois ciclos de 48 h. Utilizando a enzimas Novozym 435® obteve-se o éster estearato de benzila em sistema livre de solvente com conversão 95% em 6 h de reação, sendo que o excesso de álcool em relação ao ácido, acima de 5:1, prejudicam a cinética da reação, mas não influenciam a conversão final.

Palavras-chave: Oleato de etilenoglicol, estearato de benzila, NS 88011, Novozym 435®, éster emoliente, esterificação enzimática.

ABSTRACT

The use of enzymatic catalysts is an alternative to chemical catalysts, since they can help to obtain products with less environmental impact, considered sustainable within the concept of green chemistry. In this work, the viability of the production of the benzyl stearate esters and ethylene glycol oleate, emollients esters used in the formulation of cosmetics mainly, from the enzymatic esterification reaction, was evaluated using commercial lipases immobilized in a solvent-free system. Synthesis of ethylene glycol oleate was performed from oleic acid and alcohol monoethyleneglycol using the commercial lipase *Candida antarctica* (NS 88011) as the catalyst. The synthesis of benzyl stearate was performed using stearic acid and benzyl alcohol using mainly the commercial lipase *Candida antarctica* Novozym 435®. The synthesis of ethylene glycol oleate was studied by means of experimental design, using the variables temperature (40-70 °C), molar ratio of acid to alcohol (1:2, 1:4, 1:6) and stirring (200-600 rpm). In addition, kinetic assays were performed with different concentrations of enzyme derivative and re-test. Different commercial enzymes (Novozym 435®, Lipozyme RMIM, Lipozyme TLIM and NS 88011) were tested in the synthesis of benzyl stearate, and kinetic assay was performed for different molar ratios of reagents for the Novozym 435® derivative. It was possible to produce the oleate ester of ethylene glycol and also benzyl stearate with excess alcohol in a solvent-free system with practically total conversion to ethylene glycol oleate and above 90% for benzyl stearate. The kinetics of the ethylene glycol oleate synthesis reaction had two phases: the first where the rates and the conversion levels reached depend on the concentration of the enzymatic derivative and the second where the inhibition reached in the first phase ceases and there is a recovery of the reaction with lower speeds. The temperature showed to be the most important variable to achieve high conversions of the esterification reaction of ethylene glycol oleate and it was possible to reuse the enzymatic catalase NS 88011 lipase with similar conversions in two 48 h cycles. Using the enzymes Novozym 435®, the benzyl stearate ester was obtained in a solvent-free system with a conversion of 95% in 6 hours of reaction, with excess alcohol over 5:1, harming the kinetics of the reaction, but do not influence the final conversion.

Keywords: Ethylene glycol oleate, Benzyl stearate, NS 88011, Novozym 435®, emollient ester, enzymatic esterification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de esterificação.	29
Figura 2 - Mecanismo geral da reação de esterificação de Fischer.	30
Figura 3 - Fórmula estrutural do ácido esteárico.....	35
Figura 4 - Fórmula estrutural do ácido oleico.	36
Figura 5 - Fórmula estrutural do álcool benzílico	37
Figura 6 - Fórmula estrutural do álcool benzílico.	37
Figura 7 - Fórmula estrutural do éster estearato de benzila.....	38
Figura 8 - Fórmula estrutural do éster oleato de etilenoglicol.....	39
Figura 9 - Representação esquemática das etapas experimentais.....	43
Figura 10 - Reator encamisado com agitação mecânica, acoplado ao banho termostático.	44
Figura 11 - Haste agitadora de quatro pás em forma de hélice (R 1342) com diâmetro do eixo de 8 mm.	44
Figura 12 - Estufa incubadora com agitação orbital MA 410 – MARCONI.....	47
Figura 13 - Diagrama de Pareto obtido através do planejamento fatorial 2^3	57
Figura 14 - Curva de contorno referente a conversão de ácido oleico na síntese de oleato de etilenoglicol em função da temperatura e agitação.	58
Figura 15 - Curva de contorno referente a síntese de oleato de etilenoglicol em função da agitação e razão molar.	59
Figura 16 - Curva de contorno referente a síntese de oleato de etilenoglicol em função da razão molar e temperatura.....	60
Figura 17 - Cinética da conversão de ácido oleico na reação de esterificação para diversas concentrações de lipase NS 88011. Condições reacionais mantidas fixas: 70°C, 600 rpm, razão molar 1:2.....	61
Figura 18 - Reutilização do catalisador enzimático lipase NS 88011, na reação de esterificação para produção do oleato de etilenoglicol. Condições reacionais: razão molar 1:2, 70 °C, 600 rpm, 48 h de reação, 1% (m/m) de lipase NS 88011 em relação a massa total.....	64
Figura 19 - Conversão de estearato de benzila utilizando diferentes enzimas. Condições experimentais: razão molar 1:5 (ácido esteárico:álcool benzílico), 60 °C, 200 rpm, 6 h de reação, 1% (m/m) de cada lipase em relação a massa total do substrato.....	66

Figura 20 - Avaliação do efeito da razão molar (ácido esteárico:álcool benzílico) na produção do estearato de benzila. Condições reacionais: razão molar (1:1, 1:3, 1:5 e 1:7), 60 °C, 200 rpm, 1% (m/m) de lipase Novozym 435® em relação a massa total do substrato..... 68

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Ésteres e suas respectivas aplicações na indústria.....	33
Tabela 2 - Níveis codificados e valores reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo 2^3	45
Tabela 3 - Matriz de planejamento experimental 2^3 (valores codificados e reais) com respostas em termos de conversão de ácido oleico em oleato de etilenoglicol em 24 h de reação, usando 1% (m/m) de lipase NS 88011 em relação a massa total de substrato nas condições: temperatura de 70 °C, 600 rpm e razão molar ácido oleico:álcool monoetilenoglicol 1:2.	52
Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) para a conversão de ácido oleico em oleato de etilenoglicol.....	56
Tabela 5 – Velocidade inicial das reações de esterificação do ácido oleico e do álcool etilenoglicol.	62
Tabela 6 – Características do suporte da Novozym 435® e NS 88011.	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. GERAL.....	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1. ENZIMAS.....	27
3.1.1. LIPASES	27
3.1.2. REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO	29
3.1.3. ÉSTERES	31
3.1.4. A UTILIZAÇÃO DE ÉSTERES NAS INDÚSTRIAS	32
3.1.5. ÁCIDO GRAXOS.....	34
3.1.6. ÁCIDO ESTEÁRICO	34
3.1.7. ÁCIDO OLEICO	35
3.1.8. ÁLCOOL MONOETILENOGLICOL	37
3.1.9. ESTEARATO DE BENZILA.....	38
3.1.10. OLEATO DE ETILENOGLICOL.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. MATERIAIS.....	41
4.1.1. CATALISADORES ENZIMÁTICOS	41
4.2 MÉTODOS.....	42
4.2.1 SÍNTESE DO OLEATO DE ETILENOGLICOL	43
4.2.1.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA	45
4.2.1.3. REÚSO DO CATALISADOR ENZIMÁTICO.....	45
4.2.1.4. SÍNTESE DO ESTEARATO DE BENZILA	46
4.2.1.5. ÍNDICE ACIDEZ	48

4.2.1.6. CÁLCULO DA CONVERSÃO ÁCIDO GRAXO EM PRODUTO	49
4.2.1.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1. OLEATO DE ETILENOGLICOL.....	51
5.1.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ESTERIFICAÇÃO .	51
5.1.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA NA ESTERIFICAÇÃO	60
5.1.3. REÚSO DO CATALISADOR ENZIMÁTICO.....	64
5.2. ESTEARATO DE BENZILA.....	65
6. CONCLUSÃO.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
APÊNDICE A	91
A – Gráfico da velocidade inicial da cinética de 1,0% (m/m) de lipase em relação a concentração do produto.	91
D – Gráfico da velocidade inicial da cinética de 0,6 % (m/m) de lipase em relação a concentração do produto.	92

1. INTRODUÇÃO

O mercado de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC) tem movimentado cerca de 200 bilhões de dólares no mundo (ANSORGE-SCHUMACHER e THUM, 2013). Já o mercado global de aromas e fragrâncias foi estimado em cerca de 20.3 bilhões de dólares em 2008, incluindo produtos alimentícios e bebidas (RODRIGUES et al., 2013; BADGUJAR; BHANAGE, 2014).

O setor de HPPC, a nível mundial, apresentou, no período de 2003 a 2017, uma taxa média de crescimento anual (CAGR) de 4,28%, com tamanhos de aproximadamente US\$ 256 bilhões em 2003 e de US\$ 464 bilhões em 2017 (EUROMONITOR, 2016). Segundo dados da ABIHPEC (2019), o crescimento do setor ultrapassou no mesmo período a evolução média da indústria em geral (2,2% a.a.) e superou inclusive o crescimento médio do PIB (3,0% a.a.).

Atualmente, o país que apresenta o maior mercado consumidor no setor é os Estados Unidos, com 18.3% (US\$ 89.5 bilhões). Seguido da China 12.7% (US\$ 62 bilhões), Japão 7.7% (US\$ 37.5 bilhões), Brasil 6.2% (US\$ 30 bilhões), Alemanha 4.1% (US\$ 20.2 bilhões), Reino Unido 3.6% (US\$ 17.4 bilhões), França 3.1% (US\$ 15.3 bilhões), Índia 2.9% (US\$ 14.1 bilhões), Coreia do Sul 2.8% (US\$ 13.5 bilhões) e Itália 2.4% (US\$ 11.8 bilhões). Isso demonstra que a utilização de cosméticos, perfumes e higiene pessoal tem aumentado cada vez mais e tem proporcionado aos seres humanos boa aparência e jovialidade, sendo indispensáveis para os cuidados básicos como a saúde, bem-estar e qualidade de vida (ABIHPEC, 2019).

A Indústria Brasileira de cosméticos apresentou um crescimento médio próximo a 11.4% nos últimos 20 anos, aumentando o faturamento líquido de imposto sobre vendas, de R\$ 4.9 bilhões em 1996 para R\$ 42.6 bilhões em 2015 (ABIHPEC, 2019). Isso pode ser explicado pelo fato do HPPC ser um dos setores da indústria que mais investem em pesquisas para identificar as transformações da sociedade e desenvolver produtos que atendam as novas demandas da sociedade.

A pesquisa mensal de comércio do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostra que em 2016 houve cerca de 11,6% de crescimento do consumo de produtos farmacêuticos, médicos e cosméticos, fazendo o Brasil ocupar a sexta maior participação na taxa global do varejo e o setor corresponder cerca de 1,8% do Produto Interno Bruto (PIB) do país (IBGE, 2019).

A indústria alimentícia tem intensificado pesquisas em novas tecnologias para a produção de aditivos, alimentos e ingredientes naturais, por causa do crescimento pela busca de alimentos mais saudáveis (MELO, 2004). Os chamados alimentos funcionais têm uma grande importância na economia global, pois representa cerca de dezenas de bilhões de dólares e tem apresentando uma taxa de 7,5% de crescimento (SLOAN, 2002; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005).

Os ésteres aromáticos de sabor possuem um anel aromático em sua estrutura molecular (SANTOS et al., 2016), são compostos significativos e versáteis, considerados ingredientes importantes em alimentos, bebidas, cosméticos e produtos de higiene pessoal (BADGUJAR et al., 2014; AKACHA; GARGOURI, 2015; TODERO et al., 2015; BADGUJAR; PAI; BHANAGE, 2016). Apesar de serem obtidos diretamente de plantas e/ou frutas, existem desvantagens em relação ao alto custo de produtos necessários para a extração e purificação (SANTOS et al., 2016). Por isso, para a obtenção de ésteres o método mais utilizado em processos industriais é o convencional, conhecido como reação de esterificação de Fischer, que faz a utilização de catalisadores perigosos, como o ácido sulfúrico (H_2SO_4) que necessita de altas temperaturas e pressão para que a reação ocorra (OLIVEIRA, 2013). Na composição desse produto tem resíduos tóxicos aos seres humanos e ao meio ambiente, por isso, ele não pode ser chamado de éster natural (KHAN; RATHOD, 2015; MANAN et al., 2016).

Tendo em vista a necessidade de produzir tecnologias verdes, a biotecnologia passou a investir no uso de técnicas que faz a utilização de organismos vivos ou parte deles para produzir ou até mesmo modificar produtos (BICAS, 2010). Para o processo de esterificação enzimática utiliza-se enzimas como biocatalisadores ao invés de ácidos e bases fortes, e isso traz vantagens ambientais, pois minimiza a geração de resíduos (ROMERO, 2007).

Desse modo, o uso de enzima para a produção de ésteres aromáticos se tornou uma opção viável economicamente, atualmente essa metodologia de processamento tem sido a preferida quando se compara com a que utiliza catalisadores químicos, pois é considerada ambientalmente correta e gera economia de energia e recursos. Dessa forma, atuam em condições de reações mais brandas, como baixas temperaturas e pressão, além de serem altamente específicas, reduzindo a obtenção de subprodutos indesejados (GARLAPATI et al., 2013; STENCEL; LEADBEATER, 2014; FERRAZ et al., 2015).

Pretende-se neste trabalho obter os ésteres oleato de etilenoglicol e estearato de benzila por meio de catálise enzimática. Esses ésteres têm

propriedades emolientes, emulsificante e aromáticas e são muito utilizados nas composições de cosméticos e produtos de higiene pessoal. Nos dois casos, a reação de esterificação com biocatalisadores ocorre a partir de um ácido graxo de cadeia longa (ácidos esteárico e oleico) e um álcool (benzílico e monoetilenoglicol).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

O presente trabalho tem como objetivo produzir ésteres emolientes de interesse da indústria de cosmético, oleato de etilenoglicol e estearato de benzila, em sistema livre de solvente por meio de esterificação enzimática com lipase comercial imobilizada.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a viabilidade de utilização da lipase comercial *Candida antarctica* (NS 88011) para a produção do éster oleato de etilenoglicol;
- Determinar a influência da concentração do derivado enzimático comercial NS 88011 na síntese de oleato de etilenoglicol;
- Avaliar a cinética reacional para a produção enzimática do oleato de etilenoglicol,
- Estudar o reuso do biocatalisador na síntese do oleato de etilenoglicol;
- Otimizar a produção enzimática de oleato de etilenoglicol utilizando as principais variáveis de processo (razão molar, temperatura e agitação);
- Verificar a viabilidade de utilização das lipases comerciais imobilizadas (Lipozyme TLIM, Lipozyme RMIM, NOVOZYM® 435 e NS 88011) para a produção de estearato de benzila.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ENZIMAS

As enzimas são um conjunto de proteínas que possuem atividade catalítica produzidas por todos os organismos vivos, são substâncias sólidas que atuam como biocatalisadores biológicos não tóxicos e são aplicadas para atuarem acelerando uma reação química e aumentar a velocidade de conversão de diferentes substratos em produtos específicos (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009; BARBOSA et al., 2015).

Na ausência de catálise enzimática, a maioria das reações bioquímicas são lentas, por isso não ocorreriam sob condições brandas de pressão e temperatura, como todos os outros catalisadores, as enzimas são caracterizadas por duas propriedades fundamentais. Primeiro, elas aumentam a velocidade de reações químicas sem serem consumidas ou permanentemente alteradas pela reação.

Os processos catalisados por enzimas são bastante compreendidos e vantajosos, pois ao serem utilizadas como biocatalisadores oferecem meios para produzir produtos considerados verdes (GRYGLEWICZ; JADOWNICKA; CZERNIAK, 2000; COSIMO, 2013; BADGUJAR; BHANAGE, 2015). O uso de enzimas na biocatálise é rotulado como uma catálise verde, pois várias enzimas já foram empregadas para sintetizar produtos químicos finos, permitindo trabalhar em condições de reação brandas (REETZ, 2002; COSIMO et al., 2013; ADLERCREUTZ, 2013).

Em 2015 o mercado global de enzimas industriais atingiu quase 4,9 bilhões de dólares e estima-se que em 2021 esse mercado deva aumentar para 6,3 bilhões de dólares a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 4,7% (BBC, 2017; SÁ et al., 2017).

O uso industrial de enzimas como as lipases vem ganhando cada vez mais destaque e sendo alvo de interesse da biotecnologia, pois a utilização desse biocatalisador traz excelentes vantagens para o processo (MUSSATO; MILAGRES; FERNANDES, 2007; FERRAZ et al., 2015). Essa enzima tem uma grande capacidade catalítica e a vantagem de sua utilização frente a rota convencional, e a possibilidade de uso de matérias-primas oleosas com índice de acidez elevado (GULDHE et al., 2015).

3.1.1. LIPASES

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C.3.1.1.3) fazem parte de grupo de enzimas hidrolíticas com maior aplicabilidade

biotecnológica e industrial. Atuam na interface água e óleo, que tem a função de hidrolisar triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia longa e glicerol. E são produzidas por diversos organismos vivos, entre eles animais, plantas, fungos e bactérias (FABER, 1997; OLIVEIRA, 2007; DUBAL et al., 2008; WU et al., 2014).

É o grupo mais importante de enzimas e tem o maior valor biotecnológico, portanto, é a classe de enzimas mais utilizada na biotecnologia (SCHMID; VERGER, 1998; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; RIBEIRO, 2011). É constantemente aplicada na síntese orgânica devido à sua versatilidade catalítica, que são capazes de catalisar diversas reações, pela sua disponibilidade comercial, pela facilidade de produção em grande escala e baixo custo, além de não necessitarem de cofatores sendo estáveis neste meio, atuam em uma grande faixa de pH (VILLENEUVE et al., 2000; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; PALUDO et al., 2015; TOMKE; RATHOD, 2015; NARWAL et al., 2016).

As lipases podem ser inativadas por fatores químicos, físicos e biológicos que podem ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise ocorra com êxito em um determinado processo, é necessário que sejam protegidas da interação com o solvente, pois o meio pode impossibilitar a catálise da reação. Esse fato pode ser superado através do uso de técnicas de imobilização de enzimas que as tornam estáveis e desse modo o processo de reutilização é possível e facilitado, reduzindo custos e melhorando a qualidade do produto final (VILLENEUVE et al., 2000; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A utilização da técnica de imobilização de enzimas fornece excelentes vantagens como capacidade de recuperação do produto com maior pureza, a possibilidade de reaproveitamento do biocatalisador devido à característica heterogênea, o aumento da estabilidade da enzima, menor custo de produção e aumento da atividade, especificidade e seletividade, redução da inibição e facilidade de separação (D'SOUZA, 1998; DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; NARWAL et al., 2016).

A massa molecular das lipases pode variar entre 20 e 75 kDa depende da fonte, a melhor faixa de atividade e estabilidade no pH está entre 4 a 9 com a temperatura variando entre 25 a 70 °C (de CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004).

As lipases mais estudadas são as produzidas intra ou extracelularmente por micro-organismos, como *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. A produção da lipase comercial Novozym 435® de *Candida antarctica*, ocorre através da fermentação submersa de

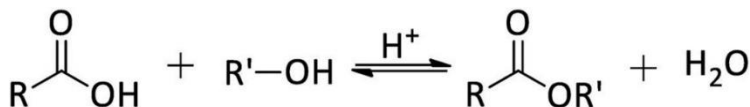
um micro-organismo geneticamente modificado (*Aspergillus oryzae*). A enzima purificada é imobilizada na resina acrílica macroporosa Lewatit VP OC 1600 e desenvolvida pela Bayer AG para a Novozym 435®; Lipozyme RMIM® é produzida por *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina de troca iônica, o suporte desta enzima imobilizada é o Duolite ES 562, que é uma resina de troca aniônica fraca baseada em copolímeros de fenol-formaldeído e tem sido usada em muitos processos químicos; Lipozyme TLIM® produzida através do fungo *Thermomyces lanuginosus* e imobilizada em resina fenólica granulada e a NS 88011 é uma lipase de *Candida antarctica* (CAL B) imobilizada em uma resina polimérica hidrofóbica, preparada com um material de baixo custo (PENG et al., 2002; HERNÁNDEZ-MARTÍN; OTERO, 2008; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Essas enzimas podem funcionar como ingredientes ativos na produção de cosméticos e também tem a função de biocatalisador na síntese de produtos químicos específicos (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013). As indústrias de cosméticos e perfumaria desenvolveram processos químicos que utilizam lipases para a produção de aromas, emulsificantes, emolientes e surfactantes que fazem parte da composição química de loções, cremes, shampoos (LEAL, 2000).

3.1.2. REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

A reação de esterificação consiste na obtenção de ésteres através da reação reversível de um ácido carboxílico com um álcool, com formação de éster e de água como subproduto em processos industriais, esse é o método mais comum e, portanto, o mais utilizado, como pode ser observado na Figura 1 (RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009; SERRA, 2010).

Figura 1 - Reação de esterificação.



Fonte: Autora (2019).

A síntese de ésteres envolve reações com velocidade muito baixa, por isso é necessário a utilização de um catalisador como os ácidos, as bases ou as lipases (CARDOSO, 2008; SKORONSKI et al., 2010;

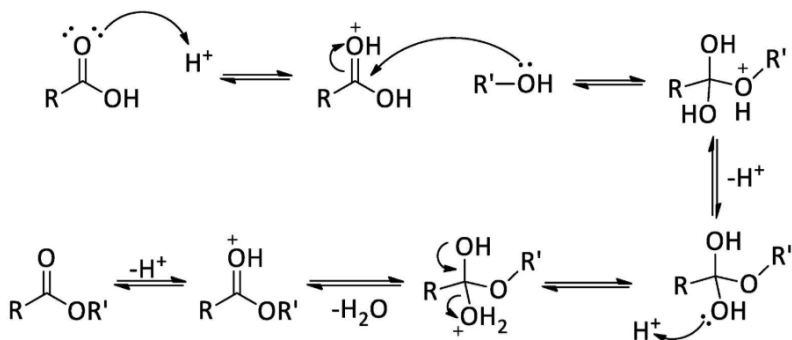
CALVALCANTE et al., 2015). No caso do uso de biocatalisadores, as lipases atuam no meio reacional para que ocorra o aumento da velocidade (ABBAS; COMEAU, 2003; CARDOSO, 2008).

A reação de ácido com álcool é uma reação de equilíbrio, pois no sentido direto conduz à formação de éster e no sentido inverso leva à hidrólise dos mesmos. Para deslocar a reação no sentido da formação do éster, pode utilizar-se um excesso de um dos reagentes ou remover um dos produtos à medida em que ocorre a reação (NEVES, 2008; CALVALCANTE et al., 2015; PEREIRA et al., 2018).

Esse tipo de reação, ocorre através do mecanismo no qual, o ácido carboxílico é protonado através de um ácido de Brønsted, facilitando o ataque nucleofílico do álcool na carbonila, e assim, formando um intermediário tetraédrico que posteriormente sofre um rearranjo, seguido da perda de uma molécula de água e formando uma molécula de éster (CARDOSO, 2008).

Esse mecanismo de reação para a formação de ésteres a partir de ácidos carboxílicos e álcoois na presença de catalisador ácido foi demonstrado por Solomons e Fryhle (2009), como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Mecanismo geral da reação de esterificação de Fischer.



Fonte: Autora (2019).

Na esterificação direta, os catalisadores mais utilizados são os ácidos de Brønsted (ULLMANN'S ENCYCLOPEDIA OF TECHNICAL CHEMISTRY, 1996). Entretanto, a esterificação normalmente é mais lenta quando utilizados álcoois de cadeia longa ou álcoois terciários. Nesses casos os ácidos mais utilizados

industrialmente são: ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico e entre outros (HOYDONCKX et al., 2004).

Atualmente existem pesquisas com o intuito de substituir o uso desse tipo de reação, pois a reação de esterificação de Fischer, que também é conhecida como esterificação tradicional e utiliza catalisadores inorgânicos que tem como desvantagens a difícil separação e alto valor do produto, perda do catalisador, a toxicidade, bem como, as preocupações ambientais e de segurança (YADAV; RAHUMAN, 2002; BUSCA, 2007).

Por isso o uso de biocatalisadores pode ser uma alternativa verde, pois ele pode ser reutilizado, sendo viável economicamente. Realiza reações de esterificações em baixas temperaturas e condições reacionais mais brandas, podendo também usar quantidades equimolares de reagentes, ao invés de utilizar excessos de um deles ou dos dois (OTERA, 2001).

3.1.3. ÉSTERES

Os ésteres são componentes importantes nos aromas naturais e fazem parte da acentuação dos aromas em diversos alimentos e cosméticos (KHAN; RATHOD, 2015). São compostos derivados dos ácidos carboxílicos pela substituição do hidrogênio da carboxila por radical orgânico. Possuem baixa polaridade e ponto de ebulição menor que o dos ácidos carboxílicos, com o peso molecular semelhante e podem ser sintetizados através de reação entre um ânion carboxilato e um haleto de alquila ou pela reação de esterificação de Fischer, a segunda obtém maior viabilidade de aplicação na síntese de flavorizante (COSTA et al., 2004).

Segundo McMurry (1997) e Oliveira et al. (2014), Fischer e Speier verificaram que é possível fazer a obtenção de ésteres através do aquecimento de um ácido carboxílico e um álcool na presença de catalisador ácido, esta reação passou a ser chamada de reação de esterificação de Fischer.

Esse método gera resíduos tóxicos e, portanto, produtos produzidos por ele não são bem vistos pelos consumidores, devido a ocorrer o aumento do consumo de cosméticos e a preocupação com a composição química desses produtos vem sendo prioridade na buscar por produtos naturais e livres de toxicidades (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2016).

Atualmente, as indústrias têm buscado fazer o uso de ésteres que tenham sido produzidos através de métodos microbianos ou enzimáticos,

pois eles são considerados ésteres naturais, sendo mais atrativos comercialmente (LESZCZAK; TRAN-MINH, 1998; TOMKE; RATHOD, 2015). Existe uma pressão feita pelos órgãos legislativos e ambientais, que juntamente com a consciência ambiental dentro da indústria química, levou a busca massiva de novos processos ecológicos, que sirvam como substitutos das reações inaceitáveis ambientalmente (YADAV; RAHUMAN, 2002).

Com o aumento da procura de produtos verdes, a indústria de alimentos também está interessada no uso da rota biotecnológica para produção de ésteres aromatizantes (DRAKE; THAKARE; BHANAGE, 2013).

A busca por esses produtos mostrou que para competir no setor HPPC e na indústria alimentícia é necessário investimentos em pesquisas que visem o uso de métodos alternativos como o da produção de ésteres via enzimática, que faz o uso de enzimas como as lipases oferecendo um produto final de baixo custo e de alto rendimento (FERRAZ et al., 2015).

3.1.4. A UTILIZAÇÃO DE ÉSTERES NAS INDÚSTRIAS

Os ésteres possuem importantes aplicações em setores indústrias, a indústria alimentícia utiliza os ésteres como flavorizantes que são substâncias que apresentam sabor e aroma característicos que geralmente são agradáveis, e quando adicionadas em pequenas quantidades aos alimentos, proporciona características degustativas e olfativas (COSTA et al., 2004).

Na maioria das vezes, são aditivos para destacar o aroma de uma bebida ou de um alimento. O aroma encontrado em alimentos industrializados geralmente é obtido por substâncias sintéticas (NASCIMENTO et al., 2009; CALVALCANTE et al., 2015).

O éster é um dos compostos mais comuns encontrados na natureza em gorduras e óleos, como azeite de oliva e margarina e nas ceras de abelha. A utilização dos ésteres na preparação de extratos artificiais é de grande importância, pois eles são aplicados na fabricação de xaropes, doces, pastilhas, refrescos (OLIVEIRA et al., 2004). A Tabela 1 mostra alguns ésteres e suas respectivas aplicações na indústria.

Tabela 1 - Ésteres e suas respectivas aplicações na indústria.

Composto	Aplicação
Oleato de Etilenoglicol e Estearato de Benzila	Em formulação de cosméticos, perfumes, shampoos, produtos de banho, produtos de limpeza pessoal.
Acetato de Metilo	Solvente de tintas, colas e removedores de verniz. Reações químicas e extrações.
Acetato de Etila	Solvente de tintas, colas e removedores de verniz. Reações químicas e extrações
Pentanoato de Etilo	Aroma alimentar (maçã).
Acetato de Pentilo	Fragrância (maçã, banana).
Fenilacetato de Metilo	Fragrância (mel).
Ácido Acetilsalicílico	Fármaco.
Polimetacrilato de Metila	Fabricação de fibras acrílicas para lentes de contato e filmes transparentes.
Poliacetato de Vinila	Fabricação de película para vidros à prova de choques em veículos. Fabricação de fixador para tintas.
Politereftalato de Etileno	Fabricação de filmes para produção de garrafas plásticas tipo PET.

Fonte: Adaptado de ANTUNES (2009).

Existem muitos ésteres que também são encontrados na composição de polímeros, como o éster polivinílico que faz parte da composição de tintas na forma de emulsões, o poliéster utilizado na fabricação de tecidos, outro polímero muito conhecido é o politereftalato de etileno (PET) (PEREIRA; MACHADO; SILVA, 2002). Na indústria farmacêutica os ésteres como o acetato de benzila estão presentes em medicamentos para dar o sabor artificial de cereja, abricó e morango (BALBANI et al., 2006). Fazem parte do revestimento de cápsulas e também da composição química do princípio ativo (MENEGATTI; FRAGA; BARREIRO, 2001).

A indústria cosmética utiliza uma variedade de substâncias químicas nas formulações, que são utilizadas como espessantes, emolientes, doadoras de espuma, emulsionantes, que são indispensáveis na formulação de shampoos, condicionadores, sabonetes líquidos, como

perfumes, hidratantes corporais, creme facial, gel de banho e outros produtos. Esse ramo é importante para as atividades relacionadas a cuidados com o corpo, tais como limpeza, amolecimento, beleza e odor (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013; KHAN; RATHOD, 2015).

3.1.5. ÁCIDO GRAXOS

Os ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos de cadeia normal que apresentam o grupo carboxila ($-COOH$), substâncias orgânicas de origem vegetal ou animal que formam os óleos e as gorduras, possuem moléculas formadas por cadeias de carbono que podem ser longas ou curtas e se ligam aos átomos de hidrogênio através de pelo menos um radical ácido em suas extremidades (HOLMAN; RAHM, 1971).

Um ácido graxo é formado por uma série de átomos de carbono, unidos uns aos outros por ligações simples (saturadas) ou duplas (insaturadas), com um grupo carboxil e uma cauda hidrocarbonada chamada de grupo metil. Os ácidos graxos apresentam diferentes tamanhos de cadeia de 3 a 24 átomos de carbono (MOREIRA; CURY; MANCINI FILHO, 2002; MANHEZI; BACHION; PEREIRA, 2008).

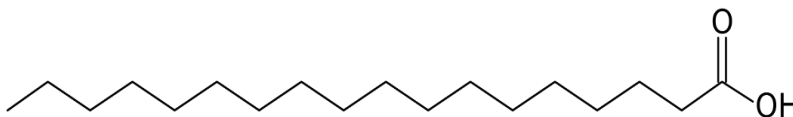
Os ácidos graxos são substâncias livres ou esterificadas que ocorrem na natureza, a maior parte se encontra esterificada a exemplo disso se tem o glicerol, que forma triglicerídeos, que são componentes dos óleos e gorduras comestíveis (MANHEZI; BACHION; PEREIRA, 2008; PEREIRA et al., 2018).

Eles podem ser encontrados de várias formas, mas as principais são saturadas e insaturadas, as saturadas ocorrem quando os carbonos apresentam ligações simples e as insaturadas, apresentam uma única dupla ligação na estrutura. As três principais funções são: atuam como precursores de mensageiros intracelulares; são oxidados gerando adenosina trifosfato (ATP) e são componentes estruturais das membranas biológicas (FERREIRA et al., 2012).

3.1.6. ÁCIDO ESTEÁRICO

O ácido esteárico (ou ácido octadecanóico $-C_{18}H_{36}O_2$), é o ácido saturado de maior massa molecular dos ácidos graxos, possui uma cadeia longa que consiste de 18 átomos de carbono sem duplas ligações (PEARSON, 1993), possui massa molar 284,48 g/mol, ponto de fusão $70 - 71^{\circ}C$ e densidade 941 kg/m^3 . O ácido esteárico é um pouco duro, branco ou levemente amarelado, sólido cristalino brilhante, tem um leve odor, textura e o sabor parecido com sebo.

Figura 3 - Fórmula estrutural do ácido esteárico



Fonte: Autora (2019).

Está presente em abundância em muitos alimentos, como as carnes vermelhas e os produtos lácteos contendo gordura, sendo as principais fontes da dieta dos seres humanos. É encontrado também no óleo de palma no qual contém cerca de 2 a 6 % de ácido esteárico; na grande maioria dos óleos conhecidos como óleo amarelo (caroço de algodão, milho, soja) contém de 2 a 8 % de ácido esteárico em sua composição; no cacau e na manteiga de 30 a 35 % (MARKLEY, 1960). Esse ácido tem muitas das características desejáveis dos ácidos graxos saturados de cadeias longa, como sabor e textura.

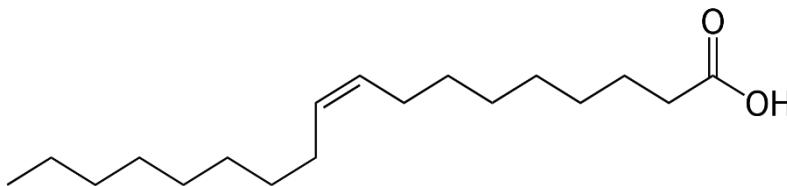
Embora esteja presente em poucas espécies de plantas e animais, geralmente em pequenas quantidades em relação ao ácido palmítico, ainda assim nos dias atuais o ácido esteárico apresenta uma considerável importância comercial. É o ácido mais utilizado na área cosmética como espessante, usado como emulsificante e agente solubilizante para a elaboração de cremes, artigos de borracha, revestimentos protetores, resinas, estearatos, cosméticos, lubrificantes e produtos têxteis (HANDBOOK, 2000).

Na indústria farmacêutica é utilizado como lubrificante de cápsulas (IRANLOYE; PARROTT, 1978). Além do que, também é usado na forma de derivados, como na produção de sabonetes e sais metálicos (MARKLEY, 1960).

3.1.7. ÁCIDO OLEICO

O ácido oleico (ou ácido octadec-9-enóico – $C_{18}H_{34}O_2$), possui massa molar igual a 282,46 g/mol, ponto de fusão 34 – 38 °C e densidade 0,895 g/mL (PUBCHEM, 2018). É um ácido graxo insaturado essencial de cadeia longa e o mais abundante na natureza, rico em óleos e gorduras (HMDB, 2018). Denominado Ômega 9 que participa do nosso metabolismo, desempenhando papel fundamental na síntese dos hormônios, sendo um líquido incolor a amarelo claro com um odor suave, embora algumas amostras comerciais possam ser bem amareladas (PUBCHEM, 2018).

Figura 4 - Fórmula estrutural do ácido oleico.



Fonte: Autora (2019).

Este ácido é utilizado comercialmente na preparação de oleatos e loções e como solvente farmacêutico. É um produto emoliente, muito utilizado como aditivo em base de sabões, sabonetes. Na indústria cosmética em cremes e emulsões, bronzeadores, produtos solares, entre outros. Apresenta variada aplicação industrial: lubrificantes, desengraxante, plastificantes, entre muitas outras (CARRASCO, 2009; CAMEO, 2018).

3.1.8. ÁLCOOIS

Os álcoois são compostos orgânicos que compõe um ou mais grupos de hidroxila (OH) ligado diretamente a átomos de carbono saturado (que realiza somente ligações simples) de uma cadeia carbônica (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013), e pode ser genericamente representado por R-OH (R é um radical alquilo). A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) organização que define as regras de nomenclatura química atribui a terminação – OL para os álcoois.

Os álcoois podem ser classificados de acordo com o número de hidroxilas (mono, di-, tri-, poli) ou pelo tipo de ligação do carbono ligado a hidroxila (primário, secundário, terciário). A nomenclatura prática para álcoois de uma hidroxila, é dada por: álcool + radical + iço.

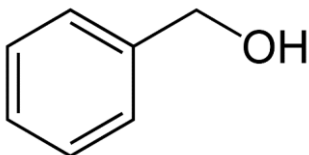
No Brasil os álcoois mais utilizados são, o metanol que é amplamente aplicado na produção de biodiesel em escala comercial e biomassa e o etanol proveniente da biomassa (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). Neste trabalho os álcoois utilizados para a esterificação enzimática foram, o álcool benzílico e monoetilenoglicol.

3.1.9. ÁLCOOL BENZÍLICO

O álcool benzílico é um composto orgânico com a fórmula C_7H_8O , possui massa molar igual a 108,14 g/mol, ponto de fusão -15,3

°C e densidade 1,04 g/cm³. É um álcool aromático e incolor, parcialmente solúvel em água e completamente solúvel em álcoois e éter dietílico.

Figura 5 - Fórmula estrutural do álcool benzílico



Fonte: Autora (2009).

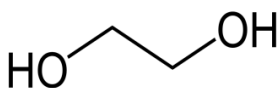
Utilizado em diversas formulações cosméticas como um componente de fragrâncias, conservante para produtos oftálmicos, injetáveis, orais e tópicos, solvente geral para tintas, lacas e revestimentos, a base de resinas epóxi e agente de diminuição da viscosidade, devido a sua polaridade, baixa toxicidade, e baixa pressão de vapor. É também um precursor para uma variedade de ésteres, usados em sabões e flavorizantes, assim como na síntese de fármacos (NAIR, 2001; SCOGNAMIGLIO et al., 2012).

Segundo a resolução da ANVISA (RDC N° 162) sua concentração máxima de uso é 1,0% para aplicações em cosméticos. Apresenta incompatibilidade com tensoativos não-iônicos e agentes oxidantes, e atua em pH ótimo de aproximadamente 5,0 (ABRUTYN, 2010).

3.1.8. ÁLCOOL MONOETILENOGLICOL

É um diol simples desenvolvido via saponificação do diacetato de etilenoglicol com hidróxido de potássio, um composto orgânico com a fórmula C₂H₆O₂ (Figura 6), possui massa molar igual a 62,07 g/mol, ponto de fusão -12,9 °C e densidade 1,11 g/cm³. Possui propriedades devido a sua estrutura que é composta por dois grupos de hidroxilas (OH), que ficam localizados nas adjacências da cadeia carbônica.

Figura 6 - Fórmula estrutural do álcool benzílico.



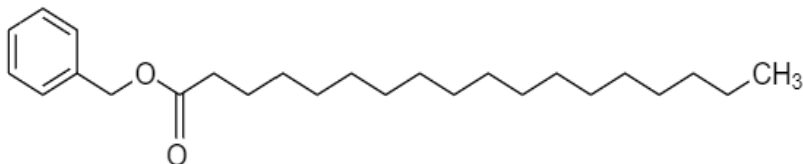
Fonte: Autora (2009).

É incolor, inodoro, não volátil, possui sabor doce e pouca viscosidade. Sendo miscível com muitos solventes polares, como álcool e água, só é solúvel em solventes polares como benzeno (YUE et al., 2012).

3.1.9. ESTEARATO DE BENZILA

O estearato de benzila (ou éster etílico do ácido esteárico – $C_{25}H_{42}O_2$), possui massa molar igual a 374,60 g/mol e ponto de fusão 34 - 38 °C, representado na Figura 7.

Figura 7 - Fórmula estrutural do éster estearato de benzila.



Fonte: Autora (2019).

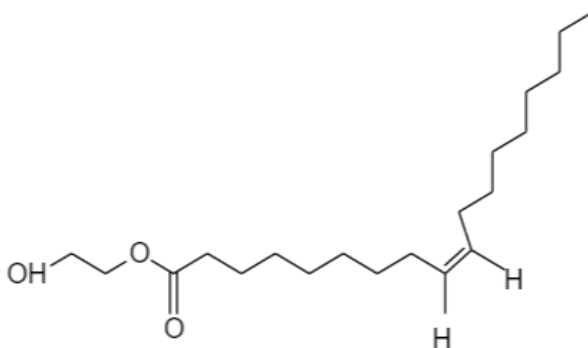
É um derivado de ácidos graxos utilizado como um éster sintético e por isso é aplicado em indústria de cosméticos, alimentícias, farmacêuticas, entre outras, sendo responsável pelo odor e sabor agradáveis de medicamentos, alguns alimentos, bebidas alcoólicas como destilados, pelo aroma dos perfumes, hidratantes e shampoos (MARKLEY, 1960; HUA et al., 2006).

É um emoliente, ou seja, um composto que tem propriedades amaciantes que lubrificam e hidratam a pele, além de aliviar a irritação da pele e das membranas mucosas. O termo emoliente seco é utilizado para descrever a presente invenção que suaviza, lubrifica, hidrata a pele, mas o faz sem exibir oleosidade e pegajosidade (PUBCHEM, 2019).

3.1.10. OLEATO DE ETILENOGLICOL

O oleato de etilenoglicol (ou 2-hidroxietyl (Z) -octadec-9-enoato – $C_{20}H_{38}O_3$), tem a massa molar 326,521 g/mol, é um éster de monoetilenoglicol e ácido oleico, representado na Figura 8.

Figura 8 - Fórmula estrutural do éster oleato de etilenoglicol.



Fonte: Autora (2009).

É um agente de condicionamento da pele, estabilizador de emulsão e um emoliente muito utilizado em indústrias na formulação de cosméticos, shampoos, produtos de banho, produtos de limpeza pessoal e outros produtos para cuidados com a pele e cabelos. Agente opacificante e perolizante proporciona toque macio e sedoso às emulsões, shampoos e sabonetes líquidos (CAMEO, 2018).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos todos os materiais, metodologias e equipamentos empregados para a realização dos ensaios. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Engenharia Biológica pertencente ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), cidade Florianópolis, Santa Catarina.

4.1. MATERIAIS

4.1.1. CATALISADORES ENZIMÁTICOS

Foram utilizadas quatro lipases comerciais de origem microbiana:

Novozym 435® - lipase CAL B imobilizada em um suporte hidrofóbico (resina acrílica macroporosa) e produzida por fermentação submersa. O produto é uma lipase produzida a partir de *Candida antarctica*, gentilmente cedida pela Novozym 435® Brasil/Araucária – PR. O produto é constituído por partículas de formato esferoidal, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, densidade de aproximadamente 430 kg/m³ e conteúdo de água entre 1-2%. Segundo o fabricante, é uma lipase termoestável e pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40 - 70 °C (NOVO NORDISK, 1992).

NS 88011 - lipase de *Candida antarctica* (CAL B) imobilizada em uma resina polimérica hidrofóbica (PEREIRA et al., 2018). Essa lipase é uma nova preparação imobilizada com um material de baixo custo, mas outras informações técnicas sobre este produto não estão disponíveis no fabricante (HOLZ et al., 2018).

Lipozyme® TLIM - lipase originária de *Thermomyces lanuginosus* (TL) (lipase do fungo geneticamente modificado, produzida em fermentação submersa, purificada e imobilizada em sílica). É um biocatalisador imobilizado em silicato catiônico via troca aniônica (PENG, 2002), que tem a estrutura bem conhecida e a enzima tem uma tampa grande, fazendo com que seja capaz de isolar completamente o centro ativo do meio de reação na forma fechada, por isso é muito utilizado em múltiplas reações (MARTINS et al., 2014).

Lipozyme® RMIM - lipase produzida por fermentação submersa de *Rhizomucor miehei* (RM) e imobilizada em resina de troca iônica, tem especificidades nas posições 1,3 de triglicérides (MARTINS et al., 2014;

HOLZ et al., 2018). Tem sido amplamente aplicada na indústria alimentar, síntese orgânica, produção de produtos farmacêuticos e campos de biodiesel (MACARIO et al., 2008; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

4.1.2. REAGENTES

Para as reações de esterificação foram utilizados os reagentes a seguir:

- Ácido esteárico vegetal (ALMAD, óleos gorduras e derivados - Brasil);
- Álcool benzílico (P.A, Vetec);
- Ácido oleico puro (P.A, Vetec);
- Álcool monoetilenoglicol (P.A, Vetec).

Para a quantificação de índice de acidez foi pelo método AOCS Cd 3d-63, e utilizou-se os seguintes reagentes:

- Álcool etílico (99,8% de pureza, Vetec);
- Hidróxido de potássio (P.A, Vetec);
- Solução alcóolica de fenolftaleína (10%).

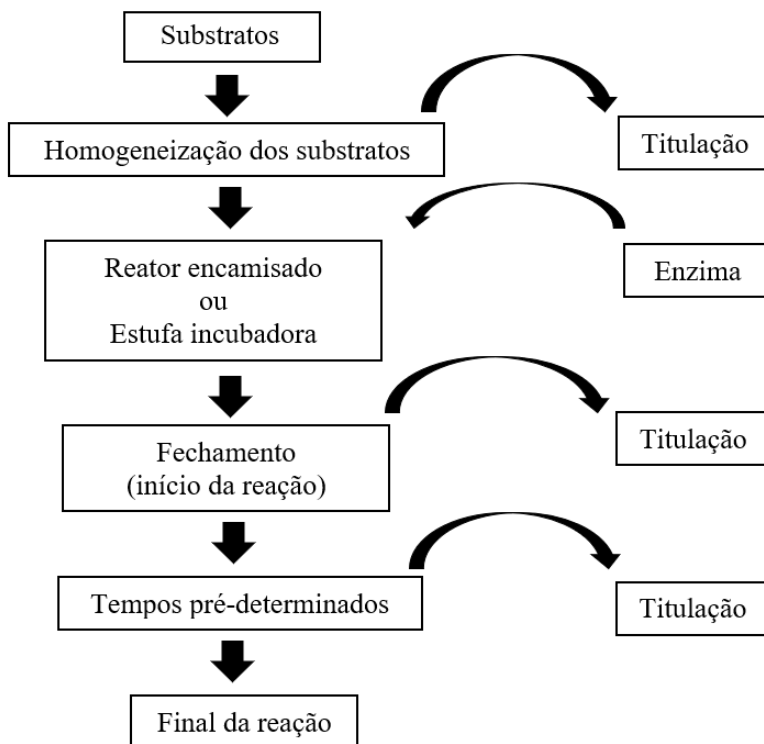
No processo de recuperação do catalisador enzimático:

- n-hexano (P.A, Vetec);

4.2 MÉTODOS

A Figura 9, apresenta um fluxograma com todas as etapas do processo para a obtenção de ésteres enzimaticamente.

Figura 9 - Representação esquemática das etapas experimentais.



4.2.1 SÍNTESE DO OLEATO DE ETILENOGLICOL

Para os experimentos da produção do oleato de etilenoglicol, utilizou-se o mesmo sistema utilizado por Pereira et al. (2018), sendo composto por um reator encamisado de 150 mL com agitação mecânica (IKA RW 20) e haste agitadora de quatro pás em forma de hélice (R 1342). A temperatura foi controlada por um banho termostático (TECNAL TE-184), como apresentado nas imagens das Figuras 10 e 11.

Figura 10 - Reator encamisado com agitação mecânica, acoplado ao banho termostático.



Fonte: Autora (2019).

Figura 11 - Haste agitadora de quatro pás em forma de hélice (R 1342) com diâmetro do eixo de 8 mm.



Fonte: Autora (2019).

Adicionou-se o ácido oleico e o álcool monoetilenoglicol e após a solubilização completa realizada através da agitação mecânica e temperatura, retirou-se uma alíquota com cerca de 1 g da amostra para a determinação do índice de acidez inicial, sem a presença da lipase, e então

era adicionado o biocatalisador NS 88011, depois os reatores foram colocados em agitação mecânica constante e as alíquotas eram retiradas no tempo de 24 h de reação, para verificar a conversão.

4.2.1.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

A otimização do processo de esterificação para a produção do éster foi feita realizando um planejamento fatorial completo 2^3 , onde foram estudadas as variáveis temperatura (40 – 70 °C), agitação (200 - 600 rpm) e razão molar entre o ácido e álcool (1:2 - 1:6) (Tabela 2). Todos os experimentos foram realizados em duplicatas totalizando 22 ensaios que estão descritos na matriz de planejamento com valores codificados e reais com as respostas de cada variável estudada (ANOVA - Tabela 4).

Os valores das variáveis foram selecionados em função do planejamento descrito na Tabela 2. O tempo de reação e concentração de lipase foram fixados em 24 h, e 1%(m/m) de lipase em relação a massa do substrato, respectivamente.

Tabela 2 - Níveis codificados e valores reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo 2^3 .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	40	55	70
Agitação (rpm)	200	400	600
Razão molar (ácido: álcool)	1:2	1:4	1:6

4.2.1.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

Visando à redução da concentração da lipase, foi realizada a avaliação cinética variando a concentração de enzimas na condição otimizada obtida no planejamento experimental para a síntese do oleato de etilenoglicol. A temperatura utilizada foi de 70 °C, com agitação de 600 rpm e razão molar de substratos de 1:2. Foram estudadas variações na concentração enzimática de 0,6%, 0,8%, 0,9% e 1,0% (m/m) de lipase em relação a massa do substrato.

4.2.1.3. REÚSO DO CATALISADOR ENZIMÁTICO

Na condição otimizada do planejamento de experimentos foi realizado estudo do reúso do biocatalisador. As condições utilizadas

foram: 1% (m/m) de lipase NS 88011 em relação a massa total do substrato, temperatura de 70 °C, razão molar de 1:2, agitação de 600 rpm e 48 h de reação.

Após cada reação a lipase foi recuperada para uso no próximo ciclo de uso. A reutilização do biocatalisador foi baseada no método desenvolvido por Castro e Anderson (1995). A lipase foi separada do meio reacional através de filtração a vácuo, para cada recuperação foram realizadas 3 lavagens com n-hexano com o objetivo de remover vestígios remanescentes da reação anterior, para cada lavagem utilizou-se 20 mL de n-hexano, e a secagem ocorreu em estufa a 40 °C por 4 h. Após esta etapa, a lipase foi mantida em dessecador, utilizando gel de sílica azul como agente secante, por no mínimo 12 h e então usada em uma nova reação. O índice de acidez foi medido no início e ao final de cada ciclo.

4.2.1.4. SÍNTESE DO ESTEARATO DE BENZILA

Para os experimentos da produção do estearato de benzila, utilizou-se uma estufa incubadora com agitação orbital MA 410 e controle de temperatura, (Figura 12).

Figura 12 - Estufa incubadora com agitação orbital MA 410 – MARCONI.



Fonte: Autora (2019).

Para a identificação da melhor lipase para a produção do éster estearato de benzila, foram realizados testes com quatro lipases comerciais imobilizadas a Lipozyme TLIM®, Lipozyme RMIM®, NS 88011 e Novozym 435®, todas as reações foram feitas nas mesmas condições, a temperatura de 60 °C, agitação de 200 rpm, razão molar 1:5 (ácido:álcool), 1% (m/m) de lipase em relação a massa total do substrato com duração de 6 h.

Adicionou-se o ácido esteárico e o álcool benzílico e após a solubilização completa, retirou-se uma alíquota com cerca de 1 g da amostra para a determinação do índice de acidez (tempo zero), a reação sem a presença da enzima (branco) e então era adicionado o biocatalisador, depois os frascos de vidro âmbar foram levados para estufa incubadora com agitação orbital, e as alíquotas eram retiradas no

tempo de 6 h de reação, para verificar qual a melhor enzima para o sistema através da conversão do substrato em éster.

Após, foi realizada cinética para avaliação do efeito da razão molar entre os substratos, mantendo fixas a temperatura de 60 °C, a agitação de 200 rpm, a quantidade de lipase Novozym 435® em 1% (m/m) em relação a massa do total de substrato; e variando a razão molar entre o álcool e o ácido nas proporções de 1:1; 1:3; 1:5 e 1:7. Os tempos selecionados para análise do índice de acidez na cinética foram: 0, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 90, 120, 180, 300, 420, 600 e 1140 minutos.

4.2.1.5. ÍNDICE ACIDEZ

O índice de acidez foi realizado pelo método AOCS Cd 3d-63, que consiste em uma titulação volumétrica do tipo ácido-base que utiliza o indicador fenolftaleína, a variação do consumo da base na titulação volumétrica é um indicativo da conversão do ácido graxo em éster ao longo do tempo. A acidez livre é expressa pela percentagem de ácidos graxos livres de uma gordura ou óleo (GONÇALVES, 2007).

A partir dos valores de volume de hidróxido de potássio gasto na titulação, é possível determinar a quantidade de ácidos graxos livres e o índice de acidez, este índice fornece a quantidade de ácido que foi consumido na reação de esterificação. Primeiro, diluí-se em 20 mL de etanol aproximadamente 1 g da amostra e adicionava-se 3 gotas de fenolftaleína 10%. Então esta mistura era titulada com hidróxido de potássio (KOH) 0,1 M, sob agitação constante até a sutil mudança da cor para rósea. O índice de acidez foi determinado antes e após as reações de esterificação e calculado de acordo com Equação 1:

$$IA = \frac{(V_{KOH} \cdot MM_{KOH} \cdot C_{KOH})}{M_A} \quad (1)$$

Onde:

IA = Índice de acidez (mg KOH/g).

V_{KOH} = Volume de KOH gasto na titulação (mL).

MM_{KOH} = Massa molar de KOH (56,1 g/mol).

C_{KOH} = Concentração molar do KOH usado na titulação (mol/L).

M_A = Massa de amostra utilizada para titular (g).

4.2.1.6. CÁLCULO DA CONVERSÃO ÁCIDO GRAXO EM PRODUTO

O cálculo da conversão foi realizado a partir dos valores de índices de acidez inicial e final das reações, para determinar o percentual de conversão dos ácidos graxos em ésteres na reação de esterificação de acordo com a Equação 2 descrita a seguir:

$$X_{AE}(\%) = \frac{(IA_{inicial} - IA_{final})}{IA_{inicial}} * 100 \quad (2)$$

Onde:

X_{AE} = Conversão dos ácidos graxos em ésteres (%).

$IA_{inicial}$ = Índice de acidez inicial (mg KOH/g).

IA_{final} = Índice de acidez final (mg KOH/g).

O índice de acidez inicial é medido a partir da amostra da mistura reacional que é retirada no início das reações sem enzima, onde encontra-se uma mistura homogeneizada dos reagentes utilizados.

4.2.1.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística relacionada com os efeitos estimados de cada variável e otimização dos processos foi realizada através do erro padrão relativo entre os dados experimentais e os preditos. A formulação do modelo híbrido foi verificada por meio do coeficiente de correlação (r) e análise de variância (ANOVA). Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica versão 8.0 (Statsoft Inc, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OLEATO DE ETILENOGLICOL

5.1.1. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ESTERIFICAÇÃO

A matriz de planejamento com valores codificados e reais e as respostas de cada variável estudada para a conversão de ácido oleico em oleato de etilenoglicol está representada na Tabela 3, avaliando-se o efeito da razão molar, temperatura e agitação sobre a conversão do ácido oleico.

Tabela 3 - Matriz de planejamento experimental 2³ (valores codificados e reais) com respostas em termos de conversão de ácido oleico em oleato de etilenoglicol em 24 h de reação, usando 1% (m/m) de lipase NS 88011 em relação a massa total de substrato nas condições: temperatura de 70 °C, 600 rpm e razão molar ácido oleico:álcool monoetilenoglicol 1:2.

Ensaio	RM	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Conversão experimental (%)	Conversão prevista (%)	Erro relativo (%)
1	-1 (1:2)	-1 (40)	-1 (200)	48	52	-9,67
2	-1 (1:2)	-1 (40)	-1 (200)	55	52	4,29
3	1 (1:6)	-1 (40)	-1 (200)	44	39	9,36
4	1 (1:6)	-1 (40)	-1 (200)	41	39	2,73
5	-1 (1:2)	1 (70)	-1 (200)	78	75	2,72
6	-1 (1:2)	1 (70)	-1 (200)	79	75	3,95
7	1 (1:6)	1 (70)	-1 (200)	75	79	-5,49
8	1 (1:6)	1 (70)	-1 (200)	81	79	2,32
9	-1 (1:2)	-1 (40)	1 (600)	66	64	1,73
10	-1 (1:2)	-1 (40)	1 (600)	69	64	6,00
11	1 (1:6)	-1 (40)	1 (600)	52	50	2,65
12	1 (1:6)	-1 (40)	1 (600)	47	50	-7,70
13	-1 (1:2)	1 (70)	1 (600)	85	85	-0,73
14	-1 (1:2)	1 (70)	1 (600)	84	85	-1,93
15	1 (1:6)	1 (70)	1 (600)	88	87	0,70
16	1 (1:6)	1 (70)	1 (600)	92	87	5,02
17	0 (1:4)	0 (55)	0 (400)	68	67	1,47
18	0 (1:4)	0 (55)	0 (400)	66	67	-1,52

19	0 (1:4)	0 (55)	0 (400)	65	67	-3,08
20	0 (1:4)	0 (55)	0 (400)	63	67	-6,35
21	0 (1:4)	0 (55)	0 (400)	67	67	0,00
22	0 (1:4)	0 (55)	0 (400)	61	67	-9,84

*RM = razão molar entre o ácido e o álcool.

Na Tabela 3 é possível destacar a reprodutibilidade dos ensaios, pois apresentaram valores muito próximos nos pontos centrais dos ensaios (17 a 22). O desvio padrão amostral do ponto médio foi calculado para medir a dispersão dos resultados, e assim foi obtido um valor de 2,6, mostrando que os pontos estão próximos e, portanto, não houve grande diferença entre os mesmos.

Nota-se também o comportamento das reações com a temperatura; verifica-se que quando fixados a razão molar e a agitação, o aumento da temperatura influencia de maneira positiva a produção do éster: quanto maior é a temperatura, maiores são as conversões em ésteres em 24 h. Isso pode ser observado nos ensaios 10 e 13, que possuem razão molar 1:2 e a agitação 600 rpm fixadas. No ensaio 10 a temperatura utilizada foi de 40 °C e o valor de conversão foi de 69%, enquanto que no ensaio 13 a temperatura utilizada foi de 70 °C e o valor de conversão foi de 85%. Com o aumento da temperatura, houve um crescimento de 23% na conversão. Este comportamento também pode ser observado pelos ensaios 11 e 16, que tiveram a razão molar e a agitação fixadas em 1:6 e 600 rpm, respectivamente. No ensaio 11 a temperatura utilizada foi de 40 °C e o valor de conversão foi de 47%, enquanto que no ensaio 16 a temperatura utilizada foi de 70 °C e o valor de conversão foi de 92%, mostrando que com o aumento da temperatura houve um crescimento de 96% da conversão. As reações com temperaturas elevadas melhoram a solubilidade dos substratos e reduz a viscosidade, e desse modo evita que ocorra uma limitação de transferência de massa (DAVE et al., 2006; MOHAMAD et al., 2015).

A influência da razão molar pode ser verificada quando os valores de temperatura e agitação são fixados; ao analisar os ensaios 13 e 16 que tiveram a temperatura e a agitação fixadas em 70 °C e 600 rpm, respectivamente, todas as razões molares obtiveram boas conversões do ácido. O ensaio 13 com a razão de 1:2 (ácido oleico:álcool monoetilenoglicol) apresentou cerca de 85% de conversão, enquanto que o ensaio 16 com a razão molar de 1:6 (ácido oleico:álcool monoetilenoglicol) foi obtido um valor de conversão de 92%; ambos foram resultados satisfatórios. Entretanto, os ensaios 10 e 11 que tiveram a temperatura e a agitação fixadas em 40 °C e 600 rpm mostram que a menor razão molar influenciou positivamente a obtenção de altas conversões do éster. O ensaio 10 com a razão de 1:2 (ácido oleico:álcool monoetilenoglicol) apresentou cerca de 69% de conversão, enquanto que o ensaio 11 com a razão molar de 1:6 (ácido oleico:álcool monoetilenoglicol) foi obtido um valor de conversão de 52%; portanto, com a menor razão molar foi alcançado a maior conversão. Isso indica

que possivelmente o álcool tenha um efeito inibitório quando se trabalha em temperaturas mais baixas.

A maior conversão ocorreu no ensaio 16, porém utilizou-se o ensaio 13 para dar continuidade ao trabalho, assim como em Sá et al. (2018), que também usou a menor razão molar, com o intuito de superar as desvantagens relacionadas ao excesso de álcool no meio reacional e manter o mínimo de desperdício de reagente que ocorre quando se utiliza maiores razões molares. O uso de excesso do álcool gera a necessidade de purificação do produto e eleva o custo do processo de esterificação enzimática, assim, os estudos de esterificação a diferentes razões molares são importantes para minimizar o uso de excesso de álcool e obter altos valores de conversão.

Segundo Badgujar e Bhanage (2015), a razão molar é um fator importante para determinar a influência dos reagentes na atividade enzimática e conseqüentemente na conversão da reação. Por isso para qualquer sistema de catálise que tenha o objetivo de atingir grandes conversões, sem perda da atividade enzimática e nenhum desperdício de reagentes, é necessário que se faça o estudo da razão molar (ácido:álcool) adequada para que favoreça altas conversões do ácido estudado (MOHAMAD et al., 2015).

Ainda foi possível observar que quando a temperatura e a razão molar são fixadas nos ensaios, o aumento da agitação leva também a um aumento nas conversões. A influência da agitação pode ser observada quando comparados os ensaios 7 e 16. Nestes ensaios foram fixadas as variáveis razão molar e a temperatura em 1:6 e 70 °C, respectivamente. A reação do ensaio 7 foi realizada com a agitação de 200 rpm e teve um valor de conversão dos reagentes em produto de 75%. Já no ensaio 16 a agitação foi de 600 rpm e foi obtido uma conversão de 92%. A agitação do sistema reacional é uma das variáveis de maior influência na reação de esterificação, pois auxilia na dispersão do catalisador no meio reacional e na homogeneização dos reagentes, melhorando a interação entre os substratos e a enzima, conseqüentemente aumentando a conversão.

As melhores conversões para a síntese de oleato de etilenoglicol encontram-se nas condições reacionais: razões molares 1:2 e 1:6, com a temperatura de 70 °C, agitação de 600 rpm e 1% (m/m) de lipase em relação a massa total do substrato, encontradas nos ensaios 13, 14, 15 e 16. Com o objetivo de reduzir a quantidade de álcool na reação, utilizou-se os ensaios 13 e 14, que tem a menor razão molar 1:2, para seguir com experimentos cinéticos.

Com os resultados do planejamento realizou-se a análise de variância ANOVA (Tabela 4), para que fosse possível verificar se o modelo empírico gerado se ajustou aos resultados obtidos.

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) para a conversão de ácido oleico em oleato de etilenoglicol.

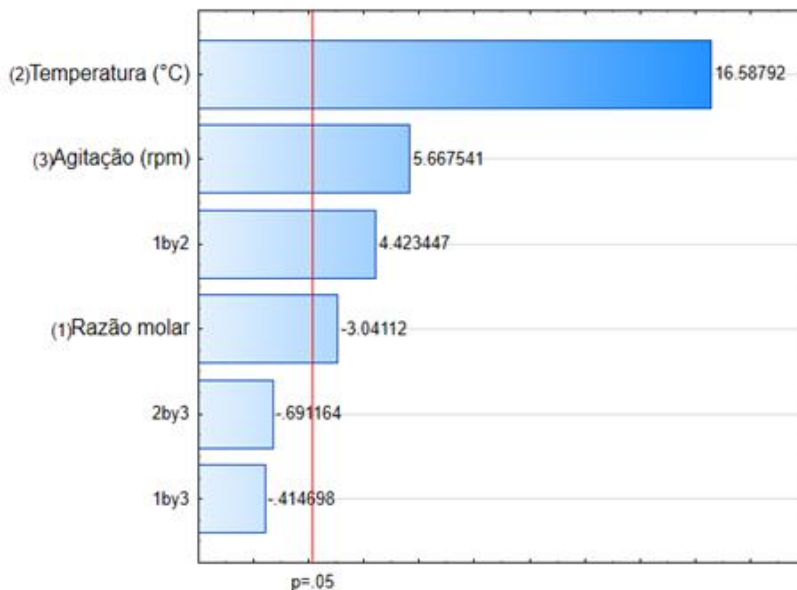
Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	P-valor
Regressão	4405,750	6	734,2917	56,1242	0,008
Resíduo	196,250	15	13,08333		
Total	4602,000				

% variação explicada (R^2) = 95,73%; $F_{\text{tab } 0,95;6;15} = 2,79$.

A significância estatística dos efeitos principais e da interação dos fatores sobre a formação do oleato de etilenoglicol foi realizada por análise de variância, como mostrado na Tabela 4. Por meio dos resultados obtidos (significância de 95% do modelo $p < 0,05$) pode-se concluir que há relação entre as variáveis e que a análise de variância proporcionou um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Verifica-se ainda pelo valor de R^2 de 95,73% que a equação ajustada (3) foi capaz de explicar a variabilidade dos valores experimentais.

Ainda na tabela 4 pode-se verificar que o teste-F obteve um valor para regressão bem superior ao tabelado, por isso é possível concluir que o modelo é preditivo; os valores encontrados foram $F_{\text{tabelado}} = 2,79$ e $F_{\text{calculado}} = 56,12$, com um $F_{\text{calculado}}$ 20,11 vezes maior do que o valor de F_{tabelado} , concluindo-se que há diferença significativa entre as médias dos tratamentos.

Gráfico de pareto (Figura 13) mostra a estimativa de efeitos lineares quadráticos e a interação das variáveis independentes, onde o efeito é tão significativo quanto mais à direita da linha vermelha estiver.

Figura 13 - Diagrama de Pareto obtido através do planejamento fatorial 2³.

$$X_{AO} = 67 - 2,75.RM + 15.T + 5,12.AG + 4.RM.T - 0,37.RM.AG - 0,62 * T.AG \quad (3)$$

Sendo,

X_{AO} = Conversão do ácido oleico em oleato de etilenoglicol (% m/m).

RM = Razão molar ácido:álcool codificada.

T = Temperatura codificada.

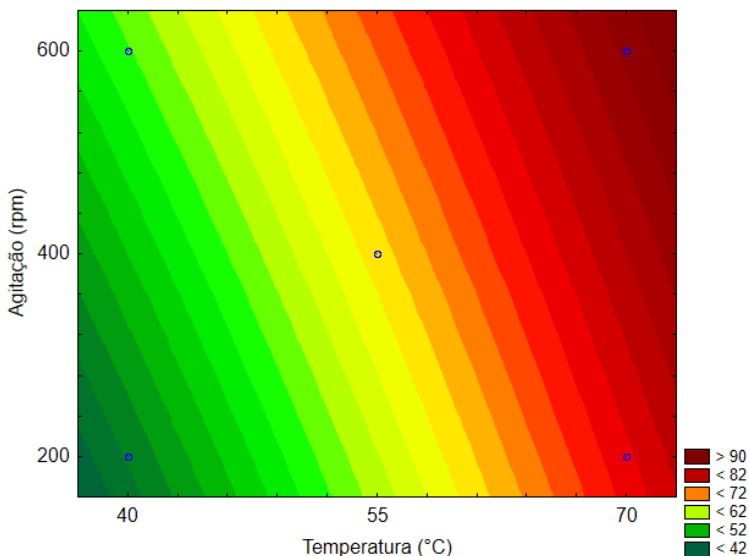
AG = Agitação codificada.

O modelo estatístico obtido foi adequado para descrição da conversão em do oleato de etilenoglicol e permitiu a construção das curvas de contorno, as quais são apresentadas nas Figuras 14, 15 e 16.

O comportamento da conversão do ácido oleico em éster oleato de etilenoglicol em função da agitação e da temperatura pode ser observado na Figura 14. As duas variáveis apresentaram uma significância positiva, pois os maiores valores de conversão em 24 h

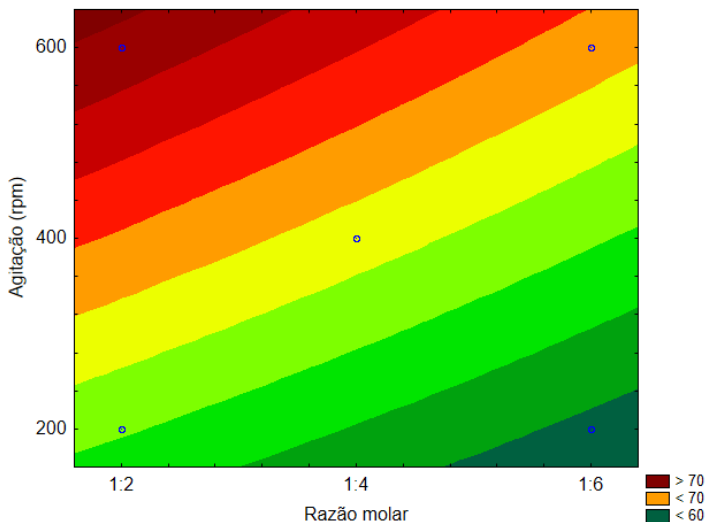
ocorrem quando tem-se um aumento simultâneo da agitação e temperatura. Porém, pode-se atingir altas conversões em 24 h com altas temperaturas, mesmo para agitações mais baixas.

Figura 14 - Curva de contorno referente a conversão de ácido oleico na síntese de oleato de etilenoglicol em função da temperatura e agitação.



O comportamento da conversão do ácido oleico em éster oleato de etilenoglicol em função da agitação e da razão molar pode ser observado na Figura 15. A agitação influencia de forma positiva a conversão em éster, pois quanto maior a agitação, maiores foram as conversões, enquanto que para a razão molar (ácido:álcool) as maiores conversões foram encontradas na menor razão molar (menor excesso de álcool).

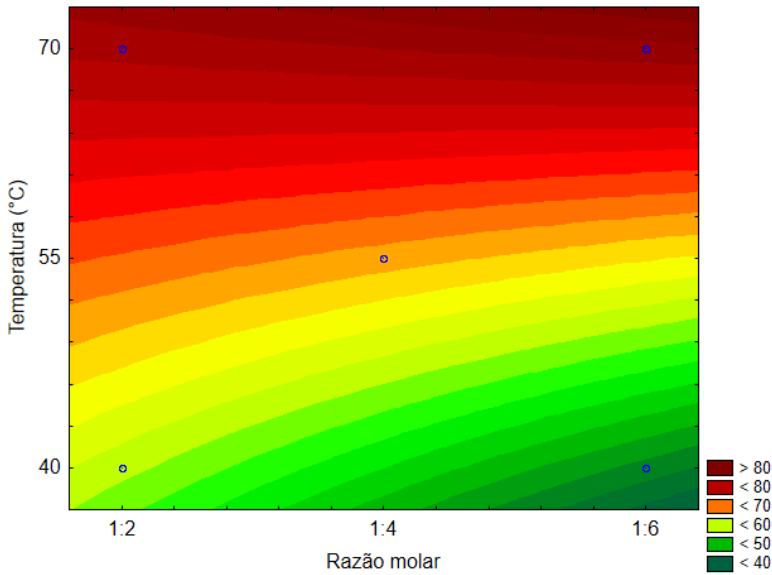
Figura 15 - Curva de contorno referente a síntese de oleato de etilenoglicol em função da agitação e razão molar.



Na curva de contorno que foi gerada pela combinação da razão molar e temperatura (Figura 16), todas as razões molares influenciaram de maneira positiva, quando a reação é conduzida a altas temperaturas. Vale ressaltar que essas razões molares tiveram sempre um excesso de álcool. O álcool usado em excesso assegura o deslocamento do equilíbrio da reação em função da síntese e minimiza as limitações de difusão (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Porém, também pode atuar como inibidor, assim como no estudo de RAHMAN et al. (2011), que verificou o efeito da concentração de álcool, mostrando que o aumento da quantidade de álcool, reduziu continuamente o rendimento do éster. O resultado foi uma consequência da inibição do substrato que leva a diminuir a atividade da enzimática.

As curvas de contorno da Figura 15 e 16 mostram que a maior temperatura e agitação tiveram um comportamento positivo em relação a conversão do ácido em éster. Assim como em HOLZ et al. (2018), que estudaram as mesmas variáveis na síntese do estearato de cetosteáril, foi observado que tanto a temperatura quanto a agitação influenciaram de forma positiva na conversão do ácido em éster. Quanto maiores foram as temperaturas e a agitação, maiores foram as conversões.

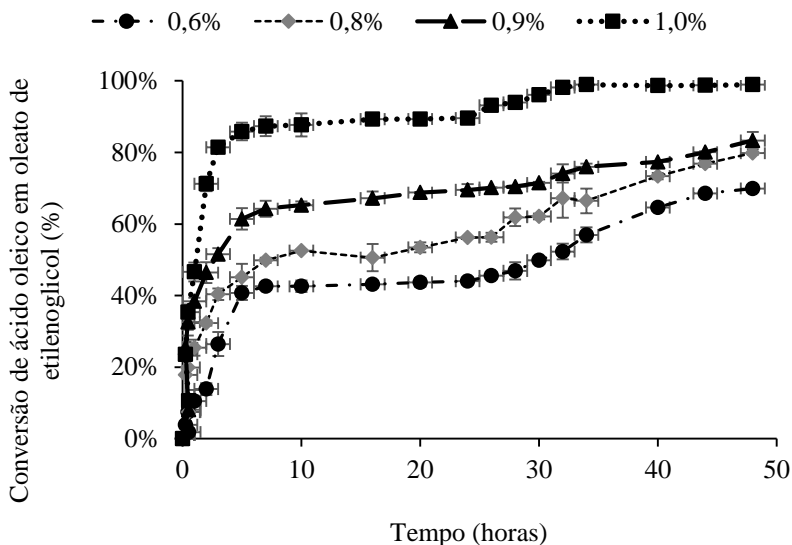
Figura 16 - Curva de contorno referente a síntese de oleato de etilenoglicol em função da razão molar e temperatura.



5.1.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA NA ESTERIFICAÇÃO

Sabe-se que a indústria tem interesse em obter ésteres com os menores custos de produção, o que implica em maiores conversões e menores tempos de processo. A quantidade de enzima utilizada também afeta a viabilidade econômica e industrial (BADGUJAR; PAI; BHANAGE, 2016; KHAN; RATHOD, 2015). Com o intuito de avaliar a influência da concentração de enzima na conversão do substrato em oleato de etilenoglicol, foi realizada uma avaliação da cinética da reação de esterificação para diferentes concentrações de derivado enzimático na condição experimental otimizada pelo planejamento de experimentos razão molar (ácido oleico:álcool monoetilenoglicol 1:2), temperatura 70 °C e agitação 600 rpm). Os resultados são mostrados na Figura 17.

Figura 17 - Cinética da conversão de ácido oleico na reação de esterificação para diversas concentrações de lipase NS 88011. Condições reacionais mantidas fixas: 70°C, 600 rpm, razão molar 1:2.



Na Figura 17, foi calculado o desvio padrão amostral, para medir a dispersão dos resultados. Entretanto, os resultados encontrados foram muito baixos, valor menor que um (1), por isso a sua visualização ficou quase imperceptível.

Os resultados da cinética de esterificação (Figura 17) mostram que no início da reação a conversão do ácido oleico cresce rapidamente, com velocidades maiores para as maiores concentrações de derivado enzimático, como esperado, pois a velocidade de uma reação enzimática depende positivamente da concentração de catalisador. As velocidades iniciais das reações de esterificação enzimática foram calculadas e são apresentadas na Tabela 5 e de forma detalhada no Apêndice A.

Tabela 5 – Velocidade inicial das reações de esterificação do ácido oleico e do álcool etilenoglicol.

Concentração de derivado enzimático com lipase % (m/m)	Velocidade inicial mmol/(g.min)	R²
1,0	0,031	0,96
0,9	0,028	0,98
0,8	0,010	0,95
0,6	0,004	0,99

Porém, observa-se ainda na Figura 17 que as reações de esterificação desaceleram e tendem a parar completamente em torno de 7 h, indicado uma inibição da enzima lipase, pois ainda há substratos presentes. Esta inibição parece ser dependente do tempo de exposição aos substratos. Após esta parada das reações, inicia-se uma segunda fase em que o sistema tende a recuperar-se, a reação tem a continuidade e a conversão sobe novamente, porém de forma lenta, indicando que a inibição é reversível.

A reação de esterificação catalisada pela menor concentração de lipase 0,6% (m/m), como pode ser observado na Figura 17, mostra o menor percentual de conversão de substrato em éster no tempo de 48 h, alcançou 70% de conversão. Conforme aumentou-se as concentrações da lipase, concentrações de derivado enzimático de 0,8%, 0,9% e 1,0 % (m/m), aumentou-se também as conversões do ácido oleico em éster oleato de etilenoglicol em 48 h, atingindo-se conversões de 80%, 83% e 99%, respectivamente.

A reação de esterificação com a maior concentração de lipase NS 88011, 1% (m/m) em relação a massa total do substrato, foi a que obteve a maior conversão do ácido oleico em éster oleato de etilenoglicol. Praticamente 99% de conversão foi alcançada no tempo de 31 h de reação, mantendo-se, assim, constante até o último tempo reacional 48 h.

Verifica-se que uma maior quantidade de biocatalisador, auxilia na rápida conversão de substrato em éster, o que, conseqüentemente, resulta na maior velocidade de redução da concentração do ácido graxo. O aumento da concentração da lipase tem influência direta na velocidade da reação enzimática, porque a lipase está presente no meio em concentrações catalíticas e a velocidade, portanto, depende do número de moléculas de enzimas (cada molécula de lipase é capaz de catalisar apenas uma reação por vez). Portanto, assim como relatado por Rahman

et al. (2011) e Sá et al. (2018), a maior concentração de lipase contribui para o aumento das velocidades.

Assim, conclui-se que é possível obter conversão praticamente total do ácido oleico na reação de esterificação, porém, é necessário trabalhar-se com maiores concentrações de enzimas, uma vez que há uma inibição reversível dependente do tempo de exposição da enzima ao inibidor.

Porém, nas menores concentrações de enzimas como 0,6% (m/m) de derivado enzimático ainda é possível obter-se alta conversão de 69,9%, mas que a nível industrial pode não ser considerada satisfatória, pois para a indústria química o ideal é ter índices de acidez menores que 1 (conversões melhores). HOLZ et al. (2018) variaram a concentração da lipase NS 88011 e com 1% (m/m) de lipase em relação a massa total do substrato, obteve cerca de 99% de conversão do produto em 31 h de reação.

Esses resultados indicam que é viável para a indústria utilizar uma quantidade relativamente pequena deste biocatalisador e obter conversões praticamente totais, contribuindo para a redução de custos, pois mitiga-se etapas posteriores de purificação do produto, que é bastante complicada no caso dos produtos serem obtidos via catálise tradicional.

Sabe-se que o excesso da quantidade de lipase pode gerar a sua aglomeração e assim, dificultar o acesso dos substratos à enzima (BADGUJAR et al., 2016; KHAN; RATHOD, 2015; WANG et al., 2015), interferindo negativamente na velocidade de reação, e, por isso, a quantidade de lipase deve ser controlada para garantir altas conversões e baixo custo (SÁ et al., 2017; MENESES et al., 2018).

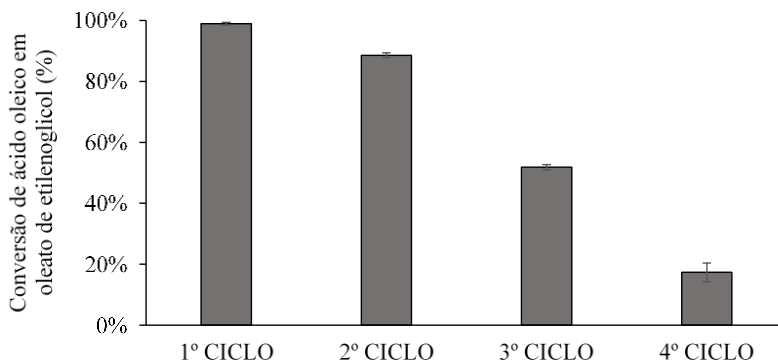
Com o intuito de evitar esses problemas, este trabalho utilizou baixas concentrações de lipase, e mostrou que a quantidade de lipase influencia no tempo de reação necessário para que se tenha a maior conversão dos reagentes em produto (BLOOMER; ADLERCREUTZ; MATTIASSON, 1992). O uso de lipase imobilizada tem um custo elevado, e por isso sempre é desejável utilizar a menor quantidade de lipase para que se possa obter o éster de estudo (KUAN; ALHINDRA; SHAW, 2001; RAHMAN; CHAIBAKHH; BASRI, 2011). Nas cinéticas desenvolvidas neste trabalho, foram utilizadas baixas quantidades da lipase NS 88011, que é uma enzima de baixo custo, o que vem ao encontro da aplicabilidade econômica do processo.

5.1.3. REÚSO DO CATALISADOR ENZIMÁTICO

A aplicação desta etapa é importante, pois mostra o quanto o biocatalisador é eficiente sendo reutilizado. Quanto maior é a reutilização do biocatalisador, menores são os gastos e, conseqüentemente, maiores as chances da indústria ter o interesse em fazer a troca dos catalisadores químicos (ácido e bases fortes) por biocatalisadores considerados ecologicamente corretos (PEREIRA et al., 2018b; HOLTZ et al., 2018).

Ao final da avaliação cinética, utilizou-se a condição otimizada do ensaio 13 para fazer a etapa de reuso, que como já citada na metodologia foi realizada utilizando a mesma lipase por diversos ciclos. Os resultados de conversão do ácido oleico em éster oleato de etilenoglicol, ao longo de sucessivos usos do biocatalisador estão representados na Figura 18.

Figura 18 - Reutilização do catalisador enzimático lipase NS 88011, na reação de esterificação para produção do oleato de etilenoglicol. Condições reacionais: razão molar 1:2, 70 °C, 600 rpm, 48 h de reação, 1% (m/m) de lipase NS 88011 em relação a massa total.



De acordo com a Figura 18 os resultados de reuso obtidos foram satisfatórios até o segundo ciclo, mostrando que a lipase NS 88011 foi ativa para a conversão do oleato de etilenoglicol.

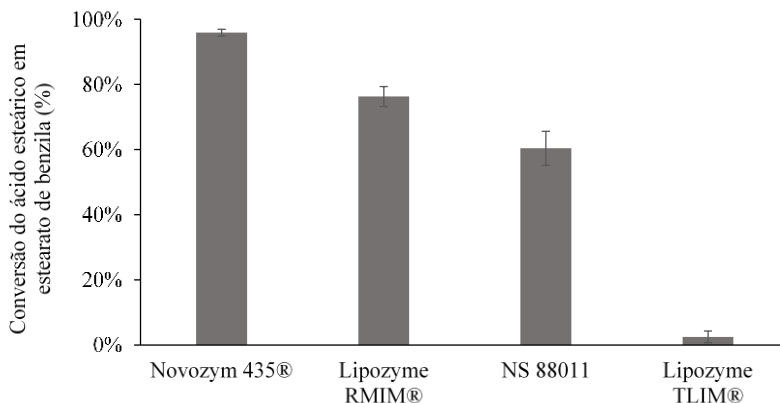
O primeiro ciclo apresentou conversão praticamente total (99% de conversão) em 48 h de reação e o segundo 89%, decaindo apenas 10% em relação ao primeiro ciclo. Do primeiro ciclo para o terceiro que apresentou 52% de conversão, houve uma redução de conversão de 47 % e do primeiro ciclo para o quarto que teve uma conversão de 17% houve uma redução de 83%.

Nota-se que há uma desativação das enzimas utilizadas que é independente da inibição observada nos testes cinéticos. Como pode ser observado no segundo ciclo é possível recuperar toda a atividade do derivado enzimático já utilizado, apenas lavando o derivado com n-hexano. Isso indica que a inibição observada no teste cinético é fruto de acúmulo de substratos ou produto na superfície do derivado enzimático. Esta inibição cessa completamente quando o derivado enzimático é lavado. Porém, nos ciclos sucessivos a conversão em 24 h e, portanto, a atividade enzimática cai de forma constante, indicando que possivelmente o tempo de contato à alta temperatura esteja inviabilizando a atividade destas enzimas ou as enzimas estejam sendo removidas do suporte. Segundo Pereira et al. (2018), a diminuição de conversão pode ter como causa, além da alta temperatura utilizada, o contato da enzima com os substratos e ou produtos ou até mesmo o solvente n-hexano durante as lavagens entre um ciclo e outro, gerando assim a perda de atividade enzimática e afetando a produção do éster.

5.2. ESTEARATO DE BENZILA

Para os testes iniciais, foram fixadas algumas condições experimentais: agitação 200 rpm, temperatura 60 °C, razão molar 1:5 (ácido esteárico: álcool benzílico) no tempo de 6 h de reação. Quatro lipases imobilizadas (Novozym 435®, NS 88011, Lipozyme RMIM® e Lipozyme TLIM®) foram utilizadas para realizar a esterificação do ácido esteárico com álcool benzílico, a fim de avaliar qual das lipases levaria a maiores conversões na síntese de estearato de benzila. Na Figura 19, têm-se as conversões de todas as lipases utilizadas.

Figura 19 - Conversão de estearato de benzila utilizando diferentes enzimas. Condições experimentais: razão molar 1:5 (ácido esteárico:álcool benzílico), 60 °C, 200 rpm, 6 h de reação, 1% (m/m) de cada lipase em relação a massa total do substrato.



Na Figura 19, verifica-se que para a conversão do éster estearato de benzila, entre todas as lipases testadas, a Novozym 435®, lipase comercial de *Candida antarctica* imobilizada em um suporte hidrofóbico (resina acrílica macroporosa), foi a lipase mais eficiente na reação de esterificação do ácido esteárico com o álcool benzílico, com conversão de 92% em 6 h. Este mesmo derivado enzimático apresentou bons resultados em Pereira et al. (2018a), que obteve as maiores conversões para a síntese dos ésteres estearato de butila e estearato de etila, 85% e 82%, respectivamente, nas condições de: 5 h de reação, temperatura 60 °C, agitação 200 rpm.

Estudos como os de Kapoor e Gupta (2012) e Pereira et al. (2018) abordam o uso da lipase Novozym 435® como biocatalisador, e mostram que os melhores resultados usando esta lipase encontram-se na faixa de temperaturas entre 40 °C a 70 °C, assim como nesta reação de esterificação que teve as melhores conversões na temperatura de 60 °C.

Comparando os resultados das lipases NS 88011, Lipozyme TLIM® e a Lipozyme RMIM® com os resultados obtidos com a Novozym 435®, verifica-se uma diferença nas conversões, pois a Novozym 435® teve a conversão de 95%, enquanto a Lipozyme RMIM® atingiu-se 76%, NS 88011 60% e a Lipozyme TLIM® atingiu somente 2,5%. Segundo Sá et al. (2018), essa redução na conversão pode estar relacionada com fatores como a fonte da enzima, o método de imobilização e também o suporte. Todos estes fatores podem afetar a

eficiência dos biocatalisadores, modificando as propriedades da atividade enzimática, mesmo em condições reacionais parecidas (MIN; YOO, 2014). É importante destacar que a quantidade de proteínas nos diversos derivados pode ser diferente, interferindo diretamente nas velocidades da reação e, portanto, nas conversões alcançadas em 6 h.

As lipases Novozym 435® e NS 88011 possuem a mesma enzima imobilizada, que é a lipase de *Candida antarctica B* (CAL B), porém, ambas também apresentaram resultados diferentes na conversão do éster em questão. Isso pode estar relacionada aos diferentes métodos de imobilização empregado para obtenção de cada lipase imobilizada e o fato de o material de suporte também ser muito diferente (MENESES et al., 2018; SÁ et al., 2018).

No trabalho desenvolvido por SÁ et al. (2018), foi feita a caracterização destas lipases, mostrando que a Novozym 435® possui características como: a área de superfície de 78,69 m²/g, o volume total dos poros 0,2837 cm³/g, muito maiores do que a NS 88011 que tem características como: a área de superfície de 15,16 m²/g, o volume total dos poros 0,02613 cm³/g, mostrando que as características do material de suporte podem ser responsáveis por essa redução na reação de conversão com a lipase NS 88011. E como a área de superfície e o volume total dos poros da Novozym 435® são maiores, isso pode sugerir que os substratos podem facilmente se difundir através dos poros do material de suporte para encontrar o sítio ativo da enzima, onde esterificação poderá ocorrer com mais facilidade, gerando o produto. Outra questão que também pode afetar na conversão, é o fato do suporte da NS 88011 ter um diâmetro médio de 68,96 Å, bem pequeno em relação ao diâmetro médio da Novozym 435® 144,2 Å; isso deve reduzir a transferência de massa dos substratos e dificultar o acesso dos substratos aos sítios ativos da lipase.

Tabela 6 – Características do suporte da Novozym 435® e NS 88011.

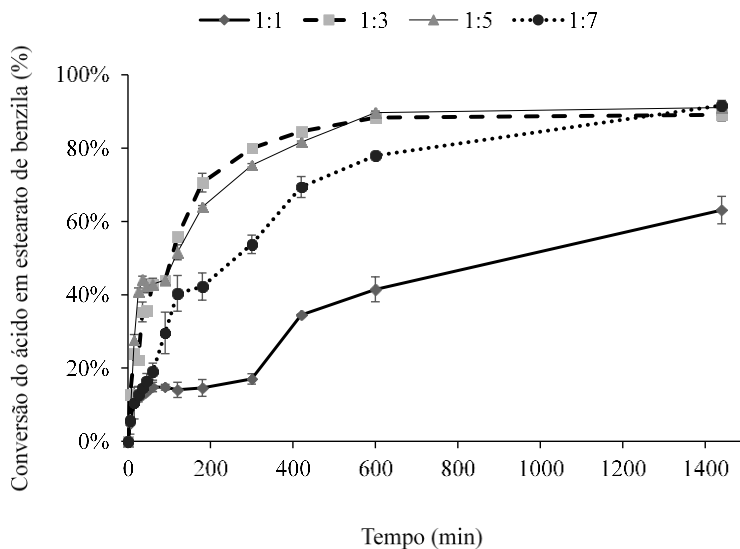
Enzima	Área de superfície (m ² /g)	Volume total dos poros (cm ³ /g)	Diâmetro médio (Å)
Novozym 435®	78,69	0,2837	144,2
NS 88011	15,16	0,02613	68,96

Fonte: SÁ et al. (2018).

Após os testes realizados com estas lipases, para dar continuidade no trabalho, escolheu-se a Novozym 435® como o biocatalisador.

Na Figura 20 está apresentado o estudo cinético do efeito da razão molar entre os substratos sobre a dinâmica da conversão da reação. Fixou-se a concentração de ácido esteárico e variou-se a quantidade molar do álcool benzílico (1:1, 1:3, 1:5 e 1:7).

Figura 20 - Avaliação do efeito da razão molar (ácido esteárico:álcool benzílico) na produção do estearato de benzila. Condições reacionais: razão molar (1:1, 1:3, 1:5 e 1:7), 60 °C, 200 rpm, 1% (m/m) de lipase Novozym 435® em relação a massa total do substrato.



A Figura 20 mostra que em todas as razões molares com excesso de álcool atinge-se a conversão de aproximadamente 91% em 24 h que aparentemente é a máxima que pode ser atingida. O resultado não é satisfatório quando não há excesso de álcool, pois a conversão atingiu 63% no tempo total pré-estabelecido (24 h), embora a reação enzimática não tenha cessado.

Nota-se uma redução das velocidades iniciais também para quando o excesso de álcool é muito alto, no caso relação entre o ácido e o álcool de 1:7. Apesar do grande excesso de álcool não impede que atinja conversão máxima em 24 h, esta se dá de maneira mais lenta.

Quantidades intermediárias de excesso de álcool em relação ao ácido (1:3 e 1:5) tiveram resultados muito próximos e promissores, atingindo conversão máxima de 91% em 10 h.

No trabalho de Holz et al. (2018), a esterificação do ácido esteárico e álcool cetosteárico utilizando a lipase NS 88011 como biocatalisador, produziu o éster estearato de cetosterila nas seguintes condições: razão molar 1:1,5 (ácido esteárico: álcool cetosteárico), agitação (760 rpm) e temperatura 75 °C e conseguiu uma conversão de 79% em 2 h de reação. A maior conversão também ocorreu com um pequeno excesso de álcool.

Conclui-se que tanto o álcool nas proporções estequiométricas, como o excesso de álcool interferem negativamente na velocidade da reação, porém não na conversão alcançada. Recomenda-se trabalhar com um pequeno excesso de álcool, que no caso em estudo, foi na proporção ácido:álcool de (1:3).

De acordo com a literatura, para que ocorra uma boa conversão ideal do éster é necessário que se tenha um excesso de álcool, porém não se pode trabalhar com excesso de ácido, pois a presença de excesso de ácido em uma reação, até certo ponto, pode causar desativação da enzima lipase (TRANI et al., 1991; MOHAMAD et al., 2015).

6. CONCLUSÃO

Foi possível produzir o éster oleato de etilenoglicol a partir de ácido oleico e excesso de álcool etilenoglicol em sistema livre de solvente com conversão praticamente total (99%), utilizando a lipase comercial imobilizada *Candida antarctica* (NS 88011) como catalisador.

A concentração do derivado enzimático comercial NS 88011 influencia diretamente a velocidade inicial da reação de síntese de oleato de etilenoglicol, conforme esperado. Porém, devido à uma inibição que mostrou ser reversível, a reação de esterificação cessa, em uma primeira fase, e diferentes níveis de conversão da reação são atingidos, proporcionalmente a cada concentração de enzima utilizada. Há uma segunda fase na cinética reacional de produção de oleato de etilenoglicol em que o sistema se recupera da inibição inicial e a reação de esterificação é retomada, porém com velocidades menores que as iniciais.

A temperatura mostrou ser a variável mais importante para atingir-se altas conversões da reação de esterificação de oleato de etilenoglicol. Quanto maior é a temperatura, maiores são as conversões em ésteres em 24 h. A agitação mostrou também ter influência positiva na conversão em ésteres. Porém, é possível obter altas conversões em 24 h com temperaturas altas (70 °C), mesmo para agitações mais baixas.

Conclui-se, também, que é necessário trabalhar-se com excesso de álcool em relação ao ácido, porém este excesso prejudica a condução da reação de esterificação do oleato de etilenoglicol a baixas temperaturas (de 40 a 55°C). A temperaturas altas (65 a 70 °C), a razão molar entre os reagentes não tem qualquer influência na conversão da reação em 24 h.

É possível reutilizar o catalisador enzimático lipase NS 88011, utilizado na reação de esterificação do éster oleato de etilenoglicol, nas seguintes condições reacionais: temperatura de 70 °C, razão molar ácido/álcool de 1:2, 600 rpm, 48 h de reação e 1% (m/m) de derivado enzimático. Há, porém, perdas importantes na atividade enzimática a partir da terceira utilização (aproximadamente 50%).

Foi possível produzir o éster estearato de benzila a partir de ácido esteárico e excesso de álcool benzílico em sistema livre de solvente utilizando as lipases comerciais imobilizadas Novozym 435®, Lipozyme RMIM, Lipozyme TLIM® e NS 88011, sendo que o derivado enzimático Novozym 435® apresentou os melhores resultados de velocidade de conversão. Pode-se alcançar com o derivado Novozym aproximadamente 95% de conversão em ésteres nas condições de reação estabelecidas.

Relações de excesso de álcool muito altas (maiores que 5:1) prejudicam a cinética da reação, mas não parece influenciar a conversão final.

Este trabalho apresentou uma alternativa biotecnológica para a produção dos ésteres oleato de etilenoglicol e estearato de benzila via esterificação enzimática, contribuindo para a obtenção de dois produtos com propriedades emolientes que são utilizados na indústria de cosméticos, sendo considerados sustentáveis dentro do conceito da química verde.

SUGESTÕES TRABALHOS FUTUROS

Para a produção do éster oleato de etilenoglicol, sugere-se realizar um estudo que mostre as causas da inibição enzimática sofrida pela enzima lipase no derivado NS 88011 e os mecanismos de sua reversibilidade.

Na reutilização da lipase do derivado NS 88011, deve-se realizar um estudo sobre o solvente utilizado para a lavagem do derivado entre os ciclos e sua influência sobre a queda da atividade enzimática. Deve-se, também, realizar um estudo de como a temperatura e os reagentes alteram a estabilidade da enzima lipase nos suportes estudados.

Estabelecer um modelo cinético para representar a reação de esterificação, determinar os seus parâmetros, bem como estudar a sensibilidade destes no processo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.589-595, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229\(03\)00022-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(03)00022-x).

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 15, p.6406-6436, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs35446f>.

AKACHA, N. B.; GARGOURI, M. (2015). Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma Compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food and Bioprocesses Processing*, 94, 675 e 709. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.011>.

ANTUNES, B. M. H. S. Estudo Teórico e Experimental da Esterificação do Ácido Acético com Etanol. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade de Aveiro, Aveiro, 2009.

ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 15, p.6475-6490, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs35484a>.

ARAGAO, V. C et al. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Quím. Nova**, São Paulo v. 32, n. 9, p. 2268-2272, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000900005&lng=en&nrm=iso>. Acesso: 08 Jan de 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000900005>.

ABIHPEC: Panorama do setor 2018. São Paulo: Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos - ABIHPEC. Caderno de tendências 2019-2020. São Paulo, 2019. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2018/>>. Acesso em: 10 Jan de 2019.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Application of lipase immobilized on the biocompatible ternary blend polymer matrix for synthesis of citronellyl acetate in non-aqueous media: Kinetic modelling study. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 57, p.16-25, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.01.006>.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. (2015). The combine use of ultrasound and lipase immobilized on co-polymer matrix for efficient biocatalytic application studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 122, 255e264. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.012>.

BADGUJAR, K. C.; PAI, P. A.; BHANAGE, B. M. (2016). Enhanced biocatalytic activity of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase under sonicated condition. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(2), 211e221. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1505-5>.

BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 72, n, p.400-406, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rboto/v72n3/en_a18v72n3.pdf>. Acesso em: 28 abr de 2019.

BARBOSA, O. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.435-456, set. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>.

BBC. (2017). Global markets for enzymes in industrial applications. BBC Research, BIO030J. Retrieved from <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>.

BICAS, J. L.; SILVA, J. C.; DIONÍSIO, A. P.; PASTORE, G. M. (2010). Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30 (1), 7e18. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000100002>.

BLAMEY, J. M. et al. Enzymatic Biocatalysis in Chemical Transformations. **Biotechnology Of Microbial Enzymes**, [s.l.], p.347-

403, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803725-6.00014-5>.

BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Síntese de ésteres de ácidos graxos em altos rendimentos. *Enzyme and Microbial Technology*, Julho de 1992, vol. 14, não. 7, p. 546-552.

BOURG-GARROS, S.; RAZAFINDRAMBOA, N PAVIA, AA. Otimização da síntese catalisada por lipase do acetato de (z) -3-hexen-1-ilo por esterificação direta em hexano e meio isento de solvente. *Enzyme and Microbial Technology*, March 1998, vol. 22, 4, p. 240-245.

BUSCA, G. (2007). Acid Catalysts in Industrial Hydrocarbon Chemistry. *Chemical Reviews*, 107 (11), 5366-5410. <https://doi.org/10.1021/cr068042e>. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr068042e>>.

CALVALCANTE, P. M. M.; SILVA, R. L.; FREITAS, J. J. R.; FREITAS, J. C. R.; FILHO, J. R. F. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. *Educ. quím*, México, v. 26, n. 4, p. 319-329, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2015.07.003>. Disponível em: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187893X2015000400319&lng=es&nrm=iso>. Acesso: 23 dez de 2018.

CAMEO - Produtos Químicos, ácido oleico. Disponível em: <<https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/8962>> Acesso em: 23 de Dezembro de 2018.

CARDOSO, A. L. Estudo cinético das reações de esterificação de ácidos graxos catalisadas por ácidos de Lewis e de Bronsted para produção de biodiesel. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2008.

CARRASCO, F. (2009). "Ingredientes Cosméticos". *Diccionario de Ingredientes* (4th ed.). p. 428. ISBN 978-84-613-4979-1 .

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Química fina por biotransformação usando lipase. *Química Nova*, 18, 544 (1995).

de CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.146-156, fev. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000100025>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000100025>. Acesso em: 10 nov de 2018.

COSTA, T. S.; ORNELAS, D. L.; GUIMARÃES, P. I. C.; MERÇO, F. (2004). Confirmando a Esterificação de Fischer por Meios de Aromas. **Química Nova na Escola**, [s. L.], v. 19, n. 8, p.36-38, abr. 2004. Disponível em: <<http://qnescsbq.org.br/online/qnesc19/a11.pdf>>. Acesso em: 02 mai de 2018.

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

DAVE, R.; MADAMWARC, D.; LARROCHE.; PANDEY, A.; CG DUSSAP (Eds.), Tópicos atuais sobre Bioprocessos na Indústria de Alimentos. Asiatech Publishers Inc., Nova Delhi (2006), p. 70.

D'SOUZA S. F. Immobilized enzymes in bioprocess. **Curr Sci**. 1998; 77:69-79.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-9, 6 jun. 2012. **Springer Nature**. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.

DHAKE, K. P.; THAKARE, D. D.; BHANAGE, B. M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. **Flavour And Fragrance Journal**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.71-83, 21 jan. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.3140>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ffj.3140>>. Acesso em: 20 mar de 2019.

DICOSIMO, R. D.; AULIFFE J. M.; POULOSE A. J.; BOHLMANN G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 42, n. 15, p.6437-0, 25 fev. 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). DOI: 10.1039/c3cs35506c.

DUBAL, S. A.; TILKARI, Y. P.; MOMIN, S. A.; BORKAR, I. V. (2008). Biotechnological routes in flavour industries. **Advanced Biotechnology**, 14, 20e31.

FABER, K. Biotransformações em Química Orgânica. 3rd ed., Springer: **Berlin**, 1997.

EUROMONITOR, 2016 – A economia da beleza: o setor de higiene pessoal, per fumaria e cosméticos. Disponível em:< <https://economiadeservicos.com/2016/04/19/a-economia-da-beleza-o-setor-de-higiene-pessoal-perfumaria-e-cosmeticos/>>. Acesso em: 19 dez de 2018.

FACIOLI, N. L.; BARRERA-ARELLANO, D. Otimização da esterificação enzimática do destilado de deoderiser do óleo de soja. **Jornal da Ciência da Alimentação e Agricultura**, 2001, vol. 81, não. 12, p. 1193-1198.

FERREIRA, A. M.; SOUZA, B. M. V. de.; RIGOTTI, M. A.; LOUREIRO, M. R. D. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Rev. esc. enferm. USP** [online]. 2012, vol.46, n.3, pp.752-760. ISSN 0080-6234. <http://dx.doi.org/10.1590/S0080-62342012000300030>.

FERRAZ, L. I. R.; POSSEBOM, G.; ALVEZ, E. V.; CANSIAN, R. L. (2015). 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**, 4(1), 44e48. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.07.003>.

FONSECA, H.; GUTIERREZ, L. E. Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais. **An. Esc. Super. Agric. Luiz de Queiroz** [online]. 1974, vol.31, pp.485-490. ISSN 0071-1276. <http://dx.doi.org/10.1590/S0071-12761974000100038>.

GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. (2013). Solvent-free synthesis of flavour esters through immobilized lipase mediated transesterification. **Enzyme Research**, 1e6. <https://doi.org/10.1155/2013/367410>.

GENG, B.; WANG, M.; QI, W.; SU, R. (2012). Cinnamyl acetate synthesis by lipasecatalyzed transesterification in a solvent-free system.

Biotechnology and Applied Biochemistry, 59(4), 270e275.
<https://doi.org/10.1002/bab.1023>.

GONÇALVES, J. A. Esterificação de Compostos Modelos Sobre Ácido Nióbbico para Produção de Biodiesel. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2007.

GRYGLEWICZ, S.; JADOWNICKA, E.; CZERNIAK, A. (2000). Lipase catalysed synthesis of aliphatic, terpene and aromatic esters by alcoholysis in solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, 22(17), 1379e1382. <https://doi.org/10.1023/A:1005600631600>.

GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUXA, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 41, p. 1447–1464, 2015.

HANDBOOK OF FARMACEUTICAL EXCIPIENTS. 3^{ed}. U.S.A. American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press, 2000.

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

HMDB - Banco de Dados do Metabolome Humano. Ácido oleico Disponível em: <<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000207>> Acesso em: 23 Dez de 2018.

HOLMAN, R. T.; RAHM, J. J. Analysis and characterization of polyunsaturated fatty acids. **Progress In The Chemistry Of Fats And Other Lipids**, [s.l.], v. 9, p.13-90, jan. 1971. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0079-6832\(71\)90024-3](http://dx.doi.org/10.1016/0079-6832(71)90024-3).

HOLZ, J. C. P.; PEREIRA, G. N.; OLIVEIRA, J. V.; LERIN, L. A.; DE OLIVEIRA, D. Enzyme-catalyzed production of emollient cetostearyl stearate using different immobilized commercial lipases under vacuum system. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 15, p.229-234, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.012>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818118302810>>. Acesso em: 02 jan de 2019.

HOYDONCKX, H.E.; DE VOS, D.E.; CHAVAN, S.A.; JACOBS, P.A. *Top. Catal.* **2004**, 27, 1-4.

HUA, K. F.; HU, H. Y.; SU, Y. C.; LIN, I. F.; YANG, S. S.; YM, C.; CHAO, L. K. Study on the Antiinflammatory Activity of Methanol Extract from Seagrass *Zostera japonica*. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 54, n. 2, p.306-311, jan. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0509658>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16417284>>. Acesso em: 25 jun de 2018.

Instituto Brasileiro de Geografia e Pesquisa (IBGE). Disponível em: [https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/comercio/9227pesquisa-mensal-de-co mercio.html?=&t=o-que-e](https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/comercio/9227pesquisa-mensal-de-co%20mercio.html?=&t=o-que-e). Acesso em: 25 abril de 2019.

JAKOVETI C.; JUGOVI C, B. Z.; GVOZDENOVI C, M. M.; BEZBRADICA, D. I. (2013). Synthesis of aliphatic esters of cinnamic acid as potential lipophilic antioxidants catalyzed by lipase B from *Candida Antarctica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(7), 1560e1573. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0294-z>.

JEROMIN, G. E.; ZOOR, A. (2008). A new irreversible enzyme-aided esterification method in organic solvents. *Biotechnology Letters*, 30(5), 925e928. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9632-y>.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. (2015). Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, 50(11), 1793e1806. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.014>.

KUAN, J. L.; ALHINDRA, N.; SHAW, J. Síntese catalisada por lipase de dietanolamidas de ácidos graxos. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, novembro de 2001, vol. 49, não. 12, p. 5761-5764.

LEAL, M. C. M. R. (2000). Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios. (Tese de mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LERIN, L.; CENI, G.; RICHETT, A.; KUBIAK, G.; OLIVEIRA, J.A.; TONIAZZO, G.; THEICHEL, H.; OESTREICHER, E.G.; OLIVEIRA,

D., 2011. Successive cycles of utilization of Novozym 435® in three different reaction systems. *Braz. J. Chem. Eng.* 28 (2).

LESZCZAK, J. P.; TRAN-MINH, C. (1998). Optimized enzymatic synthesis of methyl benzoate in organic medium. Operating conditions and impact of different factors on kinetics. ***Biotechnology and Bioengineering***, 60(3), 356e361. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981105\)60:3<356::AID-BIT12>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981105)60:3<356::AID-BIT12>3.0.CO;2-K).

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. da. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. ***Química Nova***, [s.l.], v. 32, n. 6, p.1596-1608, 2009. Fap UNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://quimicanova.sbg.org.br/detalhe_artigo.asp?id=620>. Acesso em: 11 mar de 2019.

LOZANO, P.; de DIEGO, T.; CARRIE, D.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. Síntese enzimática de ésteres em líquidos iônicos. *Jornal de Catálise Molecular B: Enzymatic*, janeiro de 2003, vol. 21, não. 1-2, p. 9-13.

MACARIO, A.; MOLINER, M.; DIAZ, U.; JORDA, J. L.; CORMA, A. (2008). Biodiesel production by immobilized lipase on zeolites and related materials. ***Zeolites And Related Materials: Trends, targets and challenges***, Proceedings of the 4th International FEZA Conference, [s.l.], p.1011-1016, 2008. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-2991\(08\)80061-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-2991(08)80061-4). Disponível em: < <https://www.sciencedirect.Com/science/article/pii/S0167299108800614> >. Acesso em: 14 mar de 2019.

MANAN, F. M. A.; RAHMAN, I. N. A.; MARZUKI, N. H. C.; MAHAT, N. A. (2016). Statistical modelling of eugenol benzoate synthesis using *Rhizomucor miehei* lipase reinforced nanobioconjugates. ***Process Biochemistry***, 51(2), 249e262. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.12.002>.

MARANGONI, A. G., *Enzyme Kinetics - A modern Approach*. 1. ed. New Jersey: John Wiley and Sons Inc., p. 48-90, 2003.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. de. Solubilidade das substâncias orgânicas. ***Química Nova***, [s.l.], v. 36, n. 8, p.1248-1255, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100->

40422013000800026. Disponível em: < [http://www .scielo .br /scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000800026](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000800026) >. Acesso em: 5 jan de 2019.

MARTINS, A. B. et al. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 105, p.18-25, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.03.021>.

MARKLEY, K. S. **Fatty Acids**. Part I. New York: Interscience Publishers, 1960.

MCMURRY, J. Química Orgânica. Trad. J.A. e Souza. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1997. v. 2.

MELO, L. L. M. M. Síntese enzimática dos ésteres de aroma butirato e valerato de citrionelila por lipase de *Rhizopus* sp. 2004. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP-FEA). Campinas, 2004.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. A Importância da Síntese de Fármacos. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 3, p.16-22, maio 2001. Trimestral. Disponível em: <qnesc.sbq.org.br>. Acesso em: 2 out de 2018.

MENESES, A. C.; SÁ, A. G. A.; LERIN, L.A.; CORAZZA, M. L.; ARAÚJO, P. H DE.; SAYER, C.; OLIVEIRA, D DE. Benzyl butyrate esterification mediated by immobilized lipases: Evaluation of batch and fed-batch reactors to overcome lipase-acid deactivation. **Process Biochemistry**, [s.l.], p.1-8, dez. 2018. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.029>. Disponível em: < <https://www.Sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511318315861> >. Acesso em: 31 jan de 2019.

MIN, K; YOO, Y. J. Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application. **Biotechnology And Bioprocess Engineering**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.553-567, jul. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-014-0173-7>. Disponível em: < <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-8490723685> >

[9&origin=inward&txGid=4a89bf5b01a2655579c78111c7038b9e>](#).

Acesso em: 01 fev de 2019.

MOHAMAD, N.; BUANG, N. A.; MAHAT, N. A.; JAMALIS, J.; HUYOP, F.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; WAHAB, R. A. Simple adsorption of *Candida rugosa* lipase onto multi-walled carbon nanotubes for sustainable production of the flavor ester geranyl propionate. **Journal Of Industrial And Engineering Chemistry**, [s.l.], v. 32, p.99-108, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2015.08.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X15003524>>. Acesso em: 20 mar de 2019.

MUSSATTO, S. I.; MILAGRES, A. M. F.; FERNANDES, M. Enzimas: Poderosa Ferramenta na Indústria. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 41, n. p. 28 – 33, out. 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/261709716EnzimasPode_rosa_FerramentanaIndustria. Acesso em: 23 Jun de 2018.

NAIR, B. Final Report on the Safety Assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. **International Journal Of Toxicology**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.23-50, jan. 2001. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1080/10915810152630729>.

NARWAL, S. K.; SAUN, N. K.; DOGRA, P.; GUPTA, R. (2016). Green synthesis of isoamyl acetate via silica immobilized novel thermophilic lipase from *Bacillus aerius*. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, 42(1), 69e73. https://doi.org/10.1134/S1068_162016010118.

NASCIMENTO, E. S. P.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W.; Comparação de técnicas de determinação de ésteres em cachaça. **Química Nova**, São Carlos, v. 32, n. 9, p.2323-2327, nov. 2009.

NNFCH - Novo Nordisk Ferment. **Pectinex Ultra SP-L**. Bagsvaerd: 1992 (Ficha técnica).

OLIVEIRA, D. et al. Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.178-182, 2004. FapUNIFESP (SciELO). DOI: 10.1590/s0101-20612004000200004.

OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. C. J.; SANTOS, A. P. B.; SILVA, B. V.; LACHTER, E. R.; PINTO, A. C. Síntese de Ésteres de Aromas de Frutas: Um Experimento para Cursos de Graduação dentro de um dos Princípios da Química Verde. **Rev. Virtual Quim.**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 1, p.152-167, jan. 2014.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: patrocínios e perspectivas. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300018&lng=en&nrm=iso >. Acesso em: 08 jun de 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300018>.

OTERA, J (2001). Em busca da esterificação prática. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 2044-2045. doi: 10.1002 / 1521-3773 (20010601) 40:11 <2044 :: AID-ANIE2044> 3.0.CO; 2-Y.

PAIVA, A.L.; BALCAO, V.M.; MALCATA, F.X., 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 27, n. 3-5, p.187-204, ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00206-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00206-4). Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022900002064>>. Acesso em: 23 jan de 2019.

PALUDO, N.; ALVES, J. S.; ALTMANN, C.; AYUB, M. A. Z. (2015). The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Ultrasonics Sonochemistry**, 22, 89e94. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.004>.

PEARSON, T. A. Metabolic consequences of stearic acid relative to long-chain fatty acids. Paper presented to conference on metabolic consequences of stearic acid relative to other long-chain fatty acids. **Atlanta, Ga.**; 1993, November 5-6.

PENG, L.; XU. X.; MU. H.; HOY, C. E.; NISSEN, J. A. Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.523-532, set. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229\(02\)00147-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-0229(02)00147-3). Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022902001473>>. Acesso em: 11 mar de 2019.

PEREIRA, G. N.; HOLZ, J. P.; LERIN, L.; ZENEVICZ, M. C. P.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, V. Solvent-Free Production of Ethylene Glycol Monostearate through Enzymatic Esterification. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s.l.], v. 57, n. 19, p.6627-6632, 25 abr. 2018a. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.iecr.7b05365>. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.iecr.7b05365>> Acesso em: 20 jan de 2019.

PEREIRA, G. N.; HOLZ, J. P.; GIOVANNINI, P. P.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, D de.; LERIN, L.; ZENEVICZ, M. C. P.; Enzymatic esterification for the synthesis of butyl stearate and ethyl stearate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 16, p.373-377, out. 2018b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.008>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818118304626>>. Acesso em: 30 jan de 2019.

PEREIRA, R. C. C.; MACHADO, A. H.; SILVA, G. G. (2002). (Re)Conhecendo o Pet. **Química Nova na Escola**, 15(1), 3-5. Disponível em: < <http://qnesc.sbgq.org.br/online/qnesc15/v15a01.pdf>>. Acesso em: 24 set de 2018.

PUBCHEM, Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA. 14 de julho de 2018. Acesso em: 23 dez de 2018.

RADZI, S. M et al. Optimization study of large-scale enzymatic synthesis of oleyl oleate, a liquid wax ester, by response surface methodology. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, [s.l.], v. 81, n. 3, p.374-380, 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.1404>.

RAHMAN, M. B. A.; CHAIBAKHH, N.; BASRI, M. Effect of Alcohol Structure on the Optimum Condition for Novozym 435® 435-Catalyzed Synthesis of Adipate Esters. **Biotechnology Research International**, [s.l.], v. 2011, p.1-7, 2011. Hindawi Limited. DOI: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/162987>. Disponível em: <

<https://www.hindawi.com/journals/btri/2011/162987/abs/>>. Acesso em: 22 nov de 2018.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6:145–50.

RIBEIRO, B. D.; de CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Produção e uso de lipases em bioenergia: uma revisão das matérias-primas para a produção de biodiesel. **Enzyme Res**, 2011.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R (2010). Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *J Mol Catal B-Enzym*. 64: 1-22.

ROMERO, M. D. et al. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 127, n. 2, p.269-277, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.009> . Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959353>>. Acesso em: 9 nov de 2018.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. **Food Science and Technology**, v. 16, n. 10, p. 442-457, 2005.

SANTOS, P; ZABOT, G. L; MEIRELES, M. A. A; MAZUTTI, M. A. (2016). Synthesis of eugenyl acetate by enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 1e9. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.018>.

SÁ, A. G. A.; MENEZES, A. C.; ARAÚJO, P. H. H.; OLIVEIRA, D. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 69, p.95-105, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.004>. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417304570>>. Acesso em: 10 fev de 2019.

SCHMID, R. D.; VERGER., R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 37, n. 12, p.1608-1633, 3 jul. 1998. Wiley-Blackwell. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1521-3773\(19980703\)37:123.0.co;2-v](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1521-3773(19980703)37:123.0.co;2-v).

SCOGNAMIGLIOA, J.; JONES, L.; VITALEA, D.; LETIZIAA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on benzyl alcohol. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 50, p.140-160, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.10.013>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22036973>>. Acesso em: 10 fev de 2019.

SERRA, T. M. Desenvolvimento de catalisadores a base de estanho (iv) para produção de ésteres metílicos de ácidos graxos, via transesterificação e esterificação. Dissertação - Curso de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, f. 71, 2010.

SILVA, N. C. A.; MIRANDA, J. S.; BOLINA, I. C. A.; SILVA, W. C. (2014). Immobilization of porcine pancreatic lipase on polyhydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, 82, 1139e1149. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.11.015>.

SLOAN, A. E. The top 10 functional food trends: the next generation. **Food Technology**, v. 56, n. 4, p. 32-35, 2002.

STENCEL, L. M.; LEADBEATER, N. E. (2014). Application of a new interface for rapid optimisation of bio-catalysed processes: Proteolytic digestion and an enzymecatalysed transesterification as examples. **New Journal of Chemistry**, 38, 242e247. <https://doi.org/10.1039/c3nj00784g>.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C. B. Química Orgânica–volume 2. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC; 2009. 518p.

TODERO, L. M.; BASSI, J. J.; LAGE, F. A. P.; CORRADINI, M. C. C. (2015). Em zymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on polyme tha-crylate particles: Optimization, reusability and mass transfer studies. **Bioprocess and Biosystems**

Engineering, 38 (8), 1601e1613. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1402y>.

TOMKE, P. D.; RATHOD, V. K. (2015). Ultrasound assisted lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification reaction in a solvent free medium. **Ultrasonics Sonochemistry**, 27, 241e246. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.022>.

IRANLOYE, T. A.; PARROTT, E. L. Effects of Compression Force, Particle Size, and Lubricants on Dissolution Rate. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 67, n. 4, p.535-539, abr. 1978. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600670424>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002235491539938X>>. Acesso em: 23 fev de 2019.

ULLMANN'S ENCYCLOPEDIA OF TECHNICAL CHEMISTRY, 6^a ed. Electronic release (Wiley- VCH, 2000); Y.H. Hui (ed.) Bailey's Industrial Oil & Fat Products (Wiley- Interscience, New York, 1996).

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

WANG, Y et al. Synthesis of benzyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 198, p.256-261, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.028>.

WU, Z.; QI, W.; WANG, M.; SU, R. (2014). Lipase immobilized on novel ceramic supporter with Ni activation for efficient cinnamyl acetate synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 110, 32e38. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.09.010>.

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*. 2002; 6:706p.

YADAV, G. D.; DHOOT, S. B. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. **Journal Of Molecular**

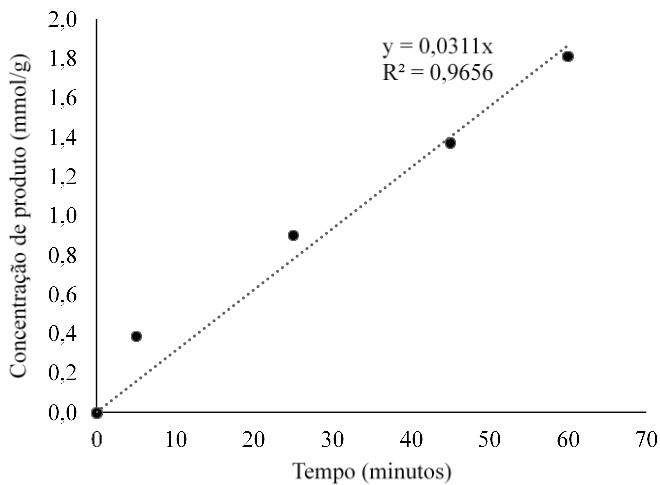
Catalysis B: Enzymatic, [s.l.], v. 57, n. 1-4, p.34-39, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.06.013>.

YUE, H.; ZHAO, Y.; MA, X.; GONG, J. Ethylene glycol: properties, synthesis, and applications. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 41, n. 11, p.4218-4244, 7 jun. 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2cs15359a>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22488259>>. Acesso em: 01 nov de 2018.

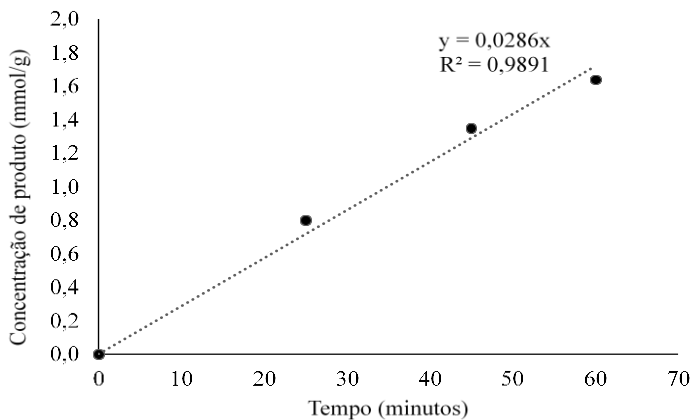
ZATTA, L. Argilominerais modificados como catalisadores para reações de esterificação de ácidos graxos. 2013. 175 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná-UFPR, Tese de Doutorado, 2013.

APÊNDICE A

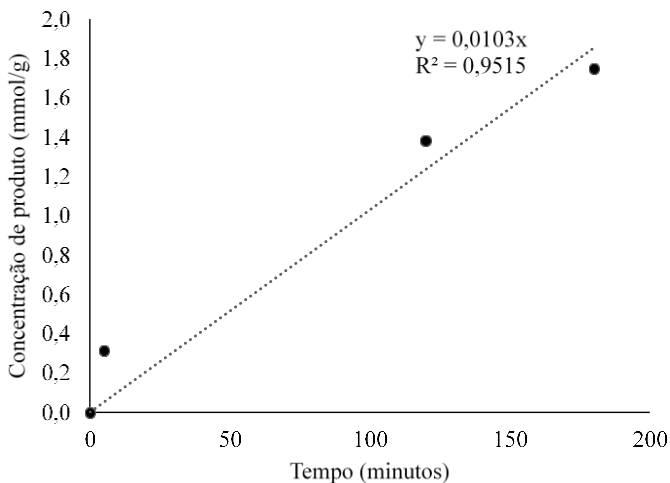
A – Gráfico da velocidade inicial da cinética de 1,0% (m/m) de lipase em relação a concentração do produto.



B – Gráfico da velocidade inicial da cinética de 0,9 % (m/m) de lipase em relação a concentração do produto.



C – Gráfico da velocidade inicial da cinética de 0,8 % (m/m) de lipase em relação a concentração do produto.



D – Gráfico da velocidade inicial da cinética de 0,6 % (m/m) de lipase em relação a concentração do produto.

