



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Isabella Medeiros de Souza

**Produção, purificação e avaliação da citotoxicidade e atividade hemolítica
do benzoato de benzila obtido por acilação mediada por Lipozyme® TL IM**

Florianópolis

2022

Isabella Medeiros de Souza

**Produção, purificação e avaliação da citotoxicidade e atividade hemolítica
do benzoato de benzila obtido por acilação mediada por Lipozyme[®] TL IM**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação
em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia de Alimentos
Orientadora: Profa. Dra. Débora de Oliveira
Coorientadoras: Dra. Alessandra Cristina de Meneses e
Dra. Manuela Balen

Florianópolis

2022

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

Souza, Isabella Medeiros de
Produção, purificação e avaliação da citotoxicidade e
atividade hemolítica do benzoato de benzila obtido por
acilação mediada por Lipozyme® TL IM / Isabella Medeiros de
Souza ; orientadora, Débora de Oliveira, coorientadora,
Alessandra Cristina de Meneses, coorientadora, Manoela
Balén, 2022.
94 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Biocatálise. 3. Acilação
. 4. Enzimas. 5. Benzoato de benzila. I. Oliveira, Débora
de. II. Meneses, Alessandra Cristina de. III. Balén,
Manoela IV. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. V.
Título.

Isabella Medeiros de Souza

Produção, purificação e avaliação da citotoxicidade e atividade hemolítica do benzoato de benzila obtido por acilação mediada por Lipozyme® TL IM

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Débora de Oliveira, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Karina Cesca
PPGEAL, Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Lindomar Alberto Lerin
UNIFE, Università degli Studi di Ferrara

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia de Alimentos.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Débora de Oliveira, Dra.
Orientador(a)

Florianópolis, 04 de agosto de 2022.

Este trabalho é dedicado à minha família, em especial à minha madrinha Eliete (*in memoriam*) que sempre vai estar no meu coração, e que me incentivou a realizar este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre estar me guiando e abençoando. Sem Ele, nada seria possível.

À minha família, que em 2021 passou por situações muito tristes, e sem o apoio um do outro e a ajuda de Deus, não estaríamos aqui fortes e unidos mais do que nunca.

Aos meus pais, Luiz e Eliane, e meu irmão, Luiz Arthur, por todo o apoio e ensinamentos que me deram em toda a vida. Vocês são a minha base, meus exemplos e meu porto seguro.

Aos meus avós, vô Carlos e vó Mafalda, que só de ver o sorriso deles meu coração enche de alegria.

Ao Paulo, meu namorado, que sempre esteve disposto a ajudar e apoiar, não importando a hora nem a distância. Obrigada pela paciência, amor e compreensão.

À minha orientadora, Profa. Dra. Débora, e às minhas coorientadoras Dra. Alessandra e Dra. Manuela. Agradeço pela confiança, pela grandiosa e valiosa ajuda e conhecimento compartilhado no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Leandro do Laboratório Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, pelo conhecimento compartilhado e ajuda em algumas análises.

Ao Laboratório de Fisiopatologia (UNESC, Criciúma), pelas análises da atividade biológica. Como também à Karina, por ter realizado os testes de atividade biológica do éster produzido.

Aos colegas e amigos do LCP e do LABMASSA, obrigada pelas conversas no dia a dia, pela companhia e risadas, como também, aos que me ajudaram na realização de algumas análises.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela oportunidade de realizar esta pesquisa e pelos 10 anos fazendo parte da minha vida.

Muito obrigada!

Pois o Senhor é quem dá sabedoria; de sua boca procedem o conhecimento e o discernimento.

Provérbios 2:6

RESUMO

O emprego da biotecnologia na síntese de ésteres aromáticos vem ganhando espaço na indústria devido ao uso de condições amenas no processo de produção, utilização de catalisadores biodegradáveis, dentre outros, proporcionando a fabricação de produtos classificados como naturais e sustentáveis. Esta pesquisa teve por objetivo a síntese de benzoato de benzila por acilação enzimática em modo batelada, utilizando a lipase comercial imobilizada Lipozyme[®] TL IM como biocatalisador para, posteriormente, avaliar a purificação do éster produzido e determinar sua atividade biológica (viabilidade celular e teste de hemólise). Atualmente, este composto é produzido por rota química, na qual utilizam-se altas temperaturas e ácidos como catalisadores. As lipases podem ser utilizadas como catalisadores para os processos de esterificação e acilação e, quando utilizadas na sua forma imobilizada, reduzem a geração de resíduos, garantindo um processo mais “limpo”. Neste trabalho foi avaliada a síntese do éster benzoato de benzila utilizando anidrido benzoico como doador de grupo acila, presença em excesso de álcool benzílico, agitação de 100 rpm, regime de operação em batelada e ausência de solventes. Um planejamento experimental foi realizado para maximização da conversão, levando à condição maximizada como sendo: 8% de Lipozyme[®] TL IM (m/m), 60 °C e razão molar de 1:3 (anidrido benzoico: álcool benzílico), resultando em um sistema reacional de 5,8 g, garantindo 75% de conversão em 8 h. Na avaliação cinética do processo, a maior conversão de 93,3% foi encontrada no tempo de 24 h. Um estudo de reutilização do catalisador foi realizado e dentre os solventes testados para recuperar a Lipozyme[®] TL IM no teste de reciclo, o acetato de etila foi o solvente mais adequado. O primeiro ciclo de reuso enzimático levou à uma conversão de ~63% (houve redução da conversão em comparação ao estudo da cinética devido à redução da atividade da enzima - de 50,2 para 15,5 U/g), seguida de ~38% e ~39% nos 2º e 3º ciclos, respectivamente. Na avaliação do aumento de escala (20 vezes maior em relação ao estudo prévio), os resultados encontrados para a atividade enzimática e para a conversão em benzoato de benzila foram similares ao do primeiro ciclo de reuso, sendo eles ~17 U/g e ~66%, respectivamente, confirmando a reprodutibilidade e a possibilidade de produção em larga escala. Por fim, a metodologia utilizada para purificação do éster (extração líquido-líquido seguida de destilação a vácuo) se mostrou eficaz, atingindo uma pureza de 96,7% de benzoato de benzila e rendimento de 2,11%. A partir do estudo preliminar da atividade biológica deste éster, pôde-se observar que não houve dano nos eritrócitos humanos e nem citotoxicidade nas concentrações de 1 e 2% de benzoato de benzila, ou seja, nessas concentrações este éster pode ser considerado seguro para aplicações na biomedicina.

Palavras-chave: Ésteres aromáticos. Benzoato de benzila. Atividade biológica. Síntese enzimática. Acilação. Lipases.

ABSTRACT

The use of biotechnology in the synthesis of aromatic esters has been gaining ground in the industry due to the use of mild conditions in the production process, the use of biodegradable catalysts, among others, providing the manufacture of products classified as natural and sustainable. This research aimed at the synthesis of benzyl benzoate by enzymatic acylation in batch mode, using the immobilized commercial lipase Lipozyme[®] TL IM as a biocatalyst. Subsequently, purify the product (benzyl benzoate) and determine its biological activity (antimicrobial, cell viability, and hemolysis test), aiming at a possible scale-up. This compound is produced by a chemical route, in which acids are used as catalysts in high temperatures. Lipases can be used as catalysts for esterification and acylation processes, and when immobilized, reduce waste generation, ensuring a “cleaner” process. In this work, the synthesis of benzyl benzoate ester was evaluated using benzoic anhydride as acyl group donor, presence in excess of benzyl alcohol, stirring at 100 rpm, batch operation, and absence of solvents. An experimental design was carried out to maximize the conversion, leading to the maximized condition as 8% Lipozyme[®] TL IM (m/m), 60 °C, and 1:3 molar ratio (benzoic anhydride: benzyl alcohol), resulting in a 5.8 g reaction system, guaranteeing 75% conversion in 8 h. In the kinetic evaluation of the process, the highest conversion (93.3%) was found at 24 h. A catalyst reuse study was employed, and among the solvents tested to wash Lipozyme[®] TL IM in the recycle test, ethyl acetate was the most suitable solvent. The first cycle of enzymatic reuse led to a conversion of ~63% (there was a reduction in conversion compared to the kinetics study due to the loss of enzyme activity - from 50.2 U/g to 15.5 U/g), followed by ~38 % and ~39% in the 2nd and 3rd cycles, respectively. In the evaluation of the scale increase (20 times greater than the previous study), the results found for the enzymatic activity and the conversion to benzyl benzoate were similar to those of the first reuse cycle, being ~17 U/g and ~66 %, respectively, confirming the reproducibility and the possibility of large-scale production. Finally, the methodology used for ester purification (liquid-liquid extraction followed by vacuum distillation) was effective, reaching a purity of 96.7% benzyl benzoate and a yield of 2.11%. From the preliminary study of the biological activity of this ester, it was observed that there was no damage to human erythrocytes and no cytotoxicity at concentrations of 1 and 2% of benzyl benzoate, that is, at these concentrations this ester can be considered safe for applications in biomedicine.

Keywords: Aromatic esters. Benzyl benzoate. Biological activity. Enzymatic synthesis. Acylation. Enzymes. Lipases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esterificação de Fischer.	22
Figura 2 – Esterificação a partir de um cloreto de ácido e álcool.....	23
Figura 3 – Esterificação a partir de um anidrido ácido e um álcool (acilação).	23
Figura 4 – Reação de alcoólise entre um éster e um álcool.	23
Figura 5 – Reação de acidólise entre um éster e um ácido.....	24
Figura 6 – Reação de transesterificação entre dois ésteres.	24
Figura 7 – Reação geral de esterificação.	33
Figura 8 – Reação geral de transesterificação.	33
Figura 9 – Esquema geral da síntese de éster aromático usando anidrido e álcool como substrato, onde (a) Reação principal: Acilação (acil doador: anidrido benzoico) e (b) Reação secundária: Esterificação (acil doador: ácido benzoico).....	38
Figura 10 – Fórmula estrutural do benzoato de benzila.	41
Figura 11 – Esquema reacional da produção enzimática de benzoato de benzila.	41
Figura 12 – Cromatograma do resultado obtido através da análise em CG acoplado com espectrometria de massas.....	43
Figura 13 – Fluxograma esquemático dos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.	49
Figura 14 – Etapas precedentes para a caracterização das amostras.	54
Figura 15 – Fluxograma do processo de purificação do benzoato de benzila.	55
Figura 16 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis – temperatura (x_1), concentração enzimática (x_2) e razão molar (x_3) – na síntese de benzoato de benzila em batelada utilizando Lipozyme [®] TL IM como biocatalisador depois de 8 horas de reação.....	62
Figura 17 – Superfície de resposta da (a) temperatura em função da concentração de enzima, (b) concentração da enzima em função da razão enzimática* e da (c) temperatura em função da razão molar* para síntese de benzoato de benzila em batelada utilizando Lipozyme [®] TL IM como biocatalisador depois de 8 horas de reação.....	63
Figura 18 – Valores experimentais versus valores preditos na síntese em batelada de benzoato de benzila utilizando Lipozyme [®] TL IM como catalisador.....	64
Figura 19 – Cinética da síntese de benzoato de benzila com Lipozyme [®] TL IM em uma temperatura de 60 °C, concentração de enzima de 8% (m/m), razão molar de 1:3 (anidrido benzoico:álcool benzílico) e agitação de 105 ± 5 rpm.....	65

Figura 20 – Conversão em benzoato de benzila junto com a atividade enzimática medida antes de cada experimento (cinética, aumento de escala e primeiro ciclo de reuso enzimático). Condições: 24 horas de reação, temperatura 60 °C, razão molar 1:3 (anidrido benzoico:álcool benzílico) e concentração enzimática 8% (m/m).	70
Figura 21 – Perfil cromatográfico obtido após a purificação do produto da reação entre o anidrido benzoico e o álcool benzílico.	72
Figura 22 – Espectro de massas do benzoato de benzila obtido experimentalmente.	73
Figura 23 – Espectro de RMN ¹ H do benzoato de benzila em CDCl ₃	74
Figura 24 – Espectro RMN ¹ H do benzoato de benzila.	75
Figura 25 – Ensaio de citotoxicidade do benzoato de benzila em diferentes concentrações (1, 2, 5 e 10%). Diferenças significativas são mostradas (p < 0,05) quando comparado com o grupo controle - ANOVA seguida pelo teste de Tukey).	76
Figura 26 – Ensaio de hemólise em eritrócitos humanos após incubação com benzoato de benzila em diferentes concentrações (1 e 5%).	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Teste de solubilidade do anidrido benzoico e ácido benzoico em 1 minuto de agitação no vórtex.....	66
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns dados da literatura de estudos envolvendo síntese de ésteres aromáticos utilizando lipases como biocatalisadores - continua.....	25
Tabela 2 – Propriedades físicas de duas lipases comerciais imobilizadas da Novozymes.....	35
Tabela 3 – Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental na síntese de benzoato de benzila.	51
Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental com os valores codificados e reais e respostas em termos de conversão em benzoato de benzila utilizando Lipozyme [®] TL IM como biocatalisador depois de 8 horas de reação.....	60
Tabela 5 – ANOVA para validação do modelo que descreve a síntese de benzoato de benzila utilizando Lipozyme [®] TL IM como catalisador.	61
Tabela 6 – Atividade enzimática da Lipozyme [®] TL IM sem/com contato com solvente e sua porcentagem de perda em comparação a enzima sem contato com solvente.	67
Tabela 7 – Efeito do uso sucessivo da Lipozyme [®] TL IM, associando a conversão em benzoato de benzila com a atividade enzimática em cada ciclo.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CG/MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas
CC	Cromatografia em coluna
IRL	Índice de retenção linear
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDBS	Spectral Database for Organic Compounds
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Meio Eagle Dulbecco Modificado)
PBS	Tampão fosfato-salino
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional

LISTA DE SÍMBOLOS

m/m	Massa de enzima em relação a massa de substrato
U/g	Atividade enzimática por gramas de substrato
m/z	Razão massa/carga

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos Específicos	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	ÉSTERES AROMÁTICOS	21
2.2	BIOTECNOLOGIA NA SÍNTESE DE ÉSTERES AROMÁTICOS	22
2.2.1	Enzimas.....	31
2.2.2	Acilação enzimática	38
2.3	PURIFICAÇÃO DE ÉSTERES AROMÁTICOS.....	39
2.4	BENZOATO DE BENZILA	40
2.4.1	Atividade biológica do benzoato de benzila	43
2.5	CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	MATERIAIS.....	46
3.1.1	Especificação das soluções	46
3.1.2	Biocatalisador.....	47
3.1.3	Equipamentos.....	47
3.2	MÉTODOS	48
3.2.1	Atividade da Lipozyme® TL IM imobilizada	50
3.2.2	Maximização do processo de produção do benzoato de benzila	51
3.2.3	Cinética e aumento de escala da síntese de benzoato de benzila	52
3.2.4	Estabilidade da Lipozyme® TL IM imobilizada	52
3.2.5	Caracterização das amostras	53
3.2.6	Purificação do benzoato de benzila	54

3.2.7	Avaliação da atividade biológica do benzoato de benzila purificado.....	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1	MAXIMIZAÇÃO DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DO BENZOATO DE BENZILA	60
4.2	AVALIAÇÃO CINÉTICA DA REAÇÃO.....	64
4.3	ESTABILIDADE ENZIMÁTICA.....	66
4.3.1	Testes para a escolha do solvente utilizado na lavagem da enzima	66
4.3.2	Reuso da Lipozyme® TL IM na síntese de benzoato de benzila	68
4.4	AUMENTO DE ESCALA DA SÍNTESE DE BENZOATO DE BENZILA	70
4.5	PURIFICAÇÃO DO BENZOATO DE BENZILA.....	72
4.5.1	Caracterização por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas do produto purificado.....	72
4.5.2	Confirmação da purificação do produto por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	74
4.6	ATIVIDADE BIOLÓGICA DO BENZOATO DE BENZILA.....	75
4.6.1	Viabilidade celular (citotoxicidade) do benzoato de benzila e teste da hemólise	75
5	CONCLUSÕES.....	78
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

Diagrama Conceitual da Dissertação

Produção, purificação e avaliação da citotoxicidade e atividade hemolítica do benzoato de benzila obtido por acilação mediada por Lipozyme® TL IM.

Por quê?

- Benzoato de benzila é um éster aromático relevante para a indústria, possuindo diversas aplicações, dentre elas: acaricida, antimicrobiana, pode ser usado como solvente ou aditivo na indústria de cosmético, além de estar presente na composição de medicamentos utilizados em tratamento de escabiose;

- Éster produzido via rota química sob condições de processo não amenas (por exemplo, temperatura e pressão). Tal processo também resulta em alta geração de resíduos e depreciação de equipamentos;

- A acilação enzimática, por sua vez, é um processo biocatalítico, ou seja, utiliza condições amenas de processo, além de baixa geração de resíduo, redução do consumo de energia e uso de catalisadores reutilizáveis e biodegradáveis. Dessa forma, a biocatálise segue o conceito de química verde;

- O reuso das enzimas aumenta a viabilidade do processo e diminui a geração de resíduos.

Quem já fez?

- Poucos trabalhos estudaram a produção de benzoato de benzila por acilação enzimática;

- Meneses *et al.* (2020) produziram benzoato de benzila através da reação de acilação enzimática entre anidrido benzoico e álcool benzílico;

- Poucos trabalhos abordaram a maximização da produção enzimática deste éster e seu processo de purificação.

Hipóteses

- É possível maximizar o processo de produção do benzoato de benzila sem o emprego de solventes;

- É possível purificar o éster benzoato de benzila por extração líquido-líquido e destilação a vácuo;

- É possível o aumento de escala na produção do benzoato de benzila através da acilação enzimática;

- O éster benzoato de benzila possui capacidade de aplicação em biomedicina.

Métodos experimentais

- Reações de acilação em processo batelada com agitação orbital sem a adição de solvente;

- Quantificação da conversão por cromatografia gasosa (CG);

- Estudo da viabilidade da reutilização do biocatalisador;

- Purificação do éster por extração líquido-líquido e destilação a vácuo;

- Confirmação da purificação por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN);

- Estudo preliminar da atividade biológica do éster purificado.

Respostas

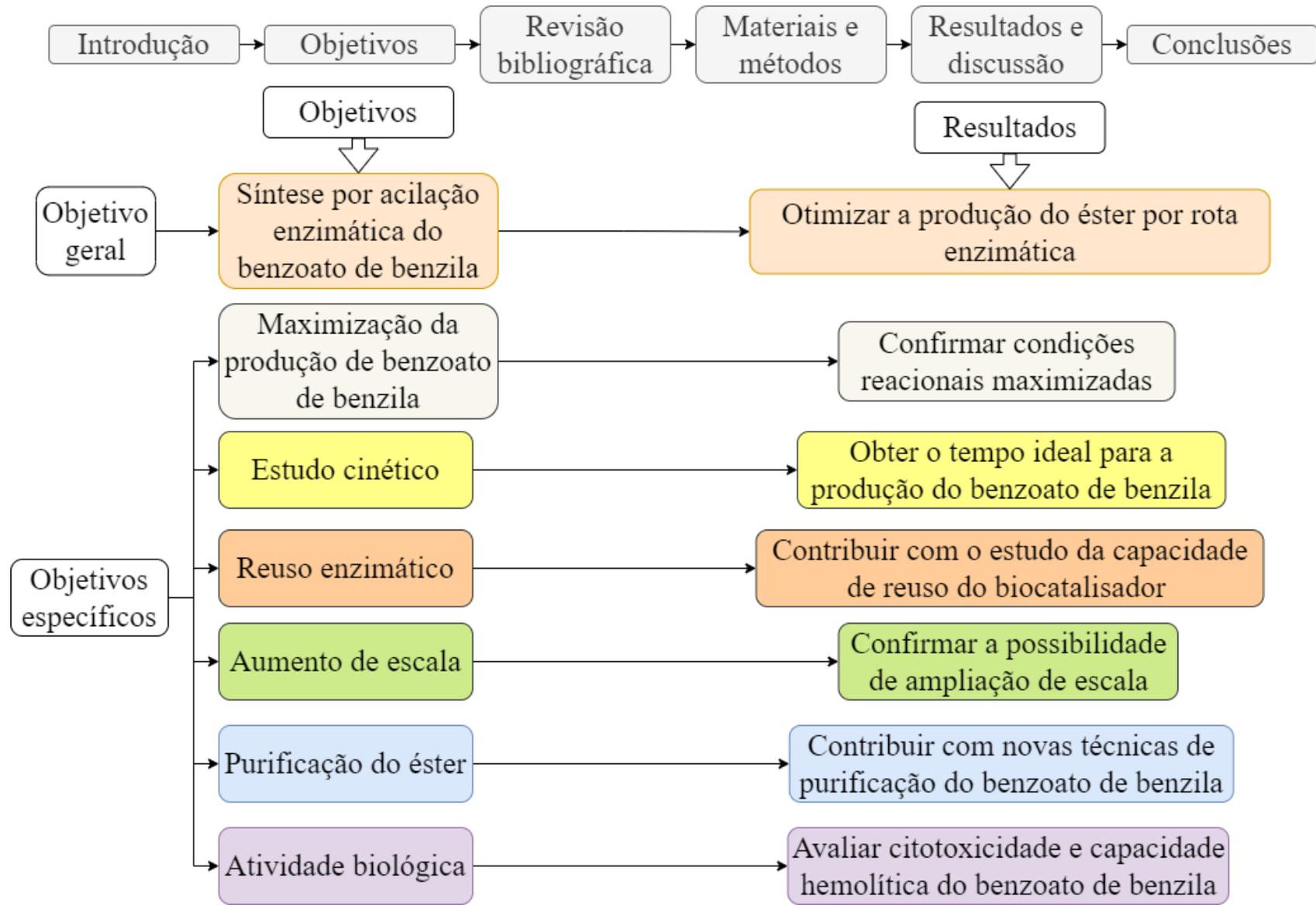
- Maximização do processo produtivo do éster;

- Ampliação da escala;

- Capacidade de reuso dos biocatalisadores;

- Avaliação do método de purificação;

- Testes preliminares de atividades biológicas do éster purificado.



1 INTRODUÇÃO

Os ésteres aromáticos são compostos que possuem anel aromático na sua cadeia, estão presentes na natureza e dispõem de características organolépticas, como cheiro e sabor, além de possuírem propriedades higroscópicas, emulsificantes e esfoliantes (BERGER, 2009; DHAKE *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2016; NUERNBERG, 2004; YADAV; DHOOT, 2009). Possuem uma variedade de aplicações em diversas áreas nas indústrias, dentre elas em cosméticos, fármacos e como aditivos aromáticos em alimentos, além de terem atividade antioxidante, antibacteriana, acaricida, entre outras (BECKER *et al.*, 2012; BEN AKACHA; GARGOURI, 2015; KHAN; RATHOD, 2015; MAHAPATRA *et al.*, 2009).

A síntese de ésteres aromáticos geralmente é realizada via rota química, porém, este processo interfere negativamente no meio ambiente, gerando resíduos que podem ser tóxicos, usando catalisadores não biodegradáveis e empregando condições de processo elevadas, causando maior consumo de energia (KHAN; RATHOD, 2015; MENESES, 2019; SÁ *et al.*, 2017).

À vista disto, a biocatálise, que é uma tecnologia que utiliza sistemas vivos, sendo alternativa na síntese de ésteres pois utiliza condições amenas, requer demandas relativamente baixas de energia, faz uso de catalisadores biodegradáveis e inertes (com a possibilidade de reuso) e possui elevada eficiência catalítica. Além disso, as enzimas (que podem ser empregadas como biocatalisadores) possuem alta especificidade. Sendo assim, essa tecnologia torna o processo industrialmente desejável, proporcionando inclusive a fabricação de produtos classificados como naturais e sustentáveis, de forma a atender o mercado atual (BADGUJAR; BHANAGE, 2015; GRYGLEWICZ; JADOWNICKA; CZERNIAK, 2000; MANAN *et al.*, 2016; SÁ *et al.*, 2017; SANTOS, 2014; SHARMA; KANWAR, 2014).

O benzoato de benzila é um éster aromático que, na indústria de alimentos, pode ser utilizado em formulações de aromas como o de maçã, banana, uva, jasmim, melão, damasco, mirtilo, cereja e framboesa (SÁ *et al.*, 2017). Além disso, possui atividade acaricida, antimicrobiana e é encontrado principalmente em medicamentos para tratamento de escabiose - uma doença global que atinge principalmente as áreas com falta de saneamento e superlotação (FULLER, 2013; HENGGE *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2015; TAPLIN *et al.*, 1990). Este éster vem sendo utilizado no tratamento de tal doença devido a sua eficácia e baixo custo em comparação com outros fármacos, como monossulfiram, malatião, lindano, ivermectina, permetrina e crotamiton (CURRIE *et al.*, 2004; HEUKELBACH; FELDMEIER, 2006).

Ainda que este éster possua uma importância para a indústria devido às suas diversas aplicações, existem poucas informações na literatura acerca do aumento de escala da produção via rota enzimática do benzoato de benzila, bem como de sua purificação, sendo necessário um estudo mais aprofundado sobre técnicas eficientes para esse processo de separação. Além disso, geralmente se utilizam solventes como meio de reações com a finalidade de facilitar a mistura e a transferência de calor e massa (POLIAKOFF; LICENCE, 2007). Sobretudo, o uso de solvente em reações forma subprodutos que podem ser tóxicos, constituindo a maior parte de resíduos (até 80% na indústria farmacêutica). À vista disso, requerem mais etapas de purificação, tornando o processo mais custoso (CONSTABLE; JIMENEZ-GONZALEZ; HENDERSON, 2007; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2004; PINTO; RIBEIRO; MACHADO, 2019; POLIAKOFF; LICENCE, 2007).

Sendo assim, o presente trabalho buscou maximizar a síntese de benzoato de benzila por biocatálise sem a presença de solventes, a fim de posteriormente purificar e avaliar a atividade biológica, para então, estudar a viabilidade do aumento de escala da produção deste éster.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Sintetizar o benzoato de benzila via acilação, utilizando lipase comercial imobilizada (Lipozyme[®] TL IM) como biocatalisador, realizar a purificação deste éster e verificar potenciais atividades biológicas do produto obtido.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a melhor condição de processo através do planejamento experimental para maximizar a conversão de benzoato de benzila, através da análise da influência da temperatura, razão molar dos substratos e concentração de enzima.
- Analisar a cinética reacional na síntese enzimática de benzoato de benzila.
- Avaliar a estabilidade da enzima com o intuito de estudar a sua reutilização.
- Estudar a viabilidade da produção em escala laboratorial aumentada na condição maximizada nas etapas anteriores.
- Avaliar a metodologia de purificação do produto através da extração líquido-líquido seguida da destilação a vácuo.

- Avaliar preliminarmente as atividades biológicas (viabilidade celular e teste de hemólise) do benzoato de benzila.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo aborda a fundamentação teórica necessária ao desenvolvimento deste trabalho, abrangendo temas relacionados à síntese enzimática de ésteres aromáticos. É dada ênfase na produção do éster benzoato de benzila, utilizando lipases como biocatalisadores. Aspectos relativos à purificação, maximização do processo produtivo, reuso da enzima, bem como o estudo das atividades biológicas do éster produzido serão apresentados e discutidos.

2.1 ÉSTERES AROMÁTICOS

Os ésteres, provenientes dos ácidos carboxílicos, são compostos voláteis que podem ser obtidos através de reações entre álcoois e ácidos, anidridos ou cloretos de ácidos. Estes compostos podem ser encontrados na natureza, como por exemplo, em aroma emitido por frutas e flores, em óleos vegetais (triglicerídeos) e na gordura vegetal (BÔAS *et al.*, 2017; CALVALCANTE *et al.*, 2015; SOUZA; OLIVEIRA; VALÉRIO, 2018).

Os ésteres aromáticos, que são ésteres que contêm anel aromático, possuem características organolépticas, como cheiro e sabor, além de apresentarem propriedades higroscópicas, emulsificantes e esfoliantes, conferindo uma variedade de aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (BERGER, 2009; DHAKE *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2016; NUERNBERG, 2004; YADAV; DHOOT, 2009). Dentre os ésteres aromáticos, destacam-se os ésteres benzoato, fenetil, benzil, anisil, cinamato, cinamil, eugenil e cresil, podendo ser encontrados na natureza ou sintetizados laboratorialmente, sendo a biocatálise enzimática uma boa alternativa para a obtenção dos ésteres (MENESES *et al.*, 2020).

Este grupo funcional pode ser utilizado em produtos de várias áreas na indústria, como perfume, sabonete, creme, loção, shampoo, detergente, alimentos, vinho, cigarro, entre outros (BEN AKACHA; GARGOURI, 2015; MAHAPATRA *et al.*, 2009). Além disso, ésteres aromáticos podem ser emolientes, surfactantes e antioxidantes, conferindo capacidade para aplicação em formulações de cremes, shampoos e cremes antienvelhecimento (BECKER *et al.*, 2012; KHAN; RATHOD, 2015).

Os ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos como ácidos benzoicos, ácido salicílico e ácido cinâmico são utilizados na indústria de perfumaria e aromas. O salicilato de benzila, por exemplo, é usado como fixador de perfume e na fórmula do protetor solar, e o salicilato de bornila possui efeito anti-inflamatório e antinociceptivo periférico, como também, possui propriedades analgésicas (MONTE, 2014; SIVAKUMAR; PANGARKAR; SAWANT, 2002).

Dubey *et al.* (2000) realizou estudos onde mostrou que o éster cinamato de etila age contra os microrganismos *Scopulariopsis brevicaulis*, *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia pachydermatis*, tendo aplicação em cosméticos. Sá (2018) comprovou que baixa concentração de butirato de benzila é suficiente para prevenir o crescimento bacteriano. Estudos realizados por Souza (2016) mostraram que o éster cinamato de geranila apresenta indícios de propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Zanetti *et al.* (2016) também estudaram o éster cinamato de geranila e concluíram que frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* exibem atividade antibacteriana. Em vista disso, estes estudos comprovam que os ésteres aromáticos têm grande importância industrial.

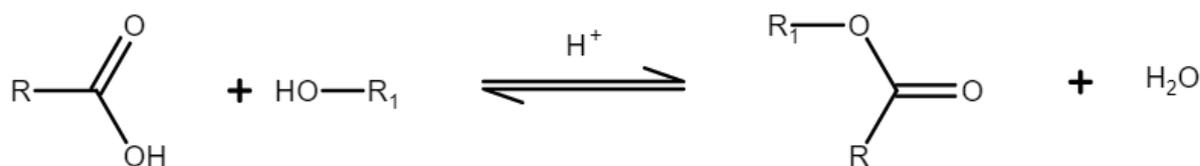
2.2 BIOTECNOLOGIA NA SÍNTESE DE ÉSTERES AROMÁTICOS

Uma das principais reações da química orgânica é a obtenção de ésteres a partir da reação de esterificação de álcoois com doadores de acila, principalmente com um ácido carboxílico, mas também com éteres, ésteres, anidridos ácidos, amidas, cloretos de ácidos, hidrocarbonetos insaturados e nitrilas (ASLAM; TORRENCE; ZEY, 2000; IWASAKI; MAEGAWA; MASHIMA, 2012).

Existem várias formas de obtenção de ésteres, dentre elas (PIAZZA, 2019):

- Produção a partir de ácidos carboxílicos e seus derivados, conforme Figura 1.

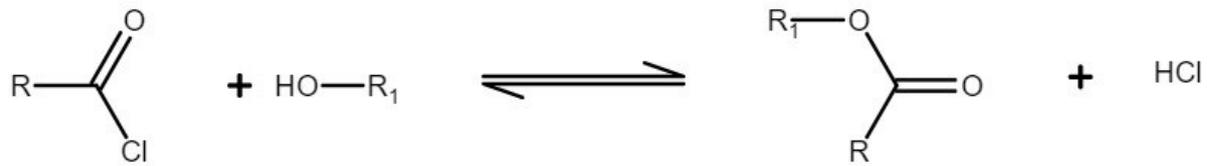
Figura 1 – Esterificação de Fischer.



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

- Esterificação de cloretos de ácidos, conforme Figura 2.

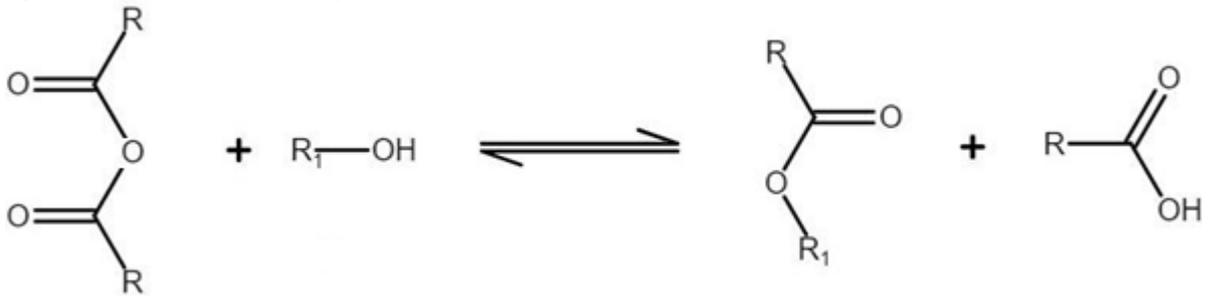
Figura 2 – Esterificação a partir de um cloreto de ácido e álcool.



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

- Esterificação de anidridos ácidos, conforme Figura 3.

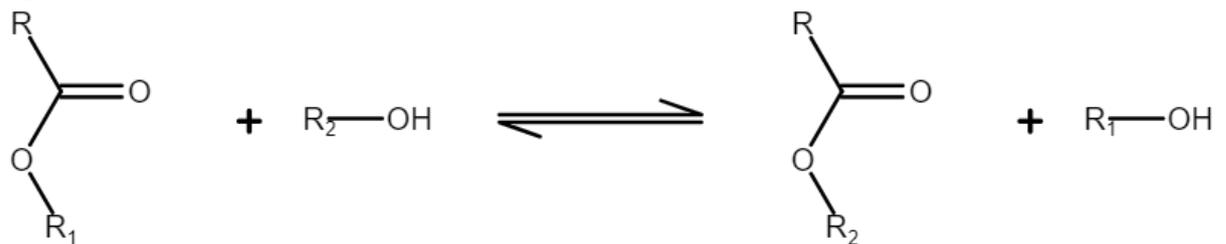
Figura 3 – Esterificação a partir de um anidrido ácido e um álcool (acilação).



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

- Transesterificação, conforme Figura 4, 5 e 6.
 - Alcoólise: neste processo o éster reage com um álcool.

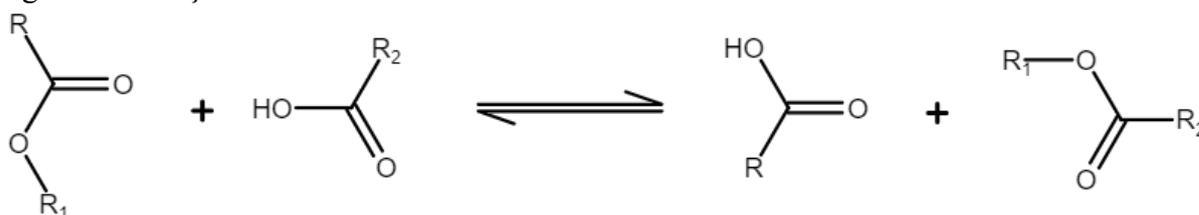
Figura 4 – Reação de alcoólise entre um éster e um álcool.



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

- Acidólise: neste processo o éster reage com um ácido.

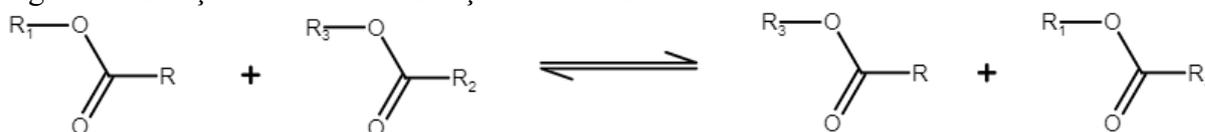
Figura 5 – Reação de acidólise entre um éster e um ácido.



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

- Intercâmbio éster-éster: neste processo ocorre uma troca entre dois ésteres.

Figura 6 – Reação de transesterificação entre dois ésteres.



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

Esses ésteres podem ser obtidos via rota química, portanto, não são reconhecidos como naturais, uma vez que durante o seu processo de produção e purificação utilizam solventes tóxicos e catalisadores ácidos, como também, pode haver a presença de metais halogenados em suas reações. Esses compostos citados anteriormente e utilizados na síntese química são considerados perigosos pois impactam negativamente o meio ambiente causando, por exemplo, poluição, além da possibilidade de provocar danos à saúde humana (MANAN *et al.*, 2016).

Outra desvantagem é o uso de altas temperaturas, que podem danificar o produto diminuindo sua qualidade, necessitando, com isso, de mais etapa de tratamento, elevando o seu custo (KHAN; RATHOD, 2015; MANAN *et al.*, 2016; MENESES, 2019; SÁ *et al.*, 2017). Ademais, a rota química pode formar subprodutos, diminuindo o rendimento do produto em consequência da falta de regioseletividade das reações, levando à necessidade de purificação do produto, assim como, o éster aromático formado pode conter traços de impurezas tóxicas, gerando complicações na saúde humana (BALEN, 2016; ISAH *et al.*, 2017; KHAN; RATHOD, 2015; MANAN *et al.*, 2016; MENESES, 2019; MOHAMAD *et al.*, 2015; SÁ *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

A qualidade do produto e a sua produção sustentável (gerando menos resíduo) são elementos de grande importância para a indústria. Para que isso seja alcançado, é importante que as matérias-primas que vão ser utilizadas sejam provenientes de fontes naturais ou

renováveis, benéficas a saúde, respeitando os princípios sociais e ambientais de sustentabilidade (BERGER, 2009; GALEMBECK; CSORDAS, 2010).

Por esta razão, a síntese enzimática de ésteres vem ganhando atenção por possuir vantagens perante a rota química, utilizando condições amenas e elevada eficiência catalítica, tornando-se industrialmente mais desejável, sendo uma alternativa para atender à crescente demanda de fabricação de produtos químicos verdes e sustentáveis (MANAN *et al.*, 2016; SANTOS, 2014; SOLANO *et al.*, 2012; WOHLGEMUTH, 2010).

A química verde pode ser definida como a implementação de produtos e processos com a finalidade de diminuir ou eliminar a utilização ou formação de substâncias que causam algum dano à saúde humana e ao meio ambiente (LENARDÃO *et al.*, 2003; MENESES, 2019; PARAVIDINO; HANEFELD, 2011). Na química verde, os produtos e os processos podem ser divididos em três categorias: a utilização de recursos renováveis ou recicláveis de matéria-prima; evitar o emprego de compostos tóxicos e bioacumulativos; ampliação da eficiência de energia, ou o uso de uma menor quantidade de energia para produzir a mesma ou maior quantidade de produto (LENARDÃO *et al.*, 2003).

Diversos estudos utilizaram enzimas como biocatalisadores na síntese de ésteres aromáticos, seguindo a definição de química verde, como mostra a Tabela 1, apresentando uma alternativa viável na síntese destes compostos.

Tabela 1 – Alguns dados da literatura de estudos envolvendo síntese de ésteres aromáticos utilizando lipases como biocatalisadores - continua.

Substratos	Razão Molar	Produto	Enzima	Conversão	Condições da reação	Referência
Benzoato de metila + Álcool benzílico	1:2 (benzoato/álcool)	Benzoato de benzila	Novozym [®] 435	90%	<ul style="list-style-type: none"> • 55 °C • 100 h de reação • 0,3 g de enzima • Sistema livre de solvente 	Gryglewicz; Jadownicka; Czerniak (2000)
Ácido cinâmico + Álcool oleílico	1:6 (ácido/álcool)	Cinamato de oleilo	Novozym [®] 435	> 99%	<ul style="list-style-type: none"> • 55 °C • 12 dias de reação • 20 mg de enzima • Solventes: 2-butanona e isooctano • Agitação: 150 rpm 	Lue <i>et al.</i> (2005) Yadav; Dhoot (2009)
Ácido láurico + Álcool cinamílico	1:1 (ácido/álcool)	Laurato de cinamila	Novozym [®] 435	60%	<ul style="list-style-type: none"> • 30 °C • 2 h de reação • 50 mg de enzima • Solvente: tolueno • Agitação: 200 rpm 	
Ácido benzoico + Eugenol	1:22 (ácido/eugenol)	Benzoato de eugenila	Lipase <i>Staphylococcus aureus</i> imobilizada	75%	<ul style="list-style-type: none"> • 41 °C • 6 h de reação • 240 IU de enzima • Solvente: clorofórmio • Agitação: 200 rpm 	Horchani <i>et al.</i> (2010)

Fonte: Autor, 2021.

Tabela 1 – Dados da literatura de estudos envolvendo síntese de ésteres aromáticos utilizando lipases como biocatalisadores - continua.

Substratos	Razão Molar	Produto	Enzima	Conversão	Condições da reação	Referência
Acetato de vinila + Álcool benzílico	5:1 (acetato/álcool)	Acetato de cinamilo	Lipase <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada	99%	<ul style="list-style-type: none"> • 45 °C • 24 h de reação • 50 mg de enzima • Solvente: hexano • Agitação: 180 rpm 	Dhake <i>et al.</i> (2011)
Eugenol + Ácido caprílico	2:1 (eugenol/ácido)	Caprilato de eugenila	Lipozyme® TL IM	72,2%	<ul style="list-style-type: none"> • 65 °C • 4,3 h de reação • 100 mg de enzima • Sistema livre de solvente • Agitação: 250 rpm 	Chaibakhsh <i>et al.</i> (2012)
Anidrido acético + Eugenol	3:1 (anidrido/eugenol)	Acetato de eugenila	Novozym® 435	99,86%	<ul style="list-style-type: none"> • 50 °C • 6 horas de reação • 5,5% (m/m) de concentração de enzima • Sistema livre de solvente • Agitação: 150 rpm 	Chiaradia <i>et al.</i> (2012)
Acetato de etila + Álcool cinamílico	15:1 (acetato/álcool)	Acetato de cinamilo	Novozym® 435	90,06%	<ul style="list-style-type: none"> • 40 °C • 3 h de reação • 2,67 g·L⁻¹ de enzima • Sistema livre de solvente • Agitação: 150 rpm 	Geng <i>et al.</i> (2012)

Fonte: Autor, 2021.

Tabela 1 – Dados da literatura de estudos envolvendo síntese de ésteres aromáticos utilizando lipases como biocatalisadores - continua.

Substratos	Razão Molar	Produto	Enzima	Conversão	Condições da reação	Referência
Acetato de vinila + Álcool cinâmílico	1:2 (acetato/ álcool)	Acetato de cinamilo	Novozym [®] 435	96%	<ul style="list-style-type: none"> • 40 °C • 1 h de reação • 10 mg de enzima • Solvente: tolueno 	Yadav; Devendran (2012)
Benzoato de metila + Álcool benzílico	1:2 (álcool/ benzoato)	Benzoato de benzila	Novozym [®] 435	79%	<ul style="list-style-type: none"> • 60 °C • 6 h de reação • 0,02 g/cm³ de enzima • Solvente: n-heptano • Agitação: 300 rpm 	Shinde; Yadav (2014)
Anidrido acético + Eugenol	5:1 (anidrido/ eugenol)	Acetato de eugenila	Novozym [®] 435	99,87%	<ul style="list-style-type: none"> • 60 °C • 6 h de reação • 10% (m/m) de concentração de enzima • Sistema livre de solvente • Agitação: 150 rpm 	Vanin <i>et al.</i> (2014)
Anidrido acético + Eugenol	5:1 (anidrido/ eugenol)	Acetato de eugenila	Lipozyme [®] TL IM	92,86%	<ul style="list-style-type: none"> • 70 °C • 2 h de reação • 5% (m/m) de concentração de enzima • Sistema livre de solvente • Agitação: 150 rpm 	Silva <i>et al.</i> (2015)

Fonte: Autor, 2021.

Tabela 1 – Dados da literatura de estudos envolvendo síntese de ésteres aromáticos utilizando lipases como biocatalisadores - continua.

Substratos	Razão Molar	Produto	Enzima	Conversão	Condições da reação	Referência
Acetato de vinila + Álcool cinamílico	2:1 (acetato/ álcool)	Acetato de cinamilo	Novozym [®] 435	99,99%	<ul style="list-style-type: none"> • 40 °C • 20 min de reação • 0,2% (m/m) de concentração de enzima • Sistema livre de solvente • Agitação: 150 rpm 	Tomke; Rathod (2015)
Ácido cinâmico + álcool benzílico	1:3 (ácido/álcool)	Cinamato benzílico	Lipozyme [®] TL IM	97,3%	<ul style="list-style-type: none"> • 40 °C • 24 h de reação • Isooctano como meio de reação • Agitação: 150 rpm 	Wang <i>et al.</i> (2015)
Propionato de vinil + Álcool cinamílico	2:1 (propionato/ álcool)	Propionato de cinamilo	Lipase <i>Pseudomonas cepacia</i> imobilizada	99%	<ul style="list-style-type: none"> • 40 °C • 1,5 h de reação • 20 mg de enzima • Solvente: hexano 	Badgujar; Pai; Bhanage (2016)
Eugenol + Ácido benzoico	4:1 (eugenol/ ácido)	Benzoato de eugenila	Lipase <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada	56,13%	<ul style="list-style-type: none"> • 60 °C • 6 h de reação • 15 mg de enzima • Solvente: clorofórmio • Agitação: 200 rpm 	Manan <i>et al.</i> (2016)

Fonte: Autor, 2021.

Tabela 1 – Dados da literatura de estudos envolvendo síntese de ésteres aromáticos utilizando lipases como biocatalisadores – continua.

Substratos	Razão Molar	Produto	Enzima	Conversão	Condições da reação	Referência
Anidrido acético + Eugenol	5:1 (anidrido/ eugenol)	Acetato de eugenila	Novozym [®] 435	33,23 ± 0.26%	<ul style="list-style-type: none"> • 40 °C • 1 h de reação • 1% (m/m) de concentração de enzima • CO₂ supercrítico como meio de reação • Agitação: 600 rpm 	Santos <i>et al.</i> (2016)
Ácido cinâmico + etanol	1:3 (ácido/ etanol)	Cinamato de etila	Lipozyme [®] TL IM	99%	<ul style="list-style-type: none"> • 40 °C • 24 h de reação • 30 mg de enzima • Isooctano como meio de reação • Agitação: 170 rpm 	Wang <i>et al.</i> (2016)
Ácido cinâmico + Geraniol	3:1 (geraniol/ ácido)	Cinamato de geranil	<i>Candida antarctica</i> (NS 88011)	75%	<ul style="list-style-type: none"> • 70 °C • 6 h de reação • 15% (m/m) de concentração de enzima • Solvente: n-heptano • Agitação: 150 rpm 	Zanetti <i>et al.</i> (2016)

Fonte: Autor, 2021.

Tabela 1 – Dados da literatura de estudos envolvendo síntese de ésteres aromáticos utilizando lipases como biocatalisadores – continuação.

Substratos	Razão Molar	Produto	Enzima	Conversão	Condições da reação	Referência
Ácido propiônico + Álcool benzílico	1:1 (ácido/ álcool)	Propionato de benzila	Novozym [®] 435	44%	<ul style="list-style-type: none"> • 50 °C • 24 horas de reação • 15% (m/m) de concentração de enzima • Sistema livre de solvente 	Sá <i>et al.</i> (2018)
Anidrido benzoico + Álcool benzílico	1:5 (álcool/ anidrido)	Benzoato de benzila	Novozym [®] 435	32%	<ul style="list-style-type: none"> • 60 °C • 24 h de reação • 10% (m/m) de concentração de enzima • Solvente: Terc-butanol • Agitação: 150 rpm 	Shiki (2018)
			Lipozyme [®] RM IM	51%	<ul style="list-style-type: none"> • 40 °C • 24 h de reação • 10% (m/m) de concentração de enzima • Solvente: Terc-butanol • Agitação: 150 rpm 	
Anidrido benzoico + Álcool benzílico	1:6 (anidrido/ álcool)	Benzoato de benzila	Lipozyme [®] TL IM	92%	<ul style="list-style-type: none"> • 50 °C • 6 h de reação • Sistema livre de solvente • Agitação: 150 rpm 	Meneses <i>et al.</i> (2020)

Fonte: Autor, 2021.

2.2.1 Enzimas

Enzimas são biocatalisadores que podem ser encontrados em células animais, vegetais, bem como em microrganismos (FABER, 1997). São proteínas que consistem em cadeias de aminoácidos com ligações peptídicas. Desempenham a função de catalisar reações bioquímicas sem consumir os substratos, ou seja, aceleram a velocidade das reações sem alterá-los (FERNANDES, 2012). As enzimas possuem alta especificidade e seletividade, facilidade de processamento e são altamente versáteis na catálise de vários tipos de reações (BADGUJAR; BHANAGE, 2015; GRYGLEWICZ; JADOWNICKA; CZERNIAK, 2000; SÁ *et al.*, 2017; SHARMA; KANWAR, 2014).

A finalidade de um catalisador é diminuir a energia de ativação, sendo assim, o mecanismo de ação enzimática dá-se através da ligação da enzima a uma molécula de substrato em uma região específica denominada sítio ativo (região na superfície da enzima em que ocorre a catálise). Esta região nada mais é que um encaixe constituído por uma série de aminoácidos que interagem com o substrato (SILVA, 2006). A especificidade da junção entre a enzima e o substrato depende da disposição dos átomos presentes no sítio ativo, influenciando certas transformações oxidativas e conjugativas que acontecem em elevadas velocidades catalíticas e com alta seletividade (KOELLER; WONG, 2001; SANTOS, 2014; STRYER, 1986).

A enzima forma um complexo ligado aos substratos (ou reagentes) durante a sua catálise e antes de liberar o produto. O substrato (S) se liga na enzima (E) (através de ligações não covalentes, sendo elas interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals ou interações hidrofóbicas) formando um complexo denominado enzima-substrato (ES), transformando o substrato em produto (P). Uma das explicações da enzima ter uma alta especificidade é por possuir estruturas tridimensionais, necessitando um encaixe perfeito com o substrato. Um modelo que explica a especificidade enzimática é o modelo chave-fechadura (BORZANI *et al.*, 2001; MOTTA, 2011).

É importante analisar as características do biocatalisador, pois cada enzima possui uma especificidade de substratos diferentes. Algumas dessas propriedades são: alta seletividade para a produção dos produtos desejados, com produção mínima de subprodutos indesejáveis; ter um bom desempenho nas condições propostas de reação, sendo estável no decorrer do processo e atingindo alta velocidade; o sítio ativo deve estar acessível para os reagentes e produtos, e possibilidade de reutilização (DUMESIC; HUBER; BOUDART, 2008; LAROQUE, 2014).

Outro fator que deve ser levado em conta é a quantidade de enzima, visto que uma maior porção acelera a formação do complexo enzima-substrato, aumentando a velocidade de

conversão. Contudo, se for adicionado uma quantidade muito elevada, esta pode se aglomerar bloqueando o acesso dos substratos (BADGUJAR; PAI; BHANAGE, 2016; GENG *et al.*, 2012; SÁ *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015; YADAV; DEVENDRAN, 2012).

Por conseguinte, devido a estes atributos, o interesse do setor industrial por tecnologias enzimáticas amplia-se cada vez mais, em especial nas indústrias alimentícia, têxtil, papel e celulose e na agricultura, a fim de se obter reduções significativas nos custos de produção e ter um produto considerado natural, ganhando mais visibilidade e preferência em um cenário que visa processos sustentáveis (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; SÁ *et al.*, 2017; SANTOS, 2014).

2.2.1.1 Lipases

Dentre as enzimas, podem-se destacar as lipases (EC 3.1.1.3), que são classificadas com o número 3.1.1.3, ou seja, elas são hidrolases (3), catalisam hidrólise de ligações ésteres (.1) carboxílicos (.1) e triacilglicerol hidrolases (.3) (SANTOS, 2019). Elas hidrolisam triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos e por esta razão fazem parte da classe das hidrolases (AL-ZUHAIR, 2005; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; NELSON; FOGLIA; MARMER, 1996; ROCHA, 2016). Essas enzimas são ativadas e reagem mais aceleradamente quando estão situadas na interface entre a fase não aquosa ou insolúvel (lipídica) e meios aquosos, em que a própria lipase é dissolvida, fazendo com que esse biocatalisador se diferencie das esterases (BORGES, 2016). Ou seja, a diferença entre a lipase e a esterase é que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água enquanto as esterases agem em substratos solúveis (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

As lipases são metabolicamente necessárias para a digestão de lipídios, por esta razão, elas podem ser encontradas nos organismos vivos, ou seja, em células de tecidos animais e vegetais ou ainda serem produzidas por microrganismos (CONTESINI *et al.*, 2010; SALIHU *et al.*, 2012). A obtenção desta enzima a partir de microrganismos é mais adequada para a aplicação industrial, devido ao seu maior potencial de produção em larga escala em comparação com outras fontes de lipase, além de normalmente serem mais estáveis (LOWRY; ROSEBROUGH; RANDALL, 1951; MACEDO; PARK; PASTORE, 1997; PARK; PASTORE; DE ALMEIDA, 1988).

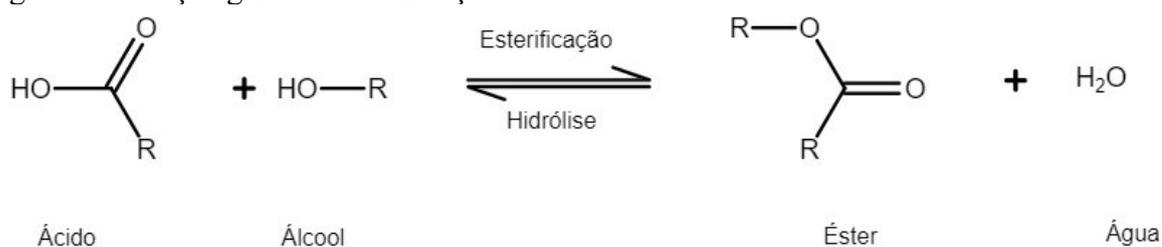
Essas enzimas atuam na hidrólise das ligações ésteres-carboxílicas de acilgliceróis, formando ácidos graxos e glicerol (DE CASTRO *et al.*, 2004; GANDHI, 1997; SANTOS, 2014; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998). Agem em condições amenas de

temperatura e pressão, alta atividade e estabilidade em água e solventes orgânicos, não necessitam da utilização de coenzimas e são consideradas altamente específicas (FRANCISCO, 2017; SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998; SUAREZ *et al.*, 2009). Sendo assim, é importante estabelecer previamente as condições ótimas de atuação em função das características desejadas do produto (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998; SUAREZ *et al.*, 2009).

As lipases podem catalisar reações de síntese, como de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolise e acidólise), aminólise (síntese de amidas), lactonização (esterificação intramolecular) e acilação (FICKERS; MARTY; NICAUD, 2011; JAEGER; EGGERT, 2002; MAHADIK *et al.*, 2002; MENESES *et al.*, 2020; SAXENA *et al.*, 2003). Catalisam diferentes reações podendo operar na obtenção de produtos farmacêuticos, cosméticos, agrícolas, química fina, e outros (FRANCISCO, 2017).

Além de quebrar as ligações ésteres de triacilglicerídeos utilizando moléculas de água, as lipases podem realizar a reação reversa em condições microaquosas, tendo como produto ligações ésteres de base álcool e ácido carboxílico (DE CASTRO *et al.*, 2004; GANDHI, 1997; SANTOS, 2014; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998). A água presente no meio reacional controla o deslocamento do equilíbrio da reação, ocorrendo a síntese no sentido direto e a hidrólise no sentido inverso da reação (GANDHI, 1997; SANTOS, 2014), como exemplificado na Figura 7 e 8.

Figura 7 – Reação geral de esterificação.



Fonte: Adaptado de Meneses (2019).

Figura 8 – Reação geral de transesterificação.



Fonte: Adaptado de Meher; Vidya Sagar; Naik (2006).

As características das lipases podem diferir dependendo da sua origem, porém, de maneira geral, a massa molecular pode variar entre 20 e 75 kDa, apresentam alta atividade na faixa de pH de 5 a 9 (com um máximo situado entre 6 e 8), toleram temperaturas variando desde ambiente até em torno de 70 °C (sendo que a sua atividade ótima varia de lipase para lipase) e possuem ponto isoelétrico entre 3,6 e 7,6, sendo majoritariamente acídicas (FERRER *et al.*, 2000; MAYORDOMO; RANDEZ-GIL; PRIETO, 2000; MENESES, 2019). Sua termoestabilidade varia de acordo com a fonte, sendo as lipases microbianas as que dispõem de maior estabilidade térmica (DE CASTRO *et al.*, 2004; KAPOOR; GUPTA, 2012; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

2.2.1.1.1 Lipases imobilizadas como biocatalisadores

O processo de imobilização de enzimas tem como objetivo transformar o biocatalisador que naturalmente é solúvel em meio aquoso, em um catalisador heterogêneo, ou seja, a enzima se torna insolúvel no meio reacional (BON; FERRARA; CORVO, 2008; HILAL *et al.*, 2006).

A utilização de enzimas em processos industriais na sua forma livre possui certas desvantagens, pois estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, isto é, apresentam baixa estabilidade térmica, mecânica, a solventes e operacional e, ainda, não podem ser recicladas, gerando um custo maior de produção. Estas desvantagens podem ocorrer quando estocadas ou durante o uso no processo de produção (BADGUJAR; BHANAGE, 2015; FERRAZ *et al.*, 2015; SHARMA; KANWAR, 2014).

A fim de prevenir essas questões e garantir a eficiência da atividade catalítica enzimática, diversas técnicas de imobilização vêm sendo estudadas, protegendo a enzima de interações com o solvente, oferecendo vantagens frente a enzima livre. Dentre tais vantagens, podemos citar: menor custo de produção; acréscimo da atividade; especificidade e seletividade; estabilidade estrutural aprimorada; redução da inibição; facilidade de separação, recuperação e reutilização do biocatalisador devido a característica heterogênea, além do aumento da vida útil da enzima frente às condições de temperatura, pH e solvente, por exemplo (BASSO; HESSELER; SERBAN, 2016; DHAKE *et al.*, 2011; KUO *et al.*, 2012; NARWAL *et al.*, 2016). Deste modo, o uso de catalisadores heterogêneos segue os interesses da indústria de síntese orgânica, bem como, os requisitos da química verde (MENESES *et al.*, 2020).

Os processos enzimáticos heterogêneos podem ser realizados em batelada (possuem uma configuração mais simples e são os mais utilizados na indústria), semi-batelada ou de

forma contínua (MENESES *et al.*, 2020). As condições do processo devem ser adequadamente controladas, pois o sistema de agitação, por exemplo, pode alterar a atividade da enzima imobilizada através da fragmentação do suporte, com isso, a enzima pode ser retirada do suporte causando perda da atividade por lixiviação, e não por inativação. Em compensação, se não ocorrer a lixiviação e a enzima continuar ligada ao suporte, a agitação pode ocasionar o aumento de área de superfície de contato, gerando uma maior transferência de massa e, deste modo, aumentando a eficiência da enzima como catalisador (BOSLEY; PEILOW, 1997; HURTADO; PAZ, 2006; RAMPIN, 2007; YADAV; JADHAV, 2005).

As lipases produzidas intra ou extracelularmente por microrganismos, como *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Mucor* sp. e *Rhizopus* sp., são as mais estudadas, tendo importância a catálise enzimática realizada pelas lipases comerciais Novozym[®] 435 (lipase B produzida por *Candida antarctica* (CAL B), imobilizada em Lewatit VP OC 1600, uma resina acrílica macroporosa com superfície hidrofóbica), e Lipozyme[®] TL IM (produzida por *Thermomyces lanuginosus*, imobilizada em silicato de gel hidrofílico) (HERNÁNDEZ-MARTÍN; OTERO, 2008; SÁ *et al.*, 2017).

A Novozym[®] 435 é imobilizada via ativação interfacial na superfície hidrofóbica do suporte, ao passo que a Lipozyme[®] TL IM é imobilizada através de troca aniônica (MARTINS *et al.*, 2014). A Novozym[®] 435 apresenta algumas vantagens, dentre elas: possui um bom desempenho sob condições anidras e com substratos sensíveis à umidade; é resistente em uma ampla faixa de temperatura (20 - 110 °C); adequada para reatores de tanque agitado e leito fixo contínuo; dependendo das condições da reação pode ser reciclada de 5 a 10 vezes sem perda de atividade e, pode ser usada na produção industrial de larga escala (NOVOZYMES, 2016). A Tabela 2 apresenta as propriedades físicas da Novozym[®] 435 e Lipozyme[®] TL IM.

Tabela 2 – Propriedades físicas de duas lipases comerciais imobilizadas da Novozymes.

Nome da enzima	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Especificidade do substrato
Novozym [®] 435	5 – 9	30 – 60	Ésteres e álcoois
Lipozyme [®] TL IM	6 – 8	50 – 75	Ésteres

Fonte: NOVOZYMES (2016).

Na forma imobilizada, estudos relatam que as lipases já foram utilizadas na:

- a) desacetilação da quitosana para a produção de oligossacarídeos (LEE; XIA; ZHANG, 2008);
- b) agregação de antioxidantes em óleos (SENANAYAKE; SHAHIDI, 2004);
- c) síntese de compostos como o acetato de benzila (BADGUJAR; PAI; BHANAGE, 2016), o acetato de eugenila (SÁ *et al.*, 2017), benzoato de benzila (MENESES *et al.*, 2020), monoestearato de etilenoglicol (PEREIRA, 2018), estearato de cetosteáril (HOLZ, 2018), acetato de amil (BADGUJAR; SASAKI; BHANAGE, 2015), propionato de benzila e o butirato de benzila (SÁ, 2018), dentre outros.

2.2.1.2 Reuso de enzimas

O uso de enzimas imobilizadas tem diversas vantagens, como citado no tópico anterior, e uma delas é a possibilidade de reutilização do biocatalisador, aumentando a viabilidade do processo e diminuindo a geração de resíduos na reação. A reutilização de enzimas é um dos principais fatores para maximização da síntese enzimática (DHAKA *et al.*, 2012). Este catalisador tem um custo elevado, portanto, o reuso pode ser uma condição importante para a viabilidade econômica do projeto (BASSO; HESSELER; SERBAN, 2016; LOSS *et al.*, 2016; TRUBIANO; BORIO; ERRAZU, 2007).

Diversos estudos encontraram dificuldade no decorrer dos ciclos de reuso, pois pode haver um declínio do percentual de conversão do produto devido à perda da atividade catalítica (FERRAZ *et al.*, 2015; LOSS *et al.*, 2016; SHIKI, 2018; YADAV; JADHAV, 2005; YADAV; LATHI, 2004). Uma das razões para que isso ocorra é a desativação do biocatalisador por fatores químicos, físicos ou biológicos, como por exemplo, interação com o solvente, variações nas condições da reação (como temperatura e pH), elevada velocidade de agitação, bem como, a dificuldade em acessar o sítio ativo devido à natureza do suporte (BADGUJAR; BHANAGE, 2014; LERIN *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2014; SANTOS, 2014; WANG *et al.*, 2015). Alguns reagentes, como o álcool em excesso e ácido, também podem desnaturar a enzima comprometendo a sua atividade (GENG *et al.*, 2012; SÁ *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015). Por esta razão, o tempo de contato com o substrato tem que ser estudado a fim de evitar este comportamento.

Com a finalidade de avaliar a estabilidade da enzima, Shiki (2018) produziu benzoato de benzila com o auxílio das enzimas comerciais imobilizadas Novozym[®] 435 e Lipozyme[®] RM IM, porém, não obteve resultado satisfatório na reutilização por cinco ciclos devido à perda

de conversão do produto. A conversão do benzoato de benzila no primeiro ciclo, utilizando a Lipozyme[®] RM IM, foi entre 45-50%. No segundo ciclo teve uma queda considerável de $\pm 20\%$ e no terceiro de $\pm 15\%$, mantendo este valor aproximado nos últimos dois ciclos. Nos testes usando a Novozym[®] 435 a conversão iniciou entre 20-25%, caindo em $\pm 10\%$, tendo uma queda mais leve até o quinto processo de reciclo.

Lerin *et al.* (2011) estudaram dez ciclos sucessivos utilizando a Novozym[®] 435 como catalisador para a síntese de benzoato de 1-glicerila, obtendo uma atividade residual da enzima próxima de 100% após quatro ciclos, e depois, a atividade enzimática e a conversão do produto desejado foi diminuindo.

Já Balen (2016) estudou a síntese de oleato de ascorbila utilizando Novozym[®] 435, nas temperaturas de 60 e 70 °C, na presença de terc-butanol com irradiação de micro-ondas. Foram realizados seis ciclos de reutilização do biocatalisador, havendo um declínio na conversão a partir do terceiro ciclo, para ambas as temperaturas.

Yadav; Jadhav (2005) observaram essa queda na transesterificação entre álcool p-clorobenzílico e acetato de vinila. A enzima *Candida antarctica* lipase B (CAL B) foi testada de três formas nesta reação: CAL B imobilizada em sílica mesoporosa hexagonal (HMS); CAL B encapsulada e CAL B imobilizada em HMS e encapsulada. A forma encapsulada e imobilizada obteve a melhor conversão, mantendo um valor próximo do primeiro ciclo por cinco reutilizações. Já os outros dois testes, teve uma queda de aproximadamente 60% até o quinto ciclo, sendo que no segundo foi um declínio de 40%.

No estudo de Loss *et al.* (2016), foi produzido acetato de eugenila com a ajuda de Lipozyme[®] TL IM, obtendo 94,3% de conversão para o primeiro ciclo, 75,2% para o segundo e 53,2% para o terceiro, repetindo essa tendência de redução até o quinto ciclo. Sá (2018) avaliou a atividade enzimática da Novozym[®] 435 na reação de esterificação entre álcool benzílico e ácido butírico, no primeiro ciclo obteve uma conversão em torno de 80%, porém, no segundo caiu para cerca de 10% e no terceiro para próximo de 0%.

Outro estudo foi o de Majumder *et al.* (2006), que realizou testes de reutilização da Lipozyme[®] RM IM na transesterificação do acetato de benzila em sistema livre de solvente, foram executados 21 ciclos, e observou-se que em 18 ciclos a atividade residual da enzima permaneceu constante em 100%, decaindo nos ciclos posteriores. Ferraz *et al.* (2015) constatou o declínio da atividade enzimática da lipase de *Penicillium crustosum* imobilizada em alginato de sódio na síntese de propionato de geranil em seis ciclos, em sistema livre de solvente. Por

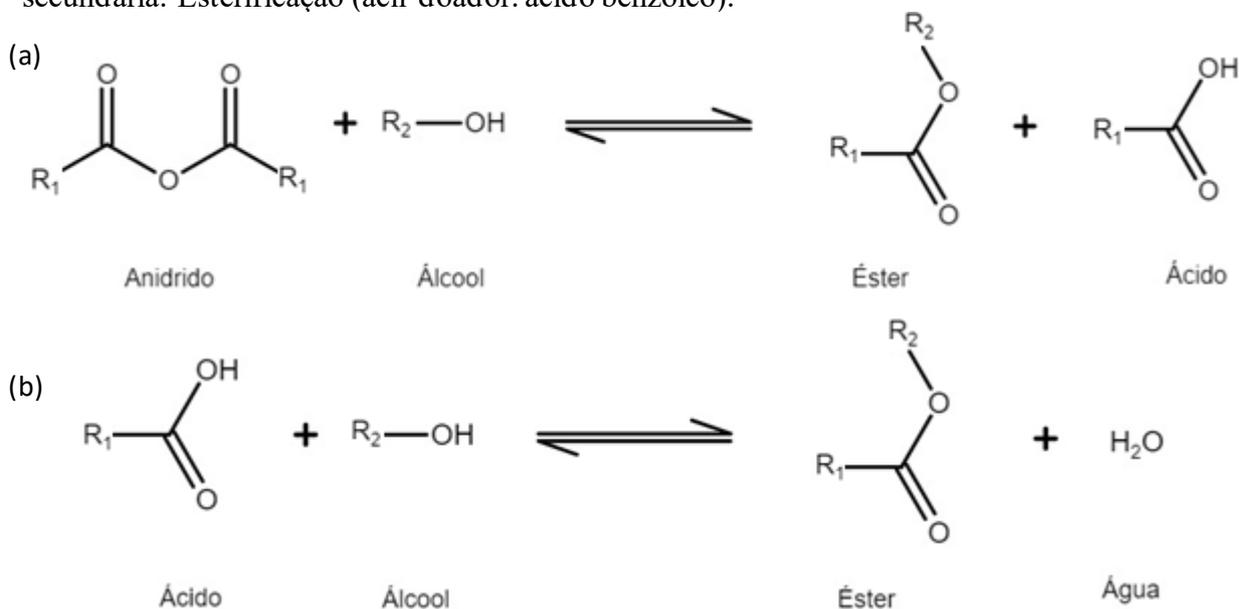
fim, Yadav; Lathi (2004) observaram, após três ciclos, esta redução da atividade enzimática da Novozym[®] 435 na produção de laurato de citronela na presença de heptano.

2.2.2 Acilação enzimática

O emprego da reação de acilação na produção de compostos da química fina é muito comum, especialmente na indústria farmacêutica e em fragrâncias (KOUWENHOVEN; BEKKUM, 1997; MONTAÑEZ VALENCIA; PADRÓ; SAD, 2020; SHEEMOL; TYAGI; JASRA, 2004). Alguns autores chamam a reação de acilação de esterificação, gerando conflitos na nomenclatura (MENESES, 2019).

Um exemplo de acilação é quando se utiliza álcool (receptor de grupo acila) e anidrido (doador acila) como substrato na síntese de ésteres aromáticos (MENESES, 2019). O mecanismo se dá através a doação de dois grupos acilas do anidrido: um para formar uma molécula de éster e outra ácida. O ácido formado a partir da reação de acilação pode reagir com o álcool que está presente em excesso, fazendo com que ocorra a esterificação (KIM; PARK, 2017; MENESES, 2019; ROMERO *et al.*, 2007), como mostra a Figura 9.

Figura 9 – Esquema geral da síntese de éster aromático usando anidrido e álcool como substrato, onde (a) Reação principal: Acilação (acil doador: anidrido benzoico) e (b) Reação secundária: Esterificação (acil doador: ácido benzoico).



Fonte: Adaptado de Meneses (2019).

Podem-se encontrar, na literatura, alguns exemplos de síntese de ésteres através da reação de acilação enzimática entre álcool e anidrido. Romero *et al.* (2007) sintetizou acetato

de isoamila via acilação enzimática do álcool isoamílico com anidrido acético usando a lipase Novozym[®] 435, tendo como resultado uma reação que seguiu um mecanismo de Ping-Pong Bi-Bi com inibição pelo anidrido acético para concentrações acima de 0,1 M.

Shiki (2018) produziu benzoato de benzila através da reação de acilação entre álcool benzílico e anidrido benzoico e comparou o comportamento das lipases imobilizadas comerciais Novozym[®] 435 e Lipozyme[®] RM IM, ambas com concentração de 10%. Shiki (2018) obteve como resultado uma conversão máxima de 32% em 24 horas para a Novozym[®] 435, na temperatura de 60 °C e uma razão molar de 1:5 (álcool benzílico:anidrido benzoico). Já para a Lipozyme[®] RM IM, uma conversão de 51% foi obtida a 40 °C em 24 horas e com a razão molar igual a 1:5 (álcool benzílico:anidrido benzoico).

Já Chiaradia *et al.* (2012) sintetizaram o acetato de eugenila em um sistema isento de solventes utilizando como catalisador a enzima Novozym[®] 435, obtendo conversão de 99%, sendo as condições operacionais que maximizaram a produção foram 50 °C, eugenol em anidrido acético de 1:3, 150 rpm e 5,5% em massa de enzima.

Vários trabalhos da literatura mostram que a produção biotecnológica de ésteres aromáticos é possível, porém uma maximização do processo é interessante, a fim de reduzir o consumo de insumos e substratos, facilitando um aumento de escala e almejando uma aplicação industrial (BÔAS *et al.*, 2017; CENI *et al.*, 2010; HOLZ, 2018; LAROQUE, 2014; LOSS, 2015; MENESES, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2006; RICHETTI, 2009; SÁ, 2018; SHIKI, 2018; SILVA, 2014). Para realizar a otimização ou a maximização da produção, é necessário estudar os efeitos das condições que influenciam o processo de produção, como por exemplo, a quantidade e o tipo de enzima; a razão molar e a natureza dos substratos; a temperatura; o tempo de reação; a presença ou não de solvente e a velocidade de reação (GENG *et al.*, 2012; PAROUL *et al.*, 2012; SÁ *et al.*, 2017; STENCEL; LEADBEATER, 2014).

2.3 PURIFICAÇÃO DE ÉSTERES AROMÁTICOS

Após a síntese do éster é necessário avaliar a necessidade de realizar a etapa de purificação para confirmação da estrutura do éster aromático, garantir a ausência de subprodutos de reações secundárias e remoção de substratos não reagidos, principalmente quando adicionados em excesso no início da reação. A purificação do produto de interesse envolve etapas como a separação do catalisador e remoção de produtos secundários que foram formados na reação (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008). Normalmente, as metodologias mais utilizadas para obter um éster aromático purificado são a

de extração líquido-líquido e separação por coluna (FERREIRA, 2018; MENESES, 2019; SHIKI, 2018; SILVA *et al.*, 2012).

Shiki (2018) purificou o benzoato de benzila utilizando cromatografia em coluna de adsorção com sílica gel como fase estacionária, e fase móvel sendo uma mistura de acetato de etila e ciclohexeno (1:14 v/v) acidificada com ácido acético (2% v/v). Depois, as amostras foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. E para confirmação da purificação da amostra, as frações coletadas foram avaliadas por cromatografia gasosa.

O éster aromático butirato de benzila foi purificado por Meneses (2019) utilizando extração líquido-líquido. Primeiramente, foi misturado acetato de etila com NaOH 1 M (para remover o ácido butírico não reagido) e homogeneizado com água destilada. Após, foi filtrado sob vácuo com sulfato de sódio a fim de remover a água restante. Meneses (2019) posteriormente colocou a fase orgânica no rotaevaporador com uma bomba de vácuo acoplada para remover o acetato de etila e álcool benzílico que não reagiram, para então, analisar a purificação do éster por cromatografia gasosa.

Laroque (2014) purificou acetato de eugenila utilizando rotaevaporador a 45 °C por 4 horas e, posteriormente, as amostras passaram pela análise de RMN para a confirmação de sua produção e purificação. Silva *et al.* (2015) também purificou acetato de eugenila utilizando rotaevaporador, porém, sob pressão reduzida.

Ésteres derivados da reação entre ácidos triterpenos e anidridos foram purificados por Silva *et al.* (2012) por cromatografia em coluna com sílica gel, utilizando hexano-EtOAc (9:1) como eluente. A partir do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico, Ferreira (2018) sintetizou onze ésteres e realizou a purificação através da técnica de cromatografia de absorção em coluna (CC), em que a fase estacionária foi sílica gel 60 ART 7734 da MERK, sendo as partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm, suportada em colunas de vidro cilíndricas. Já a fase móvel foi uma mistura com proporções variáveis entre hexano e acetato de etila.

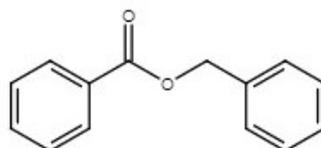
Além da síntese, a etapa de purificação é outra etapa importante no processo de catálise dos ésteres aromáticos, sendo necessário um estudo de afinidade entre as fases, substratos e produtos, para ser aplicada adequadamente e obter resultado satisfatório.

2.4 BENZOATO DE BENZILA

Benzoato de benzila (C₁₄H₁₂O₂) é um éster aromático, representado na Figura 10. Esse possui um leve aroma, e é insolúvel em água e glicerol com miscibilidade em álcool,

clorofórmio, éter e óleos (SHARMA *et al.*, 2015). É encontrado em algumas plantas, como babaco (*Carica pentagona Heilborn*), alcaparra (*Capparis spinosa*) e aipo (*Apium graveolens*) (SÁ *et al.*, 2017; SHARMA *et al.*, 2015).

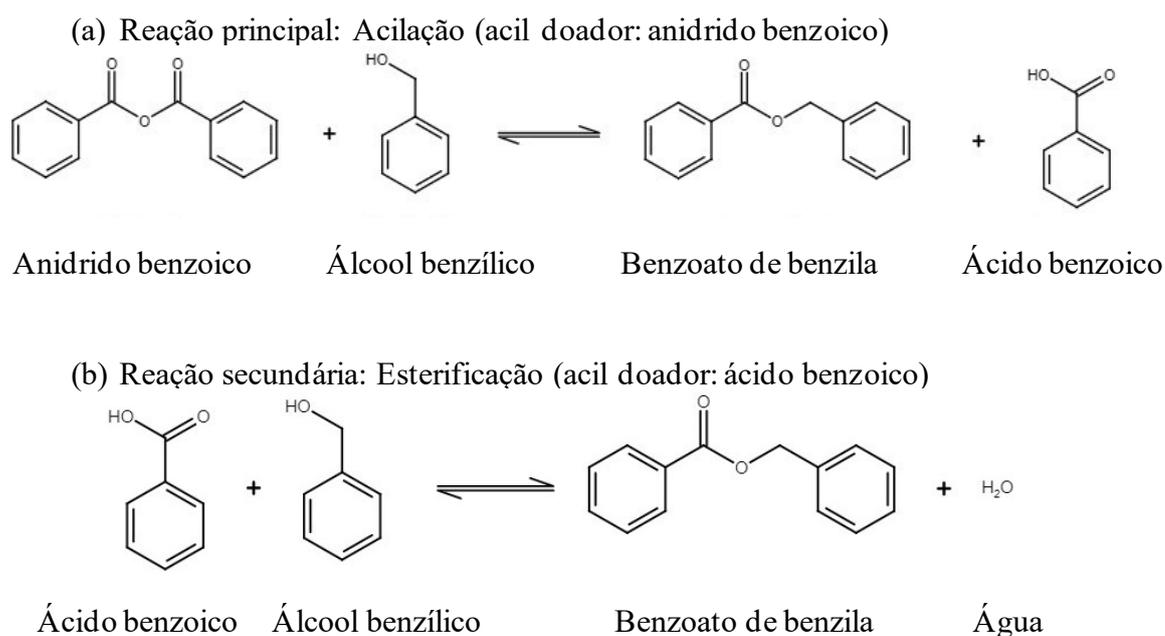
Figura 10 – Fórmula estrutural do benzoato de benzila.



Fonte: Johnson *et al.* (2017).

Esse éster já foi produzido tanto por esterificação enzimática, mas obteve conversões consideravelmente baixas, quanto por transesterificação enzimática, que é um processo com custos relativamente altos em comparação a acilação (que utiliza substratos mais baratos como o álcool benzílico) (GRYGLEWICZ; JADOWNICKA; CZERNIAK, 2000; SHIKI, 2018; MENESES, 2019). Por esta razão, dentre os processos catalíticos, a acilação enzimática é uma possibilidade na síntese de benzoato de benzila, podendo ser produzido através da reação entre álcool benzílico (receptor de acila) e anidrido benzoico (doador de acila) (JASPER; 2018; MENESES, 2019; SHIKI, 2018), como representado na Figura 11.

Figura 11 – Esquema reacional da produção enzimática de benzoato de benzila.



Fonte: Adaptado de Meneses (2019).

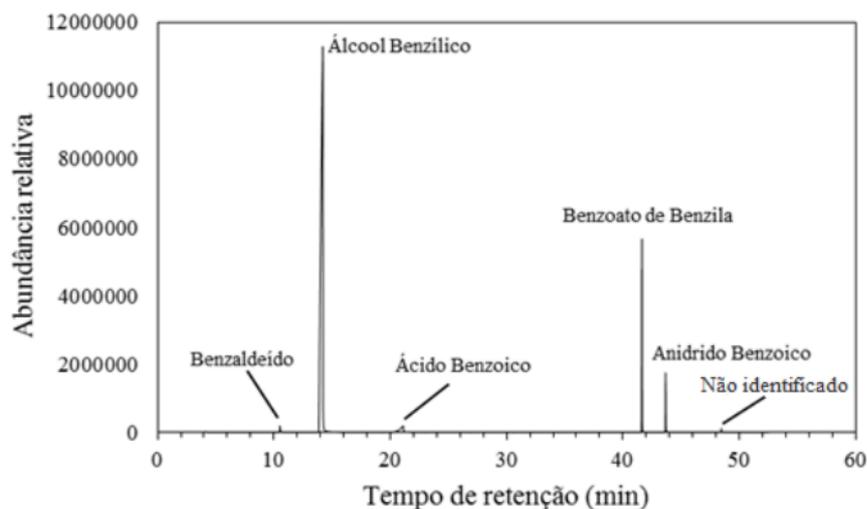
A razão molar é um parâmetro importante a ser analisado, pois, além de evitar a perda de reagente, a quantidade de substrato influencia na atividade enzimática, como também, na composição do produto (BADGUJAR; BHANAGE, 2015; GUMEL; ANNUAR, 2016; WANG *et al.*, 2011a). Na etapa de esterificação da Figura 11, o ácido pode contribuir na inibição da enzima e causar diminuição na atividade catalítica (BADGUJAR; BHANAGE, 2014, 2015; BADGUJAR; PAI; BHANAGE, 2016; MENESES *et al.*, 2020; SÁ *et al.*, 2017). Uma maneira de amenizar esse efeito, é aumentando a quantidade de álcool até certo ponto em que ele não interfira na ação enzimática, pois o álcool também pode inibir o catalisador quando usado em uma quantidade muito maior em comparação ao outro reagente (BADGUJAR; BHANAGE, 2015; GUMEL; ANNUAR, 2016; SÁ *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015). Além disso, o aumento da concentração de álcool benzílico contribui, também, com a solubilização do anidrido benzoico, que é sólido (MENESES *et al.*, 2020).

Com relação a produção, existem poucos estudos na literatura sobre a síntese de benzoato de benzila utilizando biocatalisador, sendo mais comum para a indústria a síntese via rota química. Pode-se citar o trabalho de Gryglewicz; Jadownicka; Czerniak (2000), que utilizou a Novozym[®] 435 com os reagentes álcool benzílico e o éster benzoato de metila (2:1), num processo de transesterificação a 55 °C, sem a presença de solvente, atingindo uma conversão de 90% em 100 horas de reação.

Meneses *et al.* (2020) sintetizaram via acilação enzimática da reação entre anidrido benzoico e álcool benzílico a 50 °C, utilizando Novozym[®] 435, Lipozyme[®] TL IM e RM IM como biocatalisadores, na ausência de solventes orgânicos, chegando a uma conversão de 92% para um processo em batelada (razão de anidrido benzoico:álcool benzílico, 1:6), e 90% na batelada alimentada (1:3) usando a Lipozyme[®] TL IM como biocatalisador.

Jasper (2018) também estudou a síntese deste éster com o auxílio dos catalisadores Novozym[®] 435, Lipozyme[®] TL IM e RM IM (10% m/m) variando a razão molar, temperatura, presença ou não de solvente e o anidrido benzoico ou o ácido benzoico como um dos substratos (sendo o álcool benzílico o outro reagente). Jasper (2018) realizou a caracterização das amostras em um cromatógrafo gasoso. Analisando os resultados, a enzima que apresentou maior conversão (~77%) foi a Lipozyme[®] TL IM, com uma razão molar de 1:9 (anidrido benzoico: álcool benzílico), na ausência de solvente a 50 °C em até 24 horas. A Figura 12 mostra um exemplo do cromatograma obtido ao final de 12 h de reação.

Figura 12 – Cromatograma do resultado obtido através da análise em CG acoplado com espectrometria de massas.



Fonte: Jasper, 2018.

2.4.1 Atividade biológica do benzoato de benzila

Benzoato de benzila é um dos medicamentos mais antigos utilizado no tratamento de escabiose, que é uma infecção de pele altamente contagiosa, um dos distúrbios cutâneos pruriginosos mais comum (BACHEWAR *et al.*, 2009; HENGGE *et al.*, 2006; MENESES *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2015; SHIKI, 2018). Esta doença é caracterizada por lesões que podem cobrir o corpo todo, formando crostas, descamação e hiperqueratose (HUFFAM; CURRIE, 1998).

A escabiose é uma doença comum e global, que afeta todas as classes sociais e comunidades, contudo, ocorre maior incidência nos países em desenvolvimento, áreas com poucos recursos, falta de saneamento e superlotação (FULLER, 2013; HENGGE *et al.*, 2006; TAPLIN *et al.*, 1990). Uma divulgação da Organização Mundial da Saúde (OMS) apresenta dados de ocorrências alarmantes: 9,7 – 13% casos na Índia, 23 – 30% em crianças abaixo de 6 anos em Bangladesh, 4,3% no Camboja e 0,7% em Malawi (SHARMA *et al.*, 2015).

Os fármacos mais utilizados no tratamento de escabiose são: permetrina, lindano, ivermectina e benzoato de benzila, sendo que este último vem sendo usado em países subdesenvolvidos devido ao baixo custo (HEUKELBACH; FELDMEIER, 2006; KARTHIKEYAN, 2005).

O uso tópico de benzoato de benzila com o intuito de tratar a escabiose vem sendo usado em adultos, e diluído para bebês, crianças e lactantes (HENGGE *et al.*, 2006). Comparando o resultado *in vitro* entre benzoato de benzila e permetrina mostra a superioridade do primeiro na eficácia do tratamento de escabiose (CURRIE *et al.*, 2004; GLAZIOU *et al.*,

1993; WALTON; MYERSCOUGH; CURRIE, 2000). Apesar da eficiência, um efeito colateral relacionado ao uso do benzoato de benzila em forma de loção concentrada (25% v/v) é a sensação inicial de queimação severa, que já foi relatada por alguns pacientes (CURRIE *et al.*, 2004). Além disso, também pode ocorrer formação de bolhas, crostas, coceira, exsudação, vermelhidão e descamação da pele, após a aplicação frequente (CURRIE *et al.*, 2004; WALTON; MYERSCOUGH; CURRIE, 2000).

O mecanismo de ação deste éster sobre o parasita ainda não está muito esclarecido na literatura, porém, acredita-se que ele aja sobre o sistema nervoso do parasita (*Sarcoptes scabiei*), resultando na sua morte (ALBERICI *et al.*, 2000; KARTHIKEYAN, 2005).

Benzoato de benzila também possui atividade contra ácaros, podendo estar presente em formulações de alguns produtos de limpeza acaricidas (HAYDEN *et al.*, 1992; NWANADE *et al.*, 2022; RAYNAUD *et al.*, 2000). Estudos realizados por Kalpaklioglu *et al.* (1996) mostraram que este éster em uma concentração de 0,8% matou todos os ácaros em 15 minutos, 1 h com a solução a 0,4% e 3 h com a solução 0,1%. Uma composição de celulose inerte umedecida com o benzoato de benzila ativo adsorvido em silicatos foi capaz de matar 90% dos ácaros em cultura dentro de 12 horas e 100% em 24 horas (HAYDEN *et al.*, 1992). Monteiro (2013) comprovou que benzoato de benzila interfere no processo de reprodução do carrapato bovino *R. microplus*, agindo na diminuição da produção de ovos, eclodibilidade e mortalidade das larvas. Na Guerra do Vietnã foi utilizado como repelente de carrapatos e ácaros, e pode ser utilizado, também, como aditivo na indústria cosmética (SHARMA *et al.*, 2015). Segundo Choi *et al.* (2005), este éster também pode possuir a atividade de agente imunoterapêutico no tratamento de doenças infecciosas. Ademais, ele pode ser usado como solvente ou na composição de pesticidas (JOHNSON *et al.*, 2017). Na indústria de alimentos, pode ser utilizado na formulação de aromas como o de maçã, damasco, banana, mirtilo, cereja, amora, uva, melão, abacaxi e framboesa (SÁ *et al.*, 2017). Ele também pode atuar como acaricida em alimentos, por exemplo, em produtos secos como os grãos que podem ser degradados pelo ácaro *Tyrophagus putrescentiae* (AL-ASSIUTY; NENAAH; AGEBA, 2019; HAGSTRUM; PHILLIPS; CUPERUS, 2012).

Shiki (2018) verificou ação antimicrobiana moderada do benzoato de benzila para *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). Estudos avaliaram a atividade antimicrobiana deste éster, e o resultado para *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) verificou ação antimicrobiana moderada do benzoato de benzila (DIASTUTI; CHASANI; SUWANDRI, 2020). Todavia,

ainda é necessário estudar outras atividades biológicas, como antifúngica em alimentos e antimicrobiana.

2.5 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

Com base na revisão da literatura apresentada neste capítulo, pode-se observar que a produção de ésteres aromáticos via acilação enzimática sem a presença de solvente, usando álcool e anidrido como substrato, ainda é pouco explorada. Um dos compostos que podem ser produzidos através dessa metodologia é o benzoato de benzila, que é a substância mais utilizada no tratamento de escabiose e, atualmente, é produzido industrialmente via rota química. Em vista disso, o uso de enzimas como biocatalisadores é uma alternativa, apresentando várias vantagens frente à síntese química. A partir disso, o presente trabalho propõe realizar a produção via acilação enzimática sem a presença de solventes e a purificação deste éster, bem como a maximização da conversão do processo, avaliação da estabilidade da enzima através do reuso, estudo preliminar das atividades biológicas do benzoato de benzila e possibilidade de produção em escala ampliada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão abordados os materiais e os métodos que foram utilizados para desenvolver o presente trabalho.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Especificação das soluções

Na reação de acilação para produzir o benzoato de benzila, os substratos utilizados foram:

- Álcool benzílico PA (Neon, 99,9%);
- Anidrido benzoico (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$).

O teste de solubilidade foi realizado com os seguintes compostos:

- Ácido benzoico P.A. (Vetec, 99,5%);
- Anidrido benzoico (Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$).

Os solventes usados foram:

a) Para a lavagem das enzimas no processo de reuso e para o teste de solubilidade dos reagentes:

- Acetona (Dinâmica, 99,5%);
- Hexano P.A. (Synth, 98,5%);
- Acetato de etila (Dinâmica, 99,8%);
- Acetonitrila (Dinâmica, 99,8%);
- Pentano (Dinâmica, 99%);
- Iso-octano P.A. (Vetec, 99,5%);
- Álcool amílico normal P.A. (Vetec, 98%);
- Álcool isopropílico P.A. (Synth, 99,5%);
- Álcool-n-propílico (Neon, $\geq 99\%$);
- Álcool butílico P.A. (Vetec, 99,4%);
- Álcool etílico P.A. (Neon, 99,5%).

b) Na diluição da amostra para análise de cromatografia gasosa:

- Diclorometano P.A. (Qhemis, 99,9%).

Para a avaliação da atividade enzimática, os compostos utilizados foram:

- Acetona P.A. (Dinâmica, 99,5%);
- Álcool etílico P.A. (Neon, 99,5%);
- Hidróxido de sódio (Vetec, 99%);
- Álcool-n-propílico (Neon, $\geq 99\%$);
- Biftalato de potássio normal P.A. (Vetec, 99,5%);
- Ácido láurico P.A. (Dinâmica, 98%).

Os reagentes utilizados para avaliar a atividade biológica do produto obtido foram:

- Penicilina (Sigma Aldrich);
- Glutamina (Sigma Aldrich);
- Estreptomicina (Sigma Aldrich);
- Dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich, $\geq 99\%$).

Na purificação do benzoato de benzila as soluções utilizadas foram:

a) Na extração líquido-líquido:

- Acetato de etila (Sigma Aldrich, $\geq 90\%$);
- Hidróxido de sódio (Vetec, 99%).

b) Na análise de RMN:

- Clorofórmio deuterado (Sigma Aldrich, 99,8%).

O padrão empregado para gerar a curva de calibração no cromatógrafo gasoso foi:

- Benzoato de benzila (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$).

3.1.2 Biocatalisador

A lipase comercial imobilizada utilizada como biocatalisador neste estudo foi:

- Lipozyme[®] TL IM (Novozymes): produzida por *Thermomyces lanuginosus*, imobilizada em silicato de gel hidrofílico.

3.1.3 Equipamentos

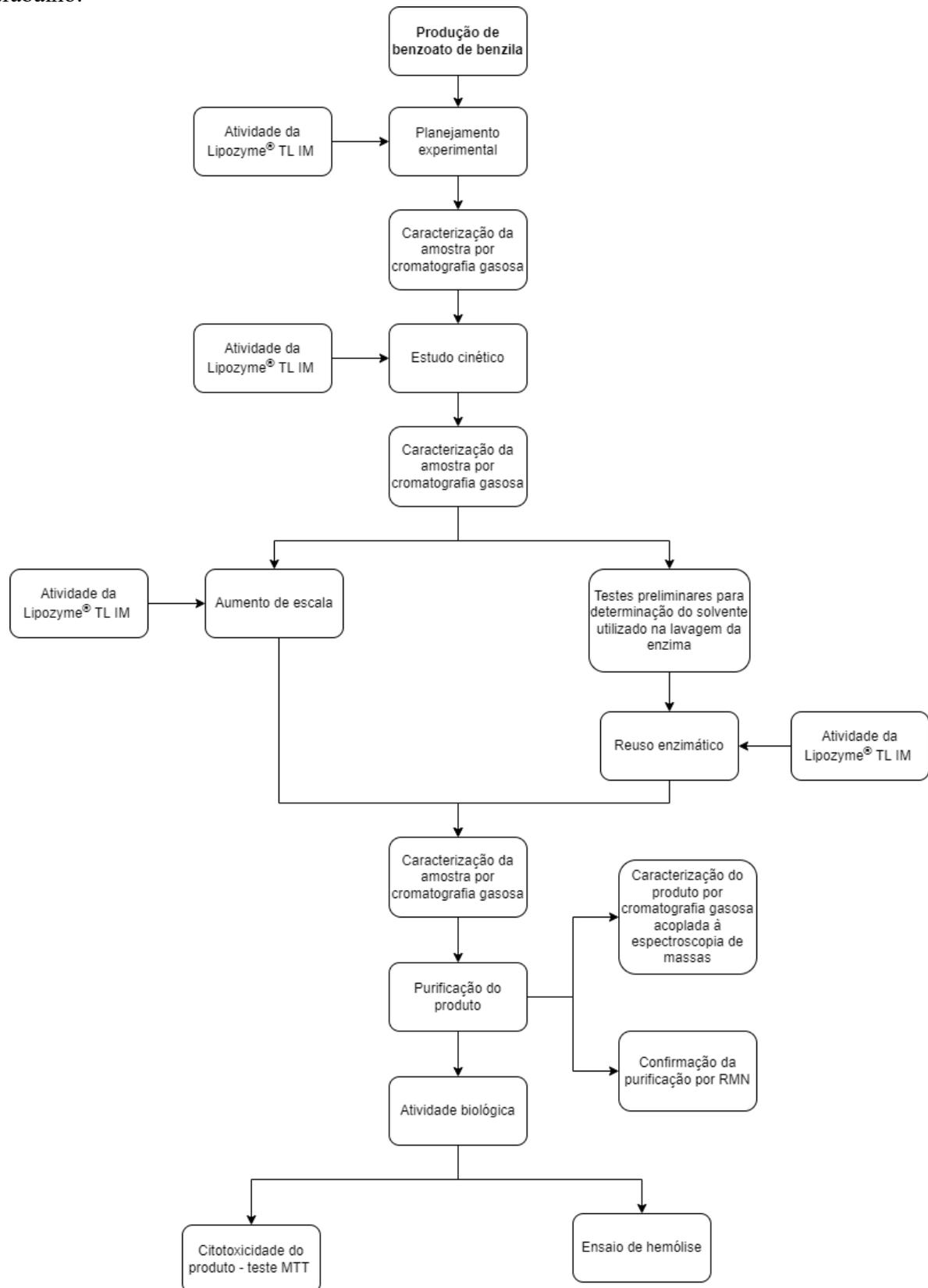
Os equipamentos utilizados nesta pesquisa foram:

- Cromatógrafo gasoso (Shimadzu, modelo GC-2010 AF), equipado com um detector por ionização de chama (FID);
- Cromatógrafo gasoso (Agilent GC 7890A) acoplado à espectroscopia de massas (MS Agilent 5975C);
- Espectrometria de ressonância magnética nuclear (Bruker Ascend);
- Balança analítica (Marte, modelos AY220 e AL 500C);
- Agitador magnético (IKA);
- Banho termocriostático (Microquímica equipamentos Ltda, modelo MQBTC);
- Centrífuga MiniSpin (Eppendorf);
- Vortex mixer (ION, modelo XH-C);
- Phmetro digital (86505 AZ);
- Banho termostático com agitação (Dubnoff technical);
- Centrífuga (Centribio, modelo 80-2B);
- Estufa com circulação de ar (Marconi, MA 035);
- Agitador magnético com aquecimento (Ika, C-MAG HS 7);
- Bomba à vácuo (Fisatom, 820);
- Leitor de microplacas (Infanite 200 TECAN).

3.2 MÉTODOS

Nesta seção, serão detalhados os métodos utilizados para a realização da presente pesquisa. A Figura 13 ilustra o fluxograma esquemático dos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.

Figura 13 – Fluxograma esquemático dos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.



Fonte: Autor, 2022.

3.2.1 Atividade da Lipozyme® TL IM imobilizada

Com a finalidade de determinar a atividade de esterificação da Lipozyme® TL IM (U/g), foram utilizados ácido láurico e propanol (razão molar de 1:1) como substratos. No início da reação, amostras de 150 µL foram retiradas, em triplicata, e transferidas para 20 mL de uma solução de acetona e etanol (razão molar de 1:1). Após, a Lipozyme® TL IM (5% em peso em relação aos substratos) foi adicionada na solução de ácido láurico com propanol, e permaneceu a 60 °C por 40 min. Ao fim deste tempo, alíquotas de 150 µL (em triplicata) foram retiradas e transferidas para uma solução de 20 mL de acetona e etanol (1:1). Essas amostras foram tituladas com uma solução de NaOH 0,01 N até chegar em um pH de 11. A atividade enzimática foi medida através do consumo de ácido láurico, que foi determinado através dessa titulação, sendo uma unidade de atividade (U) estabelecida como a quantidade de enzima necessária para transformar 1 µmol de ácido láurico por minuto (BALEN, 2016; CENI *et al.*, 2010; MENESES, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Para calcular a normalidade padronizada da solução de NaOH (0,01 N), dissolveu-se 0,1 g de biftalato de potássio em 50 mL de água destilada, e foi adicionado 3 gotas de fenolftaleína. Esta mistura foi titulada com a solução previamente preparada de NaOH (0,01 N) até o ponto de viragem da fenolftaleína. O volume gasto de NaOH foi utilizado na seguinte equação (1) (BALEN, 2016; CENI *et al.*, 2010; MENESES, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2006):

$$N_{NaOH} = \frac{1000 \times m_{biftalato}}{204,22 \times V_{NaOH}} \quad (1)$$

Sendo:

N NaOH: Normalidade padronizada da solução de NaOH;

$m_{biftalato}$: massa de biftalato de potássio;

V NaOH: Volume de NaOH gasto na titulação.

O cálculo da atividade enzimática foi realizado conforme a equação 2.

$$\frac{U}{g} = \frac{(V_{NaOH} t_0 - V_{NaOH} t_{40}) \times N_{NaOH} \times 10^3}{t \times m_{enzima}} \quad (2)$$

Sendo:

V NaOH t_0 : Volume de NaOH utilizado na titulação do branco (no tempo igual a zero);

V NaOH t_{40} : Volume de NaOH gasto para titular o meio reacional após 40 min de reação;

N NaOH: Normalidade padronizada da solução de NaOH;

t: tempo total de reação (40 min);

m_{enzima} : massa real de enzima.

3.2.2 Maximização do processo de produção do benzoato de benzila

A fim de investigar os efeitos das condições da reação e buscar a melhor combinação dessas para atingir a maior conversão de benzoato de benzila, foi realizado um planejamento experimental DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) 2^3 com triplicata do ponto central, sendo 11 experimentos no total, utilizando a Lipozyme[®] TL IM.

Os experimentos foram executados em um balão de fundo redondo de 50 mL, com uma massa total de reagentes de 5,5 g (valor fixo para todos os experimentos), colocado em um banho termostático com agitação, em condições de tempo e agitação constantes de 8 horas e 105 ± 5 rpm, respectivamente, variando a temperatura (40, 50 e 60 °C); razão molar anidrido benzoico:álcool benzílico (1:3, 1:6 e 1:9) e concentração enzimática (4, 6 e 8% (m/m)). Essas condições foram baseadas no trabalho realizado por Meneses (2019).

Após o tempo determinado para ocorrer a reação (8 h), uma alíquota de 2 mL da reação foi centrifugada (13.300 rpm por 5 min). Em seguida, transferiu-se o sobrenadante (1 mL) para um Eppendorf para então ser armazenado e, posteriormente, ser realizada a caracterização das amostras (item 3.2.5).

O planejamento experimental está apresentado na Tabela 3, que mostra as variáveis e os níveis estudados, no qual os dados foram obtidos pelo *software Statistica* (versão 7.0). Na análise estatística do resultado foi considerada um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental na síntese de benzoato de benzila.

Níveis	Temperatura (°C)	Concentração enzimática (%)	Razão molar*
-1	40	4	1:3
0	50	6	1:6
1	60	8	1:9

* anidrido benzoico:álcool benzílico

Fonte: Autor, 2021.

3.2.3 Cinética e aumento de escala da síntese de benzoato de benzila

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental, a condição que conduziu à maior conversão de benzoato de benzila foi avaliada na cinética reacional: 60 °C, razão molar de 1:3 (anidrido benzoico:álcool benzílico) e concentração enzimática de 8% (m/m). Os seguintes tempos foram adotados para a avaliação da cinética: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas. Alíquotas foram retiradas nesses tempos, centrifugadas (13.300 rpm por 5 min), e o sobrenadante diluído em diclorometano e analisado em cromatógrafo gasoso (como descrito no item 3.2.5). A cinética foi realizada em duplicata.

Definido o tempo que se obteve maior conversão em éster, foi realizado o aumento de escala laboratorial com as mesmas condições da cinética, ampliando em 20 vezes a quantidade dos substratos (de 5,5 para 110 g). Este teste foi realizado em duplicata. Também foi conduzido um ensaio alterando a rotação de 105 ± 5 para 200 ± 5 rpm, a fim de verificar efeito na transferência de massa reacional.

3.2.4 Estabilidade da Lipozyme® TL IM imobilizada

3.2.4.1 Testes para a escolha do solvente utilizado na lavagem da enzima

Uma alternativa para diminuir o custo do processo quando se utiliza um biocatalisador é recuperá-lo, lavá-lo e reutilizá-lo. Na lavagem são utilizados solventes, e para a escolha desses solventes é necessário avaliar a capacidade de remoção dos compostos que podem estar adsorvidos no suporte da enzima, bem como, a manutenção da atividade do biocatalisador.

Neste caso, os substratos que podem estar no suporte da enzima, interferindo assim em sua atividade, são o ácido benzoico (produto da reação) e o anidrido benzoico (reagente). Por esta razão, foi realizado um teste de solubilidade visando a remoção desses interferentes.

O ensaio foi feito em Eppendorf, em que cada substrato foi pesado (0,2 g) individualmente. Na sequência, a cada substrato foi adicionado 1 mL de solvente, e estas misturas foram submetidas a agitação no vórtex por 1 minuto. Os solventes testados foram: acetona, hexano, acetonitrila, acetato de etila, iso-octano, pentano, álcool amílico, álcool isopropílico, álcool-n-propílico, álcool butílico, álcool etílico e uma mistura de acetato de etila com hexano (1:1 e 4:1).

Em seguida, os solventes que solubilizaram o ácido benzoico e o anidrido benzoico foram testados junto com a enzima para garantir que não houvesse perda de atividade enzimática. Foi pesado 0,4 g de enzima para 25 mL de solvente e esta mistura foi mantida sob agitação (200 rpm) por 5 minutos. Após isso, a enzima permaneceu em estufa a 40 °C por 24

horas para a remoção do solvente. Por fim, a atividade enzimática foi medida conforme o item 3.2.2.

3.2.4.2 *Reuso da enzima*

Para o estudo do reuso do catalisador optou-se pelo tempo de reação que conduziu à maior conversão no estudo cinético, ou seja, 24 horas. Os ensaios foram realizados em um banho termostático com agitação com as seguintes condições: batelada, temperatura de 60 °C, razão molar de 1:3 (anidrido benzoico:álcool benzílico), Lipozyme® TL IM (8% m/m), com uma rotação de 105 ± 5 rpm.

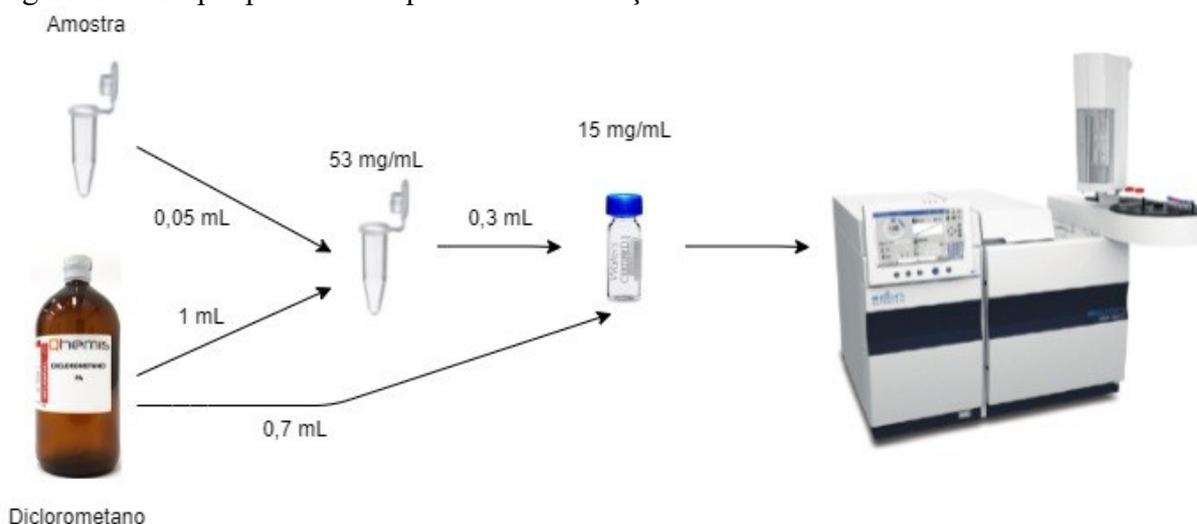
O biocatalisador foi recuperado e lavado com o solvente que ocasionou menor perda de atividade enzimática (acetato de etila) a fim de remover qualquer material adsorvido na superfície do catalisador. Este procedimento foi realizado da seguinte maneira: foi adicionado junto à enzima 50 mL de solvente e agitou-se levemente o sistema por 2 minutos. Posteriormente, realizou-se a filtração a vácuo e, em seguida, o biocatalisador foi colocado em uma estufa a 40 °C por 24 horas.

O teste do reuso enzimático foi feito em duplicata e totalizou três ciclos para cada amostra. Além disso, antes de cada reuso e após o terceiro ciclo, a atividade enzimática foi avaliada. A caracterização das amostras foi determinada através da análise em cromatografia gasosa, como está descrito na seção 3.2.5.

3.2.5 Caracterização das amostras

Como apresentado na Figura 14, após descongelamento e homogeneização da amostra em um vórtex por 10 segundos, uma alíquota de 0,05 mL foi diluída em 1 mL de diclorometano. Posteriormente, esta diluição contendo a alíquota foi homogeneizada no vórtex (por 10 segundos), sendo transferida 0,3 mL desta solução para um vial e diluída em 0,7 mL de diclorometano. Por fim, realizou-se a caracterização da amostra em um cromatógrafo gasoso.

Figura 14 – Etapas precedentes para a caracterização das amostras.



Fonte: Autor, 2021.

O cromatógrafo gasoso utilizado foi o da Shimadzu, modelo GC-2010 AF, equipado com um detector por ionização de chama (FID) e um injetor automático (Shimadzu AOC 5000), sendo o injetor e o detector mantidos a uma temperatura de 250 °C. A coluna empregada foi a DB-5 (27 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura), com a rampa de temperatura programada da seguinte maneira: 100 °C (2 min), 100-135 °C (3 °C/min), 135-250 °C (10 °C/min) e 250 °C (15 min) a fim de garantir a separação dos componentes. Para a injeção da amostra foi condicionado uma razão molar de 1:100, com um volume de injeção de 1 µL e o nitrogênio como gás de arraste (N₂, 56 K Pa).

O cálculo realizado para determinar a conversão foi baseado na curva de calibração previamente feita com o benzoato de benzila puro ($R^2 = 0,99$). Esta quantificação foi encontrada através da área do pico correspondente a este composto.

3.2.6 Purificação do benzoato de benzila

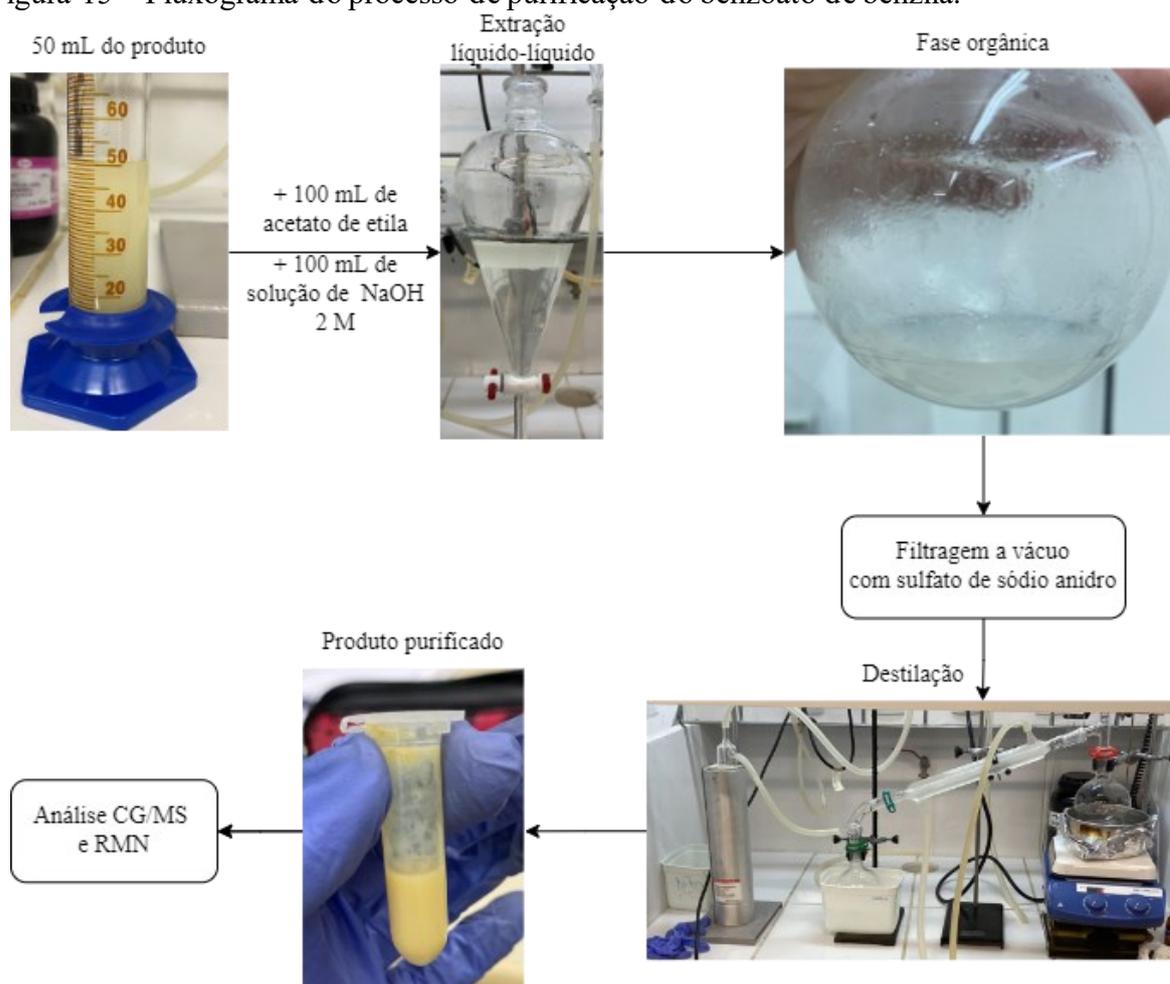
O produto da reação entre álcool benzílico e anidrido benzoico foi submetido a algumas etapas de purificação (Figura 15) seguindo a metodologia de Meneses (2019) com modificações. Primeiramente, realizou-se uma extração líquido-líquido. Foi adicionado em um funil de separação 50 mL da amostra de interesse, 100 mL de acetato de etila e 100 mL de hidróxido de sódio 2 N (aproximadamente 45 °C). Agitou-se por mais ou menos 3 minutos e deixou em repouso até estabilizar. Após, descartou-se a fase aquosa (pH 6) e a fase orgânica, que continha o produto de interesse, permaneceu no funil. Repetiu-se mais três vezes a lavagem

com hidróxido de sódio (2 N, em torno de 45 °C), chegando a um pH igual a 14, a fim de garantir a retirada do ácido benzoico da fase orgânica. Posteriormente, a fase orgânica foi filtrada a vácuo com sulfato de sódio anidro para remover a água restante.

Em seguida, realizou-se a destilação a vácuo para a retirada dos componentes indesejáveis, como o álcool benzílico (reagente em excesso da síntese do benzoato de benzila) e o acetato de etila (componente utilizado na extração líquido-líquido). A destilação a vácuo foi realizada por 3 horas até a temperatura de 205 °C.

Uma amostra do produto purificado (0,2 mL) foi solubilizada em 1 mL de diclorometano e colocada no cromatógrafo gasoso acoplado à espectroscopia de massas (CG/MS) para analisar indiretamente a purificação do produto. Posteriormente, foi realizada a análise de ressonância magnética nuclear (RMN) com a finalidade de comprovar a pureza do benzoato de benzila (0,025 g do produto + 0,5 mL de clorofórmio deuterado).

Figura 15 – Fluxograma do processo de purificação do benzoato de benzila.



Fonte: Autor, 2022.

Ademais, calculou-se o rendimento do benzoato de benzila purificado através da seguinte fórmula (equação 3):

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Rendimento real}}{\text{Rendimento teórico}} * 100 \% \quad (3)$$

O rendimento real é a massa do produto obtida após a purificação e o rendimento teórico é a maior massa de éster que pode ser formada a partir do reagente limitante, que neste caso é o anidrido benzoico.

3.2.6.1 Caracterização do benzoato de benzila por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG/MS)

A análise da pureza do benzoato de benzila foi realizada no equipamento Agilent GC 7890A acoplado ao detector MS Agilent 5975C. A coluna utilizada foi a HP-5MS (Agilent), uma coluna capilar de sílica fundida (30 m de comprimento x 250 µm i.d. x 0,25 µm de espessura de filme composta por 5% de fenil-95% de metilpolissiloxano). Esta coluna foi conectada a um detector quadrupolo operando em EI (Electron Impact Ionization) a 70 eV e a varredura de massa oscilou de 41 a 415 m/z. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com uma vazão de 1,2 mL/min. O injetor e o detector foram mantidos em uma temperatura de 250 °C e para a injeção da amostra uma razão molar de 1:100 foi aplicada. O amostrador automático (Agilent GC Sampler 80) equipado com uma seringa de 10 µL injetou um volume de 0,3 µL. A rampa de temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 100 °C (por 2 min) e, em seguida, houve um aumento de 100 °C (3 °C/min) para 230 °C (por 10 min), obtendo um tempo total de corrida de 25 min.

Os compostos obtidos foram identificados através da comparação dos seus espectros de massa com os do *National Institute of Standards and Technology* (NIST, 2011). O índice de retenção linear foi obtido pelo cálculo dos tempos de retenção de n-alcenos que foram injetados com as mesmas condições cromatográficas (equação 4) (ADAMS, 2017; BIZZO *et al.*, 2020).

$$IRL = 100 * n * \frac{(t_{Rb} - t_{RC_n})}{(t_{RC_{n+1}} - t_{RC_n})} \quad (4)$$

Em que t_{Rb} é o tempo de retenção do benzoato de benzila; t_{RC_n} é o tempo de retenção do padrão (n-alcenos) que elui antes do benzoato de benzila; $t_{RC_{n+1}}$ é o tempo de retenção do

padrão que elui após o benzoato de benzila e n é a quantidade de átomos de carbono do padrão que elui antes do benzoato de benzila.

3.2.6.2 *Caracterização do benzoato de benzila por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)*

A estrutura do benzoato de benzila purificado foi confirmada pela análise de espectrometria de ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹H), com o equipamento Bruker Ascend a 200 MHz. O produto foi dissolvido em clorofórmio deuterado (CDCl₃), e os deslocamentos químicos (δ), expressos em partes por milhão (ppm), foram calculados em relação ao tetrametilsilano (TMS). O *software* utilizado para analisar o espectro obtido foi *MestReNova*.

3.2.7 **Avaliação da atividade biológica do benzoato de benzila purificado**

Nesta seção serão apresentadas as atividades biológicas analisadas do produto purificado da acilação enzimática. Foi realizado o teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio)) para avaliar a viabilidade celular (citotoxicidade) do benzoato de benzila utilizando a linhagem celular de fibroblastos (NIH3T3) murino. O teste MTT é um método colorimétrico que avalia o dano causado pelo composto ao metabolismo celular. Esta análise quantifica, de forma indireta, as células viáveis através da redução do MTT (sal hidrofílico de coloração amarela) a formazan (sal hidrofóbico de coloração roxa) por meio da atividade da desidrogenase mitocondrial presente somente em células metabolicamente ativas. (KUMAR *et al.*, 2018).

Posteriormente, realizou-se o teste de hemólise, em que foi avaliado se o benzoato de benzila obtido provocaria uma ruptura na membrana de eritrócitos humanos (doados por três voluntários saudáveis), causando assim, sua hemólise. Todos os ensaios foram feitos no laboratório de fisiopatologia (Unesc, Criciúma).

3.2.7.1 *Viabilidade celular (citotoxicidade) do benzoato de benzila*

Inicialmente, as células de fibroblastos (NIH3T3) foram cultivadas em 7 mL de meio Dulbecco's Eagle Modificado (DMEM), com a adição de 10% de soro bovino fetal, estreptomicina (100 mg/mL), penicilina (100 U/mL) e 4 mM/L de glutamina a 37 °C, acondicionadas em garrafas de cultura celular (25 mL) e mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ até atingirem 70-90% de confluência. Após, foi realizada a tripsinização, para isso a

concentração de células foi ajustada para 10^4 células/mL de DMEM, e realizado plaqueamento (100 μ L) em uma placa de cultura de fundo plano com 96 poços (250 μ L).

Posteriormente, essas células foram incubadas - em triplicata - com 100 μ L de benzoato de benzila (nas concentrações de 1, 2, 5 e 10%, diluídos em DMEM) durante 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, junto com o controle (células de fibroblastos ressuspensas em 100 μ L de DMEM). Passado o tempo de incubação, foi realizado o teste de viabilidade celular por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio)). Para tanto, o meio de cultura foi retirado da placa, e em cada poço adicionou-se 100 μ L da solução de MTT (0,5 mg/mL em PBS). Em seguida, para ocorrer a formação de formazan, a placa foi incubada novamente em uma estufa por três horas (37 °C e 5% de CO₂). Ao fim deste período, o meio (contendo a solução de MTT) foi retirado e os cristais de formazan formados na placa foram dissolvidos em 100 μ L de álcool isopropílico. Um leitor de microplacas foi utilizado para medir a absorbância em 570 nm. Os valores dos resultados possuem como unidade de medida o percentual de sobrevivência (100%) (KUMAR *et al.*, 2018). Além disso, foi realizado a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para a comparação entre os resultados obtidos (células junto com benzoato de benzila) com o controle, com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

3.2.7.2 *Ensaio de hemólise*

Primordialmente, o sangue foi centrifugado três vezes (3 mL) a 1.500 rpm por 30 min com a finalidade de separar os eritrócitos do restante do plasma. Ao final, o sobrenadante foi descartado e 50 μ L dos eritrócitos foram ressuspensos em 950 μ L solução salina (0,9% NaCl).

Posteriormente, o composto selecionado para este ensaio (benzoato de benzila), foi incubado - por 1 h a 37 °C sob agitação contínua de 100 rpm - em diferentes concentrações (1 e 5% em relação ao volume total, ou seja, 1000 μ L). Transcorrido esse tempo (1 h), centrifugou-se a solução por 5 min a 10.000 rpm e, após, 100 μ L de sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços.

A técnica de espectrofotometria foi utilizada para medir a atividade hemolítica, utilizando o leitor de microplacas e a absorbância medida em 540 nm. Para a realização deste cálculo, utilizou-se como controle positivo (100% de hemólise) a água destilada e como controle negativo (0% de hemólise) solução salina. O experimento foi realizado em triplicata, e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de hemólise, calculados a partir da equação (5) (GUINDANI *et al.*, 2020):

$$\text{Taxa de hemólise (\%)} = \frac{D_t - D_{nc}}{D_{pc} - D_{nc}} * 100 \quad (5)$$

Em que:

D_t : absorvância da amostra teste;

D_{nc} : absorvância do controle negativo;

D_{pc} : absorvância do controle positivo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados alcançados neste trabalho relacionados à acilação enzimática do benzoato de benzila, bem como, atividade enzimática da Lipozyme® TL IM, maximização do processo de produção, estudo cinético, aumento de escala, reuso enzimático, purificação do produto e atividade biológica do éster.

4.1 MAXIMIZAÇÃO DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DO BENZOATO DE BENZILA

Visando avaliar a influência de três variáveis (temperatura, razão molar e concentração de enzima) na síntese do benzoato de benzila utilizando a Lipozyme® TL IM (atividade de esterificação inicial de $50,2 \pm 1,6$ U/g), um planejamento experimental 2^3 foi realizado. A Tabela 4 mostra a matriz do planejamento e os dados obtidos da conversão em benzoato de benzila em 8 horas de reação.

Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental com os valores codificados e reais e respostas em termos de conversão em benzoato de benzila utilizando Lipozyme® TL IM como biocatalisador depois de 8 horas de reação.

Exp.	Temperatura (°C)	Concentração enzimática (% m/m)	Razão molar ^a	Conversão experimental (%)	Conversão predita (%)	DPR ^b (%)
1	40 (-1)	4 (-1)	1:3 (-1)	33,8	32,2	4,9
2	60 (1)	4 (-1)	1:3 (-1)	49,4	51,2	-3,6
3	40 (-1)	8 (1)	1:3 (-1)	52,6	54,4	-3,4
4	60 (1)	8 (1)	1:3 (-1)	75,0	73,4	2,1
5	40 (-1)	4 (-1)	1:9 (1)	55,8	57,7	-3,3
6	60 (1)	4 (-1)	1:9 (1)	63,9	62,3	2,6
7	40 (-1)	8 (1)	1:9 (1)	72,0	70,4	2,3
8	60 (1)	8 (1)	1:9 (1)	73,1	75,0	-2,5
9	50 (0)	6 (0)	1:6 (0)	58,1	59,6	-2,5
10	50 (0)	6 (0)	1:6 (0)	60,6	59,6	1,7
11	50 (0)	6 (0)	1:6 (0)	61,1	59,6	2,6

^a anidrido benzoico:álcool benzílico

^b desvio padrão relativo

Fonte: Autor, 2022.

Analisando a Tabela 4 é possível observar que o ensaio 4 apresentou maior conversão em éster (75%), correspondendo a uma temperatura de 60°C, 8% de enzima e razão molar de 1:3. Os dados da Tabela 4 foram analisados estatisticamente com o auxílio do *software Statistica* e do *Protimiza Experimental Design*. A Tabela 5 demonstra a análise de variância (ANOVA) gerada, no qual apresentou um coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,9794 e um F calculado (47,51) maior que o F tabelado (5,05), validando estatisticamente o modelo.

Tabela 5 – ANOVA para validação do modelo que descreve a síntese de benzoato de benzila utilizando Lipozyme[®] TL IM como catalisador.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	P
Regressão	1400,74	5	280,16	47,51	0,0003
Resíduos	29,49	5	5,90		
Falta de Ajuste	24,32	3	8,11	3,14	0,2510
Erro Puro	5,17	2	2,58		
Total	1430,28	10			

$$R^2 = 0,9794; F_{\text{tabelado}}(0,95;5;5) = 5,05$$

Fonte: Autor, 2022.

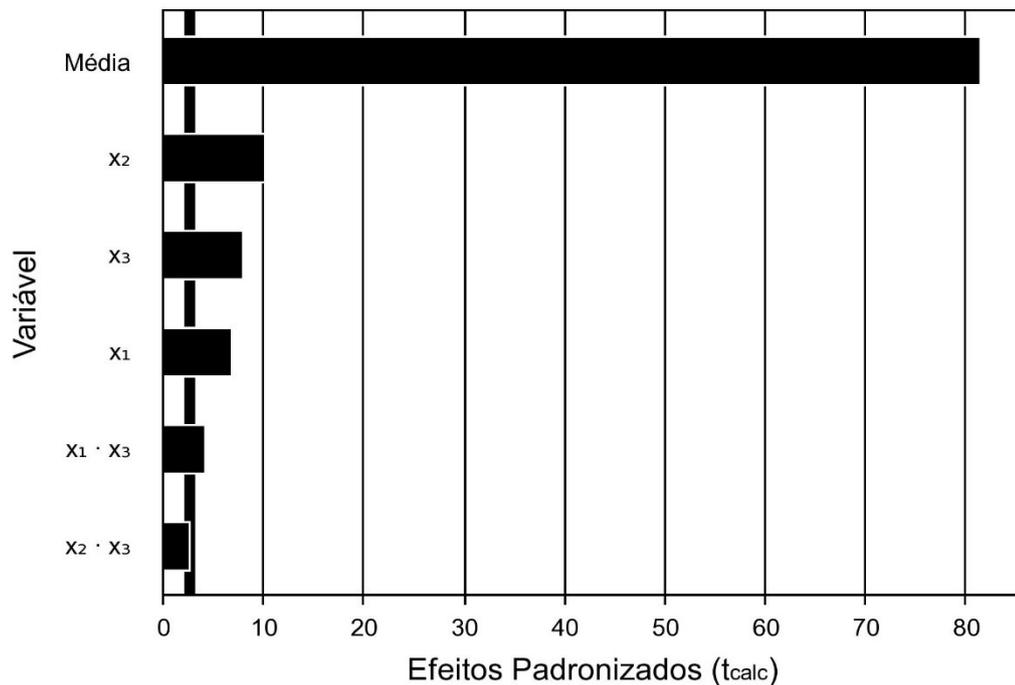
A Equação 6 representa o modelo gerado, em que: Y_1 é a conversão em benzoato de benzila (%); x_1 é a temperatura (°C); x_2 é a concentração enzimática (% m/m) e x_3 é a razão molar (anidrido benzoico:álcool benzílico).

$$Y_1 = 59,58 + 5,90x_1 + 8,73x_2 + 6,75x_3 - 3,60x_1x_3 - 2,38x_2x_3 \quad (6)$$

Através da equação pode-se observar que a temperatura (x_1), a concentração enzimática (x_2) e a razão molar (x_3) tiveram efeito significativo positivo na conversão. Já a interação entre temperatura e razão molar ($x_1.x_3$), como também, a concentração enzimática e a razão molar ($x_2.x_3$) apresentaram efeito significativo negativo na conversão em benzoato de benzila. Ou seja, altas conversões de benzoato de benzila parecem ser atingidas em maiores valores de temperatura, concentração enzimática e excesso de álcool benzílico, como pode ser visto no ensaio 8 (73,1% de benzoato de benzila em 60°C, 8% de enzima e 1:9 de álcool benzílico).

Esse comportamento pode ser também observado no diagrama de Pareto, que permite a visualização dos efeitos mais importantes. Analisando o gráfico de Pareto (Figura 16), percebe-se que o parâmetro mais significativo foi a concentração enzimática (x_2), seguida da razão molar (x_3), temperatura (x_1) e da interação entre a temperatura com a razão molar ($x_1 \cdot x_3$) e concentração enzimática com a razão molar ($x_2 \cdot x_3$).

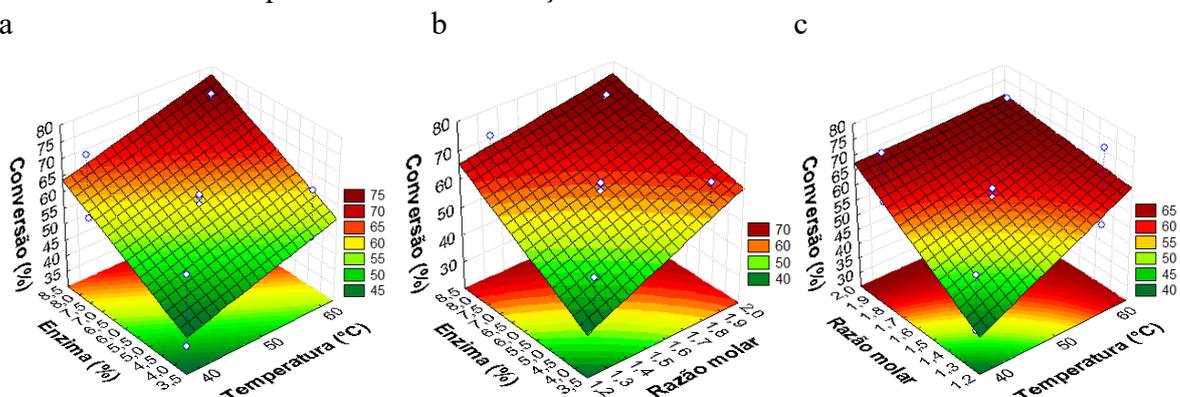
Figura 16 – Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis – temperatura (x_1), concentração enzimática (x_2) e razão molar (x_3) – na síntese de benzoato de benzila em batelada utilizando Lipozyme[®] TL IM como biocatalisador depois de 8 horas de reação.



Fonte: Autor, 2022.

Posteriormente, foi avaliada a superfície de resposta (Figura 17) das interações entre concentração de enzima e temperatura, razão molar e concentração enzimática, e razão molar e temperatura.

Figura 17 – Superfície de resposta da (a) temperatura em função da concentração de enzima, (b) concentração da enzima em função da razão enzimática* e da (c) temperatura em função da razão molar* para síntese de benzoato de benzila em batelada utilizando Lipozyme® TL IM como biocatalisador depois de 8 horas de reação.



* anidrido benzoico:álcool benzílico

Fonte: Autor, 2022.

Analisando a Figura 17 (a) pode-se observar que a conversão em benzoato de benzila ocorre quando há aumento simultâneo da temperatura e da concentração enzimática. Este comportamento também é visto na Figura 17 (b), que mostra a interação entre concentração enzimática e razão molar (anidrido benzoico:álcool benzílico). Porém, observando a razão molar onde se tem uma menor quantidade de álcool (1:3) e maior concentração de enzima (8%), percebe-se que este já obtém resultados de conversão satisfatórios, em torno de 65%.

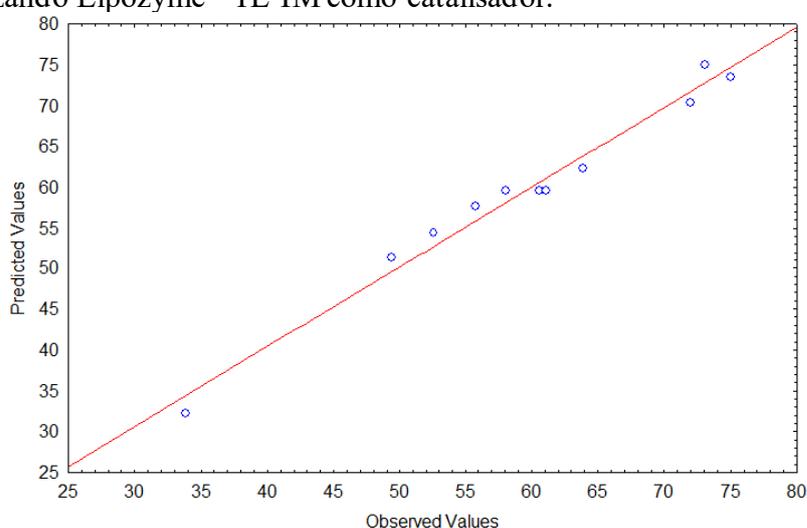
Em contrapartida, a Figura 17 (c) mostra que além de ter uma maior conversão em benzoato de benzila em maiores temperaturas e maior quantidade de álcool benzílico, quando um desses termos está em seu valor máximo (das condições testadas), o outro fator pode ter valores mais baixos, conseguindo alcançar maiores conversões.

Shiki (2018) também estudou a síntese enzimática do benzoato de benzila, porém, na presença do solvente terc-butanol e com as enzimas Novozym® 435 e Lipozyme® RM IM. As condições fixadas para a realização do planejamento experimental foram: 24 horas de reação, agitação de 150 rpm e concentração de enzima 10% (m/m). Tal estudo, na condição maximizada, utilizando a Novozym® 435 conduziu a uma conversão de 32,1% (60 °C e razão molar entre álcool benzílico:anidrido benzoico de 1:5), e com a Lipozyme® RM IM atingiu um valor de 51% (40 °C e razão molar de 1:5), sendo essas conversões menores em relação ao presente estudo. Através das superfícies de resposta, Shiki (2018) concluiu que o aumento de temperatura não causou nenhum efeito na conversão. Todavia, com o aumento da razão molar

(álcool benzílico:anidrido benzoico), ou seja, ampliando a quantidade de anidrido benzoico, elevou-se a conversão em benzoato de benzila.

Por fim, a Figura 18 relaciona os valores experimentais com os preditos, mostrando que há uma pequena dispersão entre eles, pois os valores estão próximos da reta ($y = x$), comprovando a boa capacidade preditiva do modelo. Assim, a condição escolhida para a realização das próximas etapas foi a com temperatura de 60 °C, concentração enzimática de 8% e razão molar 1:3 (anidrido benzoico:álcool benzílico).

Figura 18 – Valores experimentais versus valores preditos na síntese em batelada de benzoato de benzila utilizando Lipozyme® TL IM como catalisador.

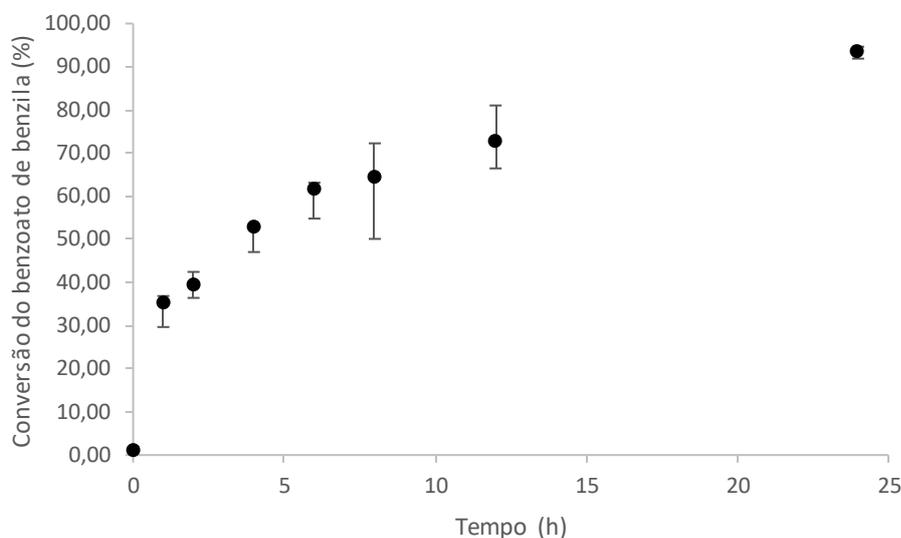


Fonte: Autor, 2022.

4.2 AVALIAÇÃO CINÉTICA DA REAÇÃO

Após maximização das condições experimentais da síntese de benzoato de benzila, foi avaliada a cinética na melhor condição experimental, 60 °C, concentração de enzima de 8% (m/m) e razão molar de 1:3 (anidrido benzoico:álcool benzílico). A atividade enzimática inicial foi medida, $50,2 \pm 1,6$ U/g. Este experimento foi realizado em duplicata em um banho termostático com agitação, e os resultados estão representados na Figura 19.

Figura 19 – Cinética da síntese de benzoato de benzila com Lipozyme[®] TL IM em uma temperatura de 60 °C, concentração de enzima de 8% (m/m), razão molar de 1:3 (anidrido benzoico:álcool benzílico) e agitação de 105 ± 5 rpm.



Fonte: Autor, 2022.

A cinética mostrou que a maior conversão foi atingida em 24 horas, apresentando um resultado de $93,3 \pm 1,4\%$, valor superior ao encontrado por Jasper (2018), que investigou a cinética na produção deste mesmo éster utilizando a Lipozyme[®] TL IM nas seguintes condições: razão molar de 1:9 (anidrido benzoico: álcool benzílico), batelada, 10% (m/m) de biocatalisador e variando a temperatura (50, 60 e 70 °C). Jasper (2018) constatou que a melhor conversão foi atingida em 24 h, atingindo um valor de 77% para a temperatura de 70 °C, 83% em 60 °C e 75% a 50 °C.

Meneses (2019) também alcançou uma conversão em benzoato de benzila semelhante a esta pesquisa (92%), porém, em 6 h de reação (na ausência de solventes). No entanto, o estudo de Meneses (2019) utilizou uma metodologia que difere deste trabalho nos seguintes pontos: 10% (m/m) de Lipozyme[®] TL IM, 50 °C e razão molar de 1:6 (anidrido benzoico: álcool benzílico). Tal estudo não realizou a maximização da produção deste éster. Outro assunto relevante abordado por este autor foi a dificuldade de solubilizar os substratos presentes na síntese do benzoato de benzila, o anidrido benzoico e o ácido benzoico, sendo necessário um estudo de solubilidade destes compostos. Esta solubilidade é necessária pois, para a realização da lavagem da enzima em um processo de reuso, é necessário retirar todos os substratos que possam estar presentes na superfície da enzima.

Shiki (2018) produziu o benzoato de benzila na presença de solvente orgânico (terc-butanol) e, quando utilizou como biocatalisador a Novozym[®] 425, resultou em um melhor tempo reacional de 24 h (16,6%). Já com a Lipozyme[®] RM IM a maior conversão foi em 12 h (30,3%). Isto posto, definiu-se o tempo reacional em 24 horas com as condições já previamente estabelecidas no planejamento experimental (60 °C, concentração enzimática de 8% e razão molar 1:3) para ser estudado o reuso enzimático.

4.3 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA

4.3.1 Testes para a escolha do solvente utilizado na lavagem da enzima

Com a finalidade de encontrar um solvente que possua uma maior eficiência na lavagem da enzima a fim de utilizá-la novamente, reduzindo o custo do processo, foi testada a solubilidade dos compostos sólidos – o anidrido benzoico (reagente) e o ácido benzoico (subproduto) – presentes no processo de obtenção do benzoato de benzila. Conforme já verificado por Meneses (2019), esses substratos sólidos são de difícil solubilização em solventes orgânicos convencionais como ciclohexano, heptano, octano, isooctano e pentano. O Quadro 1 mostra o resultado deste teste de solubilidade.

Quadro 1 – Teste de solubilidade do anidrido benzoico e ácido benzoico em 1 minuto de agitação no vórtex.

Solventes	Anidrido benzoico	Ácido benzoico	Coefficiente de partição n-octanol/água *
Acetona	Solúvel	Solúvel	-0,24
Hexano	Insolúvel	Insolúvel	3,90
Acetonitrila	Solúvel	Insolúvel	-0,55
Acetato de etila	Solúvel	Solúvel	0,73
Iso-octano	Insolúvel	Insolúvel	4,6
Pentano	Insolúvel	Insolúvel	3,45
Álcool amílico	Insolúvel	Solubilizou parcialmente	1,51
Álcool isopropílico	Solúvel	Solúvel	0,14
Álcool-n-propílico	Solúvel	Solúvel	0,25 – 0,34
Álcool butílico	Solúvel	Solúvel	0,80
Álcool etílico	Solúvel	Solúvel	-0,24
Acetato de etila + Hexano (1:1)	Insolúvel	Insolúvel	-
Acetato de etila + Hexano (4:1)	Solúvel	Solúvel	-

*Dados obtidos a partir das fichas técnicas dos solventes.

Fonte: Autor, 2022.

O coeficiente de partição (log P) demonstra a hidrofobicidade e a tendência de partição de determinado composto de um meio aquoso para um orgânico, refletindo as interações entre o soluto e a água (MACKAY *et al.*, 1997). Quanto menor este coeficiente, mais hidrofílico é o composto (CHEN, 1996). A partir do Quadro 1 observa-se que um menor valor de coeficiente de partição n-octanol/água dos solventes mostrou maior solubilidade do anidrido benzoico e álcool benzílico, ou seja, um solvente mais hidrofílico solubiliza mais os produtos presentes nesta reação.

Posteriormente, os solventes que solubilizaram visualmente ambos os substratos foram testados junto com a Lipozyme[®] TL IM para conferir se afetava a atividade enzimática da mesma, conforme apresentado na Tabela 6. Contudo, observa-se através dos resultados obtidos que alguns dos solventes testados afetaram a atividade da Lipozyme[®] TL IM, isto pode ser devido ao fato dos solventes interferirem no suporte da lipase ou na sua estrutura.

Tabela 6 – Atividade enzimática da Lipozyme[®] TL IM sem/com contato com solvente e sua porcentagem de perda em comparação a enzima sem contato com solvente.

Condições	Atividade enzimática (U/g)	Atividade residual (%) [*]
Lipozyme TL IM	17,5 ± 2,3	100
Acetona	18,3 ± 7,7	100
Acetato de etila	23,3 ± 1,9	100
Álcool isopropílico	2,4 ± 0,3	13,6
Álcool-n-propílico	6,3 ± 0,9	35,7
Álcool butílico	8,5 ± 2,0	48,6
Álcool etílico	9,3 ± 3,3	52,9
Acetato de etila + Hexano (4:1)	6,3 ± 0,5	36,1

* Atividade enzimática residual (%) = $(U_{\text{final}}/U_{\text{inicial}}) * 100$. Em que U_{final} é a atividade da enzima após o contato com o solvente e U_{inicial} é a atividade da Lipozyme[®] TL IM.

Fonte: Autor, 2022.

Queiroz *et al.* (2015) testaram a Lipozyme[®] TL IM em contato por 2 horas a 50 °C com etanol, n-butanol e n-hexano. Dentre os solventes, o que mostrou uma alteração significativa na estrutura da enzima foi o etanol que, por ser hidrofílico, degradou o suporte da lipase. Já o que menos afetou a capacidade catalítica foi o n-hexano, que é um solvente mais hidrofóbico. Portanto, o uso de solvente hidrofílico pode desnaturar o biocatalisador através da retirada da água presente na superfície da enzima, além de romper as ligações de hidrogênios presentes na proteína, reduzindo a sua estabilidade.

A Lipozyme[®] TL IM é imobilizada em silicato de gel hidrofílico (HERNÁNDEZ-MARTÍN; OTERO, 2008; SÁ *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2011b), desse modo, para ter um menor dano em sua estrutura, o ideal é utilizar um solvente mais hidrofóbico. Assim sendo, o solvente escolhido para a lavagem das enzimas no processo de reutilização foi o acetato de etila por apresentar menor perda de atividade enzimática e por solubilizar os dois compostos sólidos presentes na reação (anidrido benzoico e álcool benzílico).

4.3.2 Reuso da Lipozyme[®] TL IM na síntese de benzoato de benzila

O uso de biocatalisadores imobilizados é de extrema importância para a indústria, devido a possibilidade de reutilizar a enzima, assim minimizando a geração de resíduos e auxiliando na viabilidade do processo, visto que a enzima possui custo mais elevado em comparação aos catalisadores químicos.

Posto isso, foi realizado o estudo da eficiência enzimática da Lipozyme[®] TL IM para avaliar a perda da atividade catalítica ao decorrer dos ciclos. Os testes foram realizados em batelada em um banho termostático com agitação a uma temperatura de 60 °C, 24 horas de reação, com uma agitação de 105 ± 5 rpm, razão molar dos substratos 1:3 (anidrido benzoico:álcool benzílico) e concentração enzimática de 8% (m/m). A Tabela 7 mostra a evolução da atividade enzimática medida antes de cada ciclo ser iniciado e depois do terceiro reuso, como também, as conversões obtidas em cada experimento.

Tabela 7 – Efeito do uso sucessivo da Lipozyme[®] TL IM, associando a conversão em benzoato de benzila com a atividade enzimática em cada ciclo.

Ciclo	Atividade enzimática (U/g)	Conversão em benzoato de benzila (%)
1°	15,5 ± 0,6	63,6 ± 3,8
2°	2,7 ± 1,8	37,9 ± 1,0
3°	3,8 ± 0,9	38,9 ± 0,9

Fonte: Autor, 2022.

Através dos ciclos de reutilização o primeiro ciclo com a Lipozyme[®] TL IM obteve conversão mais alta, sendo ~ 64%. Este valor de conversão (63,6%) deveria ser em torno de 93,3%, como foi obtido no estudo da cinética, pois foram realizados nas mesmas condições. Esta queda expressiva é devido a redução da atividade enzimática, pois, antes do início da cinética e do primeiro ciclo de reuso, a atividade enzimática foi de 50,2 U/g e 15,5 U/g, respectivamente. A atividade enzimática teve esta variação provavelmente devido a vida útil da enzima ou por outros fatores externos, ocasionando uma redução na conversão já no primeiro ciclo.

Após o primeiro ciclo de lavagem da enzima, a conversão caiu para um valor em torno de ~ 38% com uma atividade enzimática de ~ 2,7 U/g. E no terceiro ciclo chegou em ~ 39% com uma atividade de ~ 3,8 U/g. No fim do terceiro ciclo a atividade enzimática foi avaliada dando em torno de ~ 2,4 U/g, mostrando uma tendência a se estabilizar.

Esta queda na atividade enzimática durante os ciclos pode estar ocorrendo devido a desnaturação do biocatalisador em virtude da possível variação nas condições de processo, como por exemplo, temperatura e pH, como também, contato com o solvente e conversão do produto (LERIN *et al.*, 2011; QUEIROZ *et al.*, 2015). O ácido benzoico é um dos produtos da acilação estudada neste trabalho. Este composto é sólido e, como dito anteriormente, é difícil solubilizá-lo, dificultando a sua remoção dos poros da enzima, sendo assim um dos fatores que podem estar ocasionando a queda da atividade enzimática ao decorrer dos ciclos.

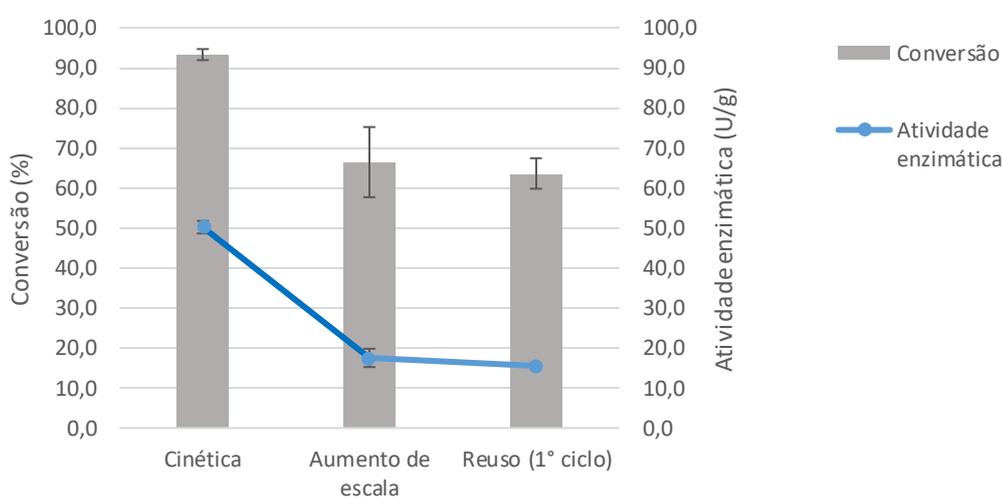
Diversos estudos mostraram esse comportamento na reutilização de enzimas (BALEN, 2016; FERRAZ *et al.*, 2015; LERIN *et al.*, 2011; LOSS *et al.*, 2016; MENESES, 2019; YADAV; JADHAV, 2005; YADAV; LATHI, 2004). Dentre esses estudos, Shiki (2018) percebeu esta queda na produção do mesmo éster estudado nesta presente pesquisa utilizando

Lipozyme[®] RM IM e Novozym[®] 435, em uma solução com uma temperatura de 40 °C e 60 °C, respectivamente. O primeiro ciclo da Lipozyme[®] RM IM iniciou com um valor de conversão entre 45 e 50%. Posteriormente, teve uma queda de 20% no segundo finalizando com um valor próximo de 10%. Já a Novozym[®] 435 teve um valor de conversão inicial entre 20 e 25%, caindo em 10% no segundo ciclo e chegando a uma conversão próxima de 5% no quinto ciclo de uso do catalisador.

4.4 AUMENTO DE ESCALA DA SÍNTESE DE BENZOATO DE BENZILA

A ampliação da escala é um estudo importante a ser feito, pois é assim que vai ser avaliado se os resultados de conversão obtidos em escala laboratorial se mantêm em larga escala. O aumento foi de 20 vezes a quantidade de substrato utilizado nos ensaios anteriores (5,5 para 110 g). Este experimento foi condicionado em um balão de 250 mL dentro de um banho termostático com agitação de 105 ± 5 rpm. O resultado está exposto na Figura 20, junto com as respostas obtidas na cinética e no primeiro ciclo de reutilização de enzima.

Figura 20 – Conversão em benzoato de benzila junto com a atividade enzimática medida antes de cada experimento (cinética, aumento de escala e primeiro ciclo de reuso enzimático). Condições: 24 horas de reação, temperatura 60 °C, razão molar 1:3 (anidrido benzoico:álcool benzílico) e concentração enzimática 8% (m/m).



Fonte: Autor, 2022.

Comparado ao valor obtido no experimento da cinética (item 4.2), nota-se que a conversão decaiu de $93,3 \pm 1,4\%$ para $66,4 \pm 8,8\%$ após o aumento de escala. Esta queda pode ser explicada pelo fato de a atividade enzimática ter diminuído entre o ensaio da cinética e o aumento da escala. Antes de realizar o ensaio de aumento de escala, a atividade enzimática foi

de $17,5 \pm 2,3$ U/g, ou seja, um valor 65% menor se comparado ao medido antes do estudo da cinética ($50,2 \pm 1,6$ U/g).

No entanto, relacionando o valor de conversão obtido no primeiro ciclo de reuso ($63,6 \pm 3,8\%$ com atividade de $15,5 \pm 0,6$ U/g) e a conversão encontrada no aumento de escala ($66,4 \pm 8,8\%$, $17,5 \pm 2,3$ U/g), os resultados foram próximos, confirmando uma boa reprodutibilidade e possibilidade de produção em escala industrial.

Contudo, alguns ensaios foram conduzidos para avaliar possíveis impedimentos de transferência de massa. Para tanto, a rotação foi alterada de 105 ± 5 rpm para 200 ± 5 rpm. O resultado de conversão obtido neste ensaio foi de 63,1%, sendo um valor semelhante ao obtido com uma rotação mais baixa (66,4% em 105 rpm), indicando que provavelmente não houve problemas difusionais relacionados à redução da conversão.

Visto isso, reforça-se a hipótese de uma provável redução da atividade enzimática durante estocagem no período de condução dos ensaios, supostamente relacionada ao final da vida útil do lote da enzima em estudo. A atividade da enzima foi aferida previamente ao seu uso nos ensaios de acilação e, analisando a Figura 20, destaca-se uma queda na atividade entre os ensaios de cinética, aumento de escala e reuso (testes realizados em meses diferentes). O que pode ser, em parte, uma das justificativas para a variação no percentual de conversão de benzoato de benzila obtido nos experimentos realizados. Ou seja, uma maior ou menor atividade enzimática pode se traduzir, respectivamente, numa maior ou menor conversão no éster de interesse.

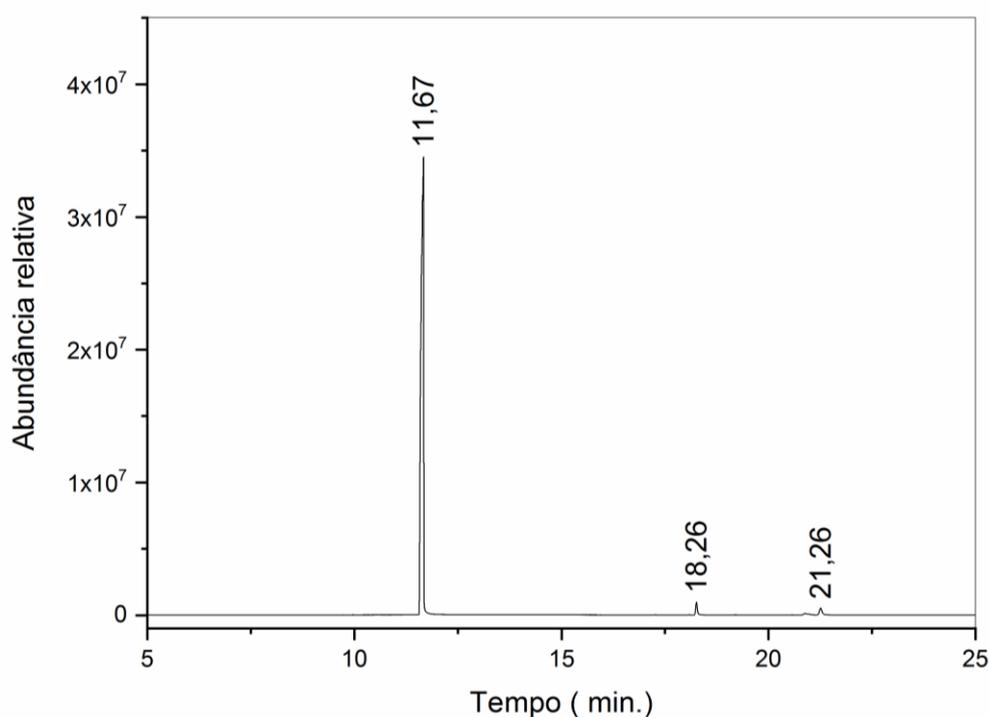
É possível ressaltar, ainda, que uma variação na atividade enzimática - antes do emprego da Lipozyme® TL IM em qualquer reação de interesse - também pôde ser observada quando comparados os estudos de Sá (2018) e Zenevicz (2015). Em ambos os trabalhos, a metodologia adotada para medir a atividade enzimática foi idêntica à utilizada neste trabalho, mas Sá (2018) alcançou um resultado igual a $19,3 \pm 0,4$ U/g, já Zenevicz (2015) chegou a um valor de $50 \pm 1,31$ U/g. Esta divergência de valores de atividade enzimática pode estar associada ao intervalo de tempo entre os ensaios, ao biocatalisador ser sensível às condições de armazenagem, ou a problemas no lote da enzima comercial utilizada. Por conseguinte, é necessário um estudo mais aprofundado do comportamento da atividade da enzima, além da utilização de um novo lote de enzima para validação dos dados.

4.5 PURIFICAÇÃO DO BENZOATO DE BENZILA

4.5.1 Caracterização por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas do produto purificado

O produto da reação entre álcool benzílico e anidrido benzoico foi purificado através da extração líquido-líquido e destilação a vácuo e, posteriormente, analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS). A Figura 21 apresenta o perfil cromatográfico do produto purificado obtido na síntese entre anidrido benzoico e álcool benzílico.

Figura 21 – Perfil cromatográfico obtido após a purificação do produto da reação entre o anidrido benzoico e o álcool benzílico.



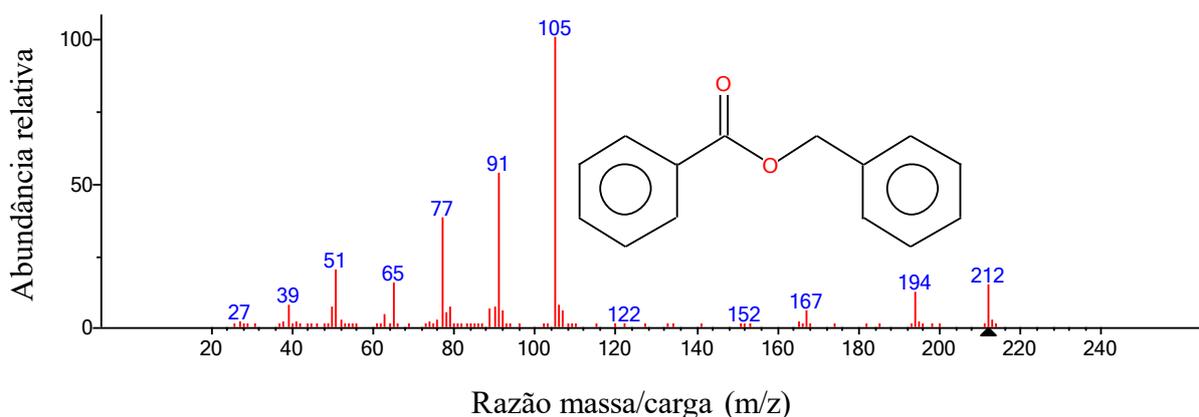
Fonte: Autor, 2022.

Através do cromatograma observa-se que o tempo de retenção do benzoato de benzila foi de 11,66 minutos, apresentando uma pureza de 96,7%. Os outros picos identificados foram: 1,69% de benzilamina (no tempo de 18,261 min) e 1,61% de ácido ftálico (em 20,878 min e 21,255 min), sendo eles possíveis contaminantes dos substratos ou dos solventes utilizados nos processos até a presente etapa, como também, podem ser provenientes da embalagem plástica (epENDORF) que foi utilizada na etapa de armazenamento do produto – pois estão presentes na

composição do plástico. Por fim, pôde-se calcular o rendimento de conversão em benzoato de benzila, sendo este igual a 2,11%.

O espectro de massas obtido experimentalmente representado na Figura 22, demonstra 86% de semelhança com o espectro do benzoato de benzila verificado na biblioteca NIST11. Os 10 picos mais abundantes (razão massa/carga) foram: 105, 91, 77, 194, 51, 65, 167, 106, 90, 79.

Figura 22 – Espectro de massas do benzoato de benzila obtido experimentalmente.



Fonte: Autor, 2022.

O índice de retenção é uma ferramenta que auxilia na caracterização de compostos. Tal métrica é calculada por interpolação, relacionando o tempo de retenção do analito aos tempos de retenção de outros dois padrões, que podem ser n-alcenos (mais utilizado), ésteres metílicos, álcoois, ácidos graxos, dentre outros (AMARAL, 2016; INCZEDY; LENGYEL; URE, 1998; VIEGAS; BASSOLI, 2007). Os índices de retenção mais utilizados são: o de Kovats, introduzido em 1958; e o índice de retenção linear (IRL), proposto por Van Den Dool e Kratz em 1963 (AMARAL, 2016; KRATZ, 1963; MÜHLEN, 2009).

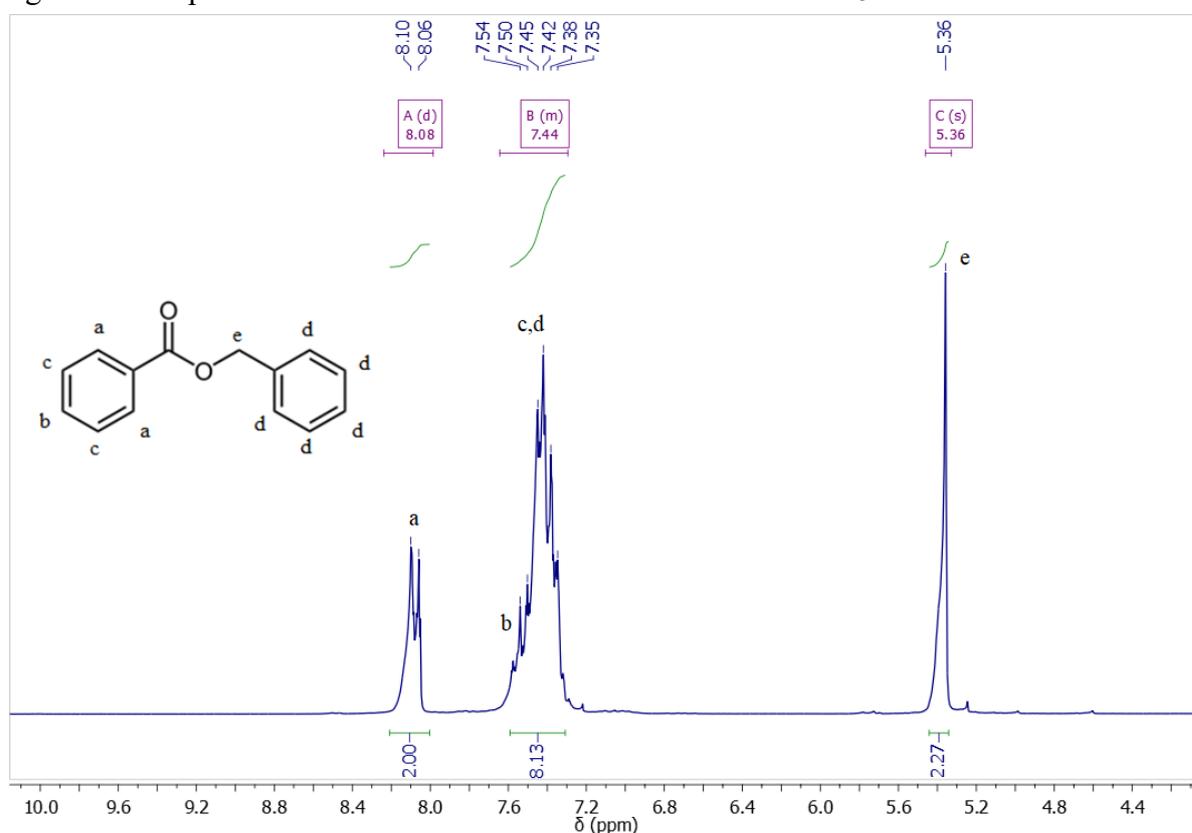
Devido à complexidade das matrizes e similaridade nas estruturas, a utilização do índice de retenção auxilia na identificação de compostos. Por esta razão, foi calculado o IRL da amostra obtida após a purificação, sendo este valor igual a 1774. Já o encontrado na literatura para o benzoato de benzila é 1760, mostrando que o resultado atingido se aproxima do tabelado (ADAMS, 2017).

4.5.2 Confirmação da purificação do produto por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

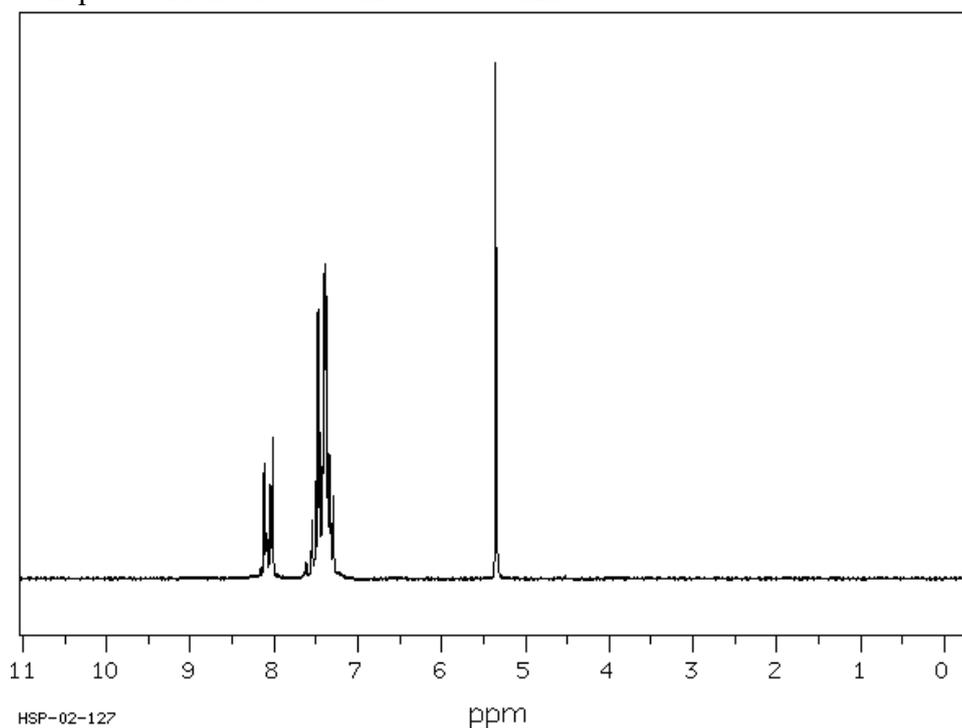
Com o intuito de confirmar a purificação do benzoato de benzila, realizou-se a análise de RMN¹H. No geral, esta ferramenta possibilita a identificação dos grupos funcionais. Quando estes grupos apresentam maior deslocamento (ppm), eles se encontram mais próximos do átomo de oxigênio, ou seja, estão menos blindados. Já os grupos que estão mais próximos ao carbono, estão mais protegidos, apresentando menores valores de ppm (NASCIMENTO; BLOCK JR., 2001).

O espectro RMN¹H resultante de produto está demonstrado na Figura 23, e este apresenta os seguintes dados: RMN¹H (200 MHz, CDCl₃) δ 8.08 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.64 – 7.29 (m, 8H), 5.36 (s, 2H). O resultado demonstra entre parênteses a multiplicidade (s = singlete, d = dubleto, dd = duplo dubleto, t = triplete, m = multipeto), a constante de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e o número de hidrogênios. Na Figura 24 é apresentado o espectro oferecido pela base de dados SDDBS.

Figura 23 – Espectro de RMN¹H do benzoato de benzila em CDCl₃.



Fonte: Autor, 2022.

Figura 24 – Espectro RMN¹H do benzoato de benzila.

Fonte: SDBS.

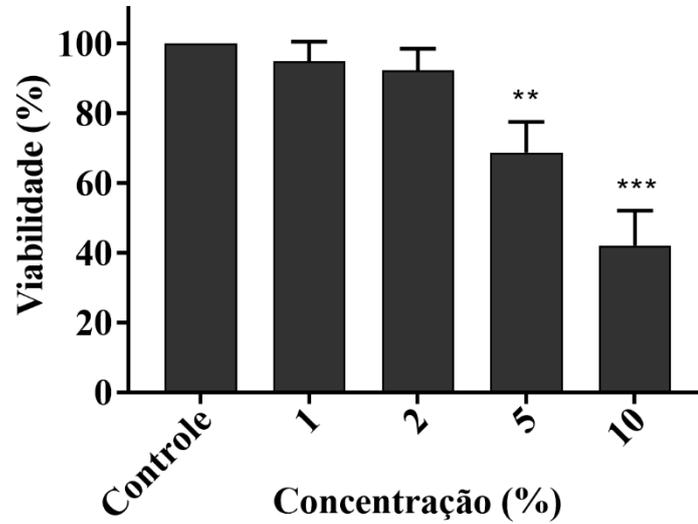
Ao analisar o espectro de RMN¹H do produto, verificou-se um perfil parecido com o encontrado na literatura, confirmando assim a sua purificação (DIASTUTI; CHASANI; SUWANDRI, 2020).

4.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO BENZOATO DE BENZILA

4.6.1 Viabilidade celular (citotoxicidade) do benzoato de benzila e teste da hemólise

O impacto citotóxico do benzoato de benzila incubado com diferentes concentrações (1, 2, 5 e 10%) em células NHI3t3 foi avaliado através do teste de MTT. A concentração de 1 e 2% de éster não apresentou citotoxicidade nas células NHI3t3, como pode ser observado na Figura 25. Porém, nas concentrações de 5 e 10% é possível observar um certo efeito tóxico sobre as células – uma redução de 30% da viabilidade celular na concentração de 5% e uma redução de aproximadamente 60% na concentração de 10%. Comparando essas concentrações (5 e 10%) com o controle (só as células NHI3t3 com o meio DMEM) houve uma diferença significativa ($p < 0,05$).

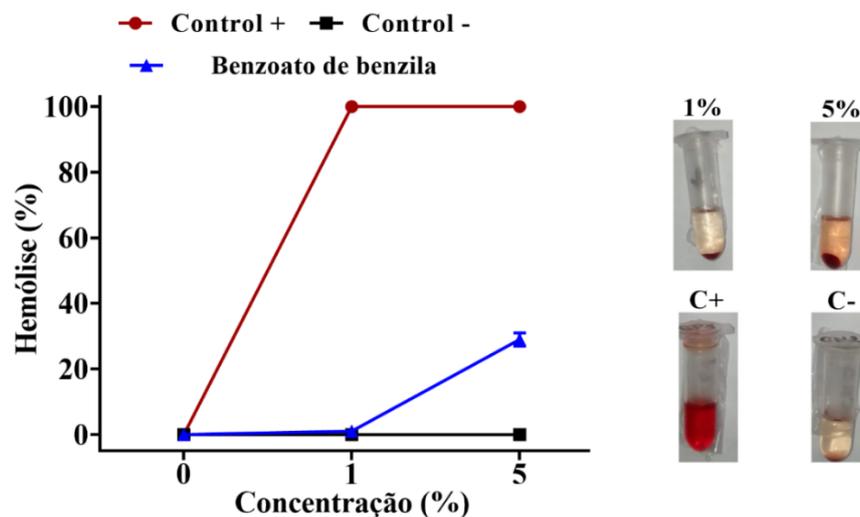
Figura 25 – Ensaio de citotoxicidade do benzoato de benzila em diferentes concentrações (1, 2, 5 e 10%). Diferenças significativas são mostradas ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle - ANOVA seguida pelo teste de Tukey).



Fonte: Autor, 2022

O efeito causado pelo benzoato de benzila nos eritrócitos humanos foi avaliado através do teste de hemólise, que é um importante indicador da qualidade das células. O resultado obtido da citotoxicidade do benzoato de benzila foi validado através do teste de hemólise, em que a concentração de 1% de benzoato de benzila não apresentou dano aos eritrócitos humanos. No entanto, aumentando a concentração para 5% houve um certo impacto nas células (Figura 26).

Figura 26 – Ensaio de hemólise em eritrócitos humanos após incubação com benzoato de benzila em diferentes concentrações (1 e 5%).



Fonte: Autor, 2022.

Assolini *et al.* (2020) avaliaram a atividade leishmanicida da 4-nitrochalcona – cetona que possui dois anéis aromáticos e apresenta diversas atividades biológicas, dentre elas antibacteriana e antiviral. Para isto, realizou o teste MTT da 4-nitrochalcona (livre e encapsulada em nanopartículas de cera de abelha) em contato com macrófagos infectados por *L. amazonenses*. A 4-nitrochalcona livre não alterou a viabilidade dos macrófagos nas concentrações de 0,3 e 1,3 µg/mL, porém em 2,5 e 12,7 µg/mL houve diferença significativa em comparação ao controle ($p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente), apresentando citotoxicidade nessas quantidades. Já na forma encapsulada, a 4-nitrochalcona não demonstrou citotoxicidade nas concentrações testadas (0; 0,3; 1,3; 2,5 e 12,7 µg/mL). Além disso, analisaram se a 4-nitrochalcona (livre e encapsulada) causaria hemólise em eritrócitos de sangue de ovelha. Com este ensaio, observaram que não houve atividade hemolítica nas concentrações testadas (0,3; 1,3 e 2,5 µg/mL) tanto em sua forma livre quanto encapsulada.

Batiha *et al.* (2019) testaram o efeito inibitório da ivermectina sob o crescimento dos parasitas *Babesia* e *Theileria*. A ivermectina, assim como o benzoato de benzila, também é utilizada no tratamento de escabiose. A concentração inibitória média (IC₅₀) da ivermectina – concentração da substância capaz de inibir 50% do seu valor inicial – obtida para os parasitas *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. caballi* e *T. equi* foram, respectivamente, em torno de 46,6; 86,3; 26,3; 38,2 e 78,8 µg/mL. O teste de viabilidade dos parasitas *Babesia* e *Theileria* tratados com ivermectina na concentração de $4 \times IC_{50}$ demonstrou que *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* e *B. caballi* não foram inibidos pela ação da ivermectina, enquanto *T. equi* regrediu a sua concentração apresentando efeito citotóxico.

Em vista disso, a concentração de 1% de benzoato de benzila pode ser considerada segura para ser usada na área biomédica, pois não apresenta danos significativos às células NHI3t3 e aos eritrócitos humanos nos testes de MTT e de hemólise, respectivamente. A partir disso, é necessário realizar um estudo sobre as aplicações terapêuticas do benzoato de benzila na concentração de 1%, como também, estudar a eficácia no tratamento de escabiose nessa proporção.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi realizada a síntese de benzoato de benzila através da acilação enzimática em sistema livre de solvente. A enzima utilizada foi a Lipozyme[®] TL IM e a reação foi conduzida em batelada em um banho termostático com agitação orbital. Altas conversões em benzoato de benzila foram obtidas via acilação enzimática de anidrido benzoico e álcool benzílico, e a avaliação da cinética da reação se mostrou importante para garantir os elevados números de conversão.

O escalonamento do processo em nível laboratorial se mostrou promissor, com isso, é possível afirmar que a conversão permanece estável para uma possível produção industrial. Apesar de ainda serem necessários testes utilizando uma enzima de um novo lote, uma vez que a Lipozyme[®] TL IM apresentou variação em sua atividade diminuindo a produção do éster no decorrer dos experimentos, é possível verificar que a produção do benzoato de benzila é promissora nas condições testadas.

A purificação do éster utilizando a extração líquido-líquido seguida da destilação a vácuo atingiu um resultado satisfatório, obtendo um elevado teor de benzoato de benzila. Por fim, o benzoato de benzila purificado não apresentou citotoxicidade e dano aos fibroblastos e aos eritrócitos humanos na proporção de 1%, ou seja, o uso deste éster nessa concentração pode ser considerado seguro na área biomédica. No entanto, são necessários estudos complementares sobre a eficácia no tratamento de escabiose nessa concentração de benzoato de benzila (1%), como também, em outras aplicações terapêuticas.

Além do mais, como os resultados do presente trabalho indicaram, propõem-se uma avaliação mais ampla dos diferentes solventes aplicados na etapa de lavagem da enzima, a fim de tanto assegurar a retirada do ácido benzoico da superfície da enzima quanto preservar a atividade da mesma, podendo ampliar a quantidade de ciclos de reuso com uma conversão de produto satisfatória.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry**. 4.1 ed. Allured publishing, 2017.
- AL-ASSIUTY, B. A.; NENAAH, G. E.; AGEBA, M. E. Chemical profile, characterization and acaricidal activity of essential oils of three plant species and their nanoemulsions against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored-food mite. **Experimental and Applied Acarology**, v. 79, n. 3–4, p. 359–376, 2 nov. 2019.
- AL-ZUHAIIR, S. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: A kinetics study. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 5, p. 1442–1448, 2005.
- ALBERICI, F. *et al.* Ivermectin alone or in combination with benzyl benzoate in the treatment of human immunodeficiency virus-associated scabies. **British Journal of Dermatology**, v. 142, n. 5, p. 969–972, maio 2000.
- AMARAL, M. D. S. S. **Aplicação de colunas capilares de líquido iônico na análise de compostos voláteis de café por cromatografia gasosa**. 2016. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- ASLAM, M.; TORRENCE, G. P.; ZEY, E. G. Esterification. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. 1. ed. John Wiley e Sons, 2000.
- ASSOLINI, J. P. *et al.* 4-nitrochalcone exerts leishmanicidal effect on *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes, and the 4-nitrochalcone encapsulation in beeswax copaiba oil nanoparticles reduces macrophages cytotoxicity. **European Journal of Pharmacology**, v. 884, n. July, 2020.
- BACHEWAR, N. P. *et al.* Comparison of Safety, Efficacy, and Cost Effectiveness of Benzyl Benzoate, Permethrin, and Ivermectin in Patients of Scabies. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 9–14, fev. 2009.
- BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Enhanced biocatalytic activity of lipase immobilized on biodegradable copolymer of chitosan and polyvinyl alcohol support for synthesis of propionate ester: Kinetic approach. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 49, p. 18806–18815, 2014.
- BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. The combine use of ultrasound and lipase immobilized on co-polymer matrix for efficient biocatalytic application studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 255–264, dez. 2015.
- BADGUJAR, K. C.; PAI, P. A.; BHANAGE, B. M. Enhanced biocatalytic activity of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase under sonicated condition. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 2, p. 211–221, 2016.
- BADGUJAR, K. C.; SASAKI, T.; BHANAGE, B. M. Synthesis of lipase nano-bio-conjugates as an efficient biocatalyst: Characterization and activity-stability studies with potential biocatalytic applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 68, p. 55238–55251, 18 jun. 2015.
- BALEN, M. **Síntese enzimática de ascorbil oleato utilizando tecnologias alternativas**. 2016. 153 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos ,

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

BASSO, A.; HESSELER, M.; SERBAN, S. Hydrophobic microenvironment optimization for efficient immobilization of lipases on octadecyl functionalised resins. **Tetrahedron**, v. 72, n. 46, p. 7323–7328, 2016.

BATIHA, G. E. S. *et al.* Evaluation of the inhibitory effect of ivermectin on the growth of Babesia and Theileria parasites in vitro and in vivo. **Tropical Medicine and Health**, v. 47, n. 1, p. 1–12, 2019.

BECKER, L. C. *et al.* Safety Assessment of Alkyl Benzoates as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v. 31, n. Supplement 3, p. 342S-372S, 2012.

BEN AKACHA, N.; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. May 2014, p. 675–706, abr. 2015.

BERGER, R. G. Biotechnology of flavours-the next generation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1651–1659, 16 jul. 2009.

BIZZO, H. R. *et al.* Um conjunto de planilhas eletrônicas para identificação e quantificação de constituintes de óleos essenciais. **Química Nova**, v. 43, n. 1, p. 98–105, 2020.

BÔAS, R. N. V. *et al.* Síntese enzimática do caprilato de isopentila utilizando óleo fúsel como matéria-prima. **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 541–547, mar. 2017.

BON, E. P.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. **Enzimas em biotecnologia – Produção, aplicação e mercado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BORGES, J. P. **Produção, imobilização e aplicação de lipase de Fusarium verticillioides Araraquara**. 2016. 161 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial**. 1. São Paulo: ed. Blucher, 2001.

BOSLEY, J. A.; PEILOW, A. D. Immobilization of lipases on porous polypropylene: Reduction in esterification efficiency at low loading. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 2, p. 107–111, fev. 1997.

CALVALCANTE, P. M. M. *et al.* Proposta de preparação e caracterização de ésteres: Um experimento de análise orgânica na graduação. **Educacion Quimica**, v. 26, n. 4, p. 319–329, out. 2015.

CENI, G. *et al.* Optimization of 1-glycerol benzoate production by enzymatic transesterification in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 2, p. 107–112, 2010.

CHAIBAKHSH, N. *et al.* Optimization of enzymatic synthesis of eugenol ester using statistical approaches. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 226–231, jul. 2012.

CHEN, J.-P. Production of ethyl butyrate using gel-entrapped Candida cylindracea lipase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 404-409, 1996.

- CHIARADIA, V. *et al.* Synthesis of eugenol esters by lipase-catalyzed reaction in solvent-free system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 742–751, ago. 2012.
- CHOI, S. Z. *et al.* Immunobiological activity of a new benzyl benzoate from the aerial parts of *Solidago virga-aurea* var. *gigantea*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 1, p. 49–54, jan. 2005.
- CONSTABLE, D. J. C.; JIMENEZ-GONZALEZ, C.; HENDERSON, R. K. Perspective on solvent use in the pharmaceutical industry. **Organic Process Research and Development**, v. 11, n. 1, p. 133–137, 2007.
- CONTESINI, F. J. *et al.* *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3–4, p. 163–171, dez. 2010.
- CURRIE, B. J. *et al.* First Documentation of In Vivo and In Vitro Ivermectin Resistance in *Sarcoptes scabiei*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 1, p. e8–e12, 1 jul. 2004.
- DE CASTRO, H. F. *et al.* Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146–156, fev. 2004.
- DHAKE, K. P. *et al.* HPMC-PVA Film immobilized *rhizopus oryzae* lipase as a biocatalyst for transesterification reaction. **ACS Catalysis**, v. 1, n. 4, p. 316–322, mar. 2011.
- DHAKE, K. P. *et al.* Investigation of steapsin lipase for kinetic resolution of secondary alcohols and synthesis of valuable acetates in non-aqueous reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 15–23, maio 2012.
- DIASTUTI, H.; CHASANI, M.; SUWANDRI. Antibacterial activity of benzyl benzoate and crotopoxide from *Kaempferia rotunda* L. Rhizome. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 9–15, 2020.
- DUBEY, N. K. *et al.* Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). **Fitoterapia**, v. 71, n. 5, p. 567–569, set. 2000.
- DUMESIC, J. A.; HUBER, G. W.; BOUDART, M. **Handbook of heterogeneous catalysis**. 2. ed. [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 2008.
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6. ed. New York: Springer, 1997.
- FERNANDES, N. **Produção de xilanase e xilosidase por *Aspergillus versicolor***. 42 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.
- FERRAZ, L. I. R. *et al.* Application of home-made lipase in the production of geranyl propionate by esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 44–48, jan. 2015.
- FERREIRA, A. R. **Ésteres sintéticos derivados do ácido 3-metil-4-nitrobenzoico e avaliação da sua atividade antifúngica**. 2018. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.
- FERRER, M. *et al.* Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 75, n. 7, p. 569–576, 28 jun. 2000.

- FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 632–644, nov. 2011.
- FRANCISCO, V. C. B. **Resíduos de laranja como fonte direta de lipases: obtenção, caracterização bioquímica e aplicações**. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.
- FULLER, L. C. Epidemiology of scabies. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 2, p. 123–126, abr. 2013.
- GALEMBECK, F.; CSORDAS, Y. **Cosméticos : a química da beleza**. Disponível em: <<http://fisiosale.com.br/assets/9noções-de-cosmetologia-2210.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2020.
- GANDHI, N. N. Applications of Lipase, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Waterloo, Waterloo ON N2L 3G1, Canada. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 74, n. 6, p. 621–634, jun. 1997.
- GAO, W. *et al.* A novel esterase from a marine mud metagenomic library for biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2016.
- GENG, B. *et al.* Cinnamyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in a solvent-free system. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 59, n. 4, p. 270–275, jul. 2012.
- GLAZIOU, P. *et al.* Comparison of ivermectin and benzyl benzoate for treatment of scabies. **Trop Med Parasitol**, v. 44, n. 4, p. 331–332, dez. 1993.
- GRYGLEWICZ, S.; JADOWNICKA, E.; CZERNIAK, A. Lipase catalysed synthesis of aliphatic, terpene and aromatic esters by alcoholysis in solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 17, p. 1379–1382, set. 2000.
- GUINDANI, C. *et al.* Bovine serum albumin conjugation on poly(methyl methacrylate) nanoparticles for targeted drug delivery applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, n. January, p. 101490, 2020.
- GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M. Thermomyces lanuginosus lipase-catalyzed synthesis of natural flavor esters in a continuous flow microreactor. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.
- GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOĞLU, Ü. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 379–386, 2002.
- HAGSTRUM, D. W.; PHILLIPS, T. W.; CUPERUS, G. **Stored Product Protection**. Manhattan: Kansas State University Printing Services, 2012.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, jun. 2006.
- HAYDEN, M. L. *et al.* Benzyl benzoate moist powder: Investigation of acaricidal activity in cultures and reduction of dust mite allergens in carpets. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 89, n. 2, p. 536–545, fev. 1992.
- HENGGE, U. R. *et al.* Scabies: a ubiquitous neglected skin disease. **Lancet Infectious**

Diseases, v. 6, n. 12, p. 769–779, dez. 2006.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 277–286, jan. 2008.

HEUKELBACH, J.; FELDMEIERS, H. Scabies. **Lancet**, v. 367, n. 9524, p. 1767–1774, 2006.

HILAL, N. *et al.* Lipase-immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification: Comparison of various approaches to membrane preparation. **Journal of Membrane Science**, v. 268, n. 2, p. 198–207, 15 jan. 2006.

HOLZ, J. C. P. **Síntese enzimática de estearato de cetosteáril em sistema livre de solvente**. 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

HORCHANI, H. *et al.* Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized *Staphylococcus aureus* lipase: Optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2809–2817, abr. 2010.

HUFFAM, S. E.; CURRIE, B. J. Ivermectin for *Sarcoptes scabiei* hyperinfestation. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 152–154, jan. 1998.

HURTADO, C. R.; PAZ, M. J. D. **Obtenção de ésteres etílicos (biodiesel) a partir de diferentes óleos vegetais utilizando lipase imobilizada de *Candida antarctica* (NOVOZYM 435)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

INCZEDY, J.; LENGYEL, T.; URE, A. M. **Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive Rules 1997, “The Orange Book”**. 3. ed. [s.l.] Blackwell Science: Oxford, 1998.

ISAH, A. A. *et al.* Synthesis of geranyl propionate in a solvent-free medium using *Rhizomucor miehei* lipase covalently immobilized on chitosan–graphene oxide beads. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 199–210, 3 nov. 2017.

IWASAKI, T.; MAEGAWA, Y.; MASHIMA, K. Esterification. In: **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. [s.l.] John Wiley e Sons, 2012.

JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315–351, 1999.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390–397, 1 ago. 2002.

JASPER, E. A. **Síntese do Éster Aromático Benzoato de Benzila Via Esterificação Enzimática Elaine de Andrade**. 2018. 53 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, C. *et al.* Cradle-to-Gate Life Cycle Inventory and Assessment of Pharmaceutical Compounds. **International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 9, n. 2, p. 114–121, 2004.

JOHNSON, W. *et al.* Safety Assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and its Salts, and

- Benzyl Benzoate. **International Journal of Toxicology**, v. 36, n. 3_suppl, p. 5S-30S, 2017.
- KALPAKLIOGLU, A. F. *et al.* The effectiveness of benzyl benzoate and different chemicals as acaricides. **Allergy**, v. 51, n. 3, p. 164–170, mar. 1996.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, abr. 2012.
- KARTHIKEYAN, K. Treatment of scabies: Newer perspectives. **Postgraduate Medical Journal**, v. 81, n. 951, p. 7–11, 13 out. 2005.
- KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1793–1806, 2015.
- KIM, H.; PARK, C. Enzymatic synthesis of phenethyl ester from phenethyl alcohol with acyl donors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 100, p. 37–44, 2017.
- KOELLER, K. M.; WONG, C. H. Enzymes for chemical synthesis. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 232–240, 11 jan. 2001.
- KOUWENHOVEN, H. K.; BEKKUM, H. VAN. **Handbook of Heterogeneous catalysis**. 5. ed. [s.l.] Wiley, 1997.
- KRATZ, H. VA. D. D. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. n. 3, 1963.
- KUO, C. H. *et al.* Enzymatic synthesis of rose aromatic ester (2-phenylethyl acetate) by lipase. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 10, p. 2141–2147, 6 mar. 2012.
- LAROQUE, D. A. **Óleo de Cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*) como substrato para a síntese de Acetato de Eugenila via catálise heterogênea em sistema livre de solvente**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.
- LEE, D. X.; XIA, W. S.; ZHANG, J. L. Enzymatic preparation of chitoooligosaccharides by commercial lipase. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 291–295, 15 nov. 2008.
- LENARDÃO, E. J. *et al.* “Green chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.
- LERIN, L. *et al.* Successive cycles of utilization of Novozym 435 in three different reaction systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 2, p. 181–188, 2011.
- LOSS, R. A. **Síntese e encapsulamento de acetato de eugenila obtido via esterificação enzimática e catálise química heterogênea em sistema livre de solvente orgânico**. 2015. 177 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- LOSS, R. A. *et al.* Encapsulation of eugenyl acetate in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 3859–3864, 17 out. 2016.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, A. L. F.; RANDALL, R. . Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 28 maio 1951.
- LUE, B. M. *et al.* Lipase-catalyzed esterification of cinnamic acid and oleyl alcohol in

- organic solvent media. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 4, p. 462–468, 7 mar. 2005.
- MACEDO, G. A.; PARK, Y.; PASTORE, G. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista De Microbiologia. Soc Brasileira Microbiologia**, v. 28, n. 2, p. 90–95, 1997.
- MACKAY, D.; SHIU, W.; MA, K. **Ilustred handbook of physical-chemical and environmental fate for organic chemicals**. Boca Raton : Lewis Publishers, 1997. v. 5. 812p.
- MAHADIK, N. D. *et al.* Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715–721, 31 dez. 2002.
- MAHAPATRA, P. *et al.* Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, n. 1–2, p. 57–63, set. 2009.
- MAJUMDER, A. B. *et al.* Lipase catalyzed synthesis of benzyl acetate in solvent-free medium using vinyl acetate as acyl donor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 15, p. 4041–4044, maio 2006.
- MANAN, F. M. A. *et al.* Statistical modelling of eugenol benzoate synthesis using *Rhizomucor miehei* lipase reinforced nanobioconjugates. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 249–262, fev. 2016.
- 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**, v. 105, p. 18–25, jul. 2014.
- MAYORDOMO, I.; RANDEZ-GIL, F.; PRIETO, J. A. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 105–109, jan. 2000.
- MEHER, L. C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248–268, jun. 2006.
- MENESES, A. C. DE. **Green synthesis of benzyl esters mediated by enzymatic biocatalysts using different reactor configurations**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2019.
- MENESES, A. C. DE *et al.* Enzymatic synthesis of benzyl benzoate using different acyl donors: Comparison of solvent-free reaction techniques. **Process Biochemistry**, v. 92, p. 261–268, maio 2020.
- MOHAMAD, N. R. *et al.* A facile enzymatic synthesis of geranyl propionate by physically adsorbed *Candida rugosa* lipase onto multi-walled carbon nanotubes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 72, p. 49–55, maio 2015.
- MONTAÑEZ VALENCIA, M. K.; PADRÓ, C. L.; SAD, M. E. Gas phase acylation of guaiacol with acetic acid on acid catalysts. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 278, n. 278, p. 119317, dez. 2020.
- MONTE, L. D. O. **Efeito antinociceptivo do salicilato de bornila em camundongos. 2014. 77f.** Dissertação. João Pessoa (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,

Farmacologia). Universidade Federal Da Paraíba , 2014.

MONTEIRO, Ildenice Nogueira. **Composição química e avaliação da atividade carrapaticida do óleo essencial de *Cinnamomun zeylanicum* no controle de *Rhipicephalus microplus***. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.

MOTTA, V. T. **Bioquímica**. 2. ed. Rio de Janeiro. Medbook, 2011.

MÜHLEN, C. VON. Índices De Retenção Em Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 21–29, 2009.

NARWAL, S. K. *et al.* Green synthesis of isoamyl acetate via silica immobilized novel thermophilic lipase from *Bacillus aerius*. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 69–73, 6 fev. 2016.

NASCIMENTO, C. J. DO; BLOCK JR., C. Ressonância magnética nuclear: Gradus Primus. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 52–61, 2001.

NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 8, p. 1191–1195, set. 1996.

NOVOZYMES. **Immobilized lipases for biocatalysis**. Disponível em: <https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis_brochure_Immobilised_Lipases.pdf>. Acesso em: 7 fev. 2020.

NUERNBERG, G. D. B. **Imobilização de lipases em filmes de poli (álcool vinílico) e carboximetilcelulose** . Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

NWANADE, C. F. *et al.* Individual and synergistic toxicity of cinnamon essential oil constituents against *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) and their potential effects on non-target organisms. **Industrial Crops and Products**, v. 178, n. February, p. 114614, 2022.

OLIVEIRA, D. *et al.* Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 3, p. 373–382, 2006.

PARAVIDINO, M.; HANEFELD, U. Enzymatic acylation: Assessing the greenness of different acyl donors. **Green Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 2651–2657, 2011.

PARK, Y. K.; PASTORE, G. M.; DE ALMEIDA, M. M. Hydrolysis of soybean oil by a combined lipase system. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 65, n. 2, p. 252–254, fev. 1988.

PAROUL, N. *et al.* Solvent-free production of bioflavors by enzymatic esterification of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 1, p. 13–21, 2012.

PEREIRA, G. N. **Síntese de monoestearato de etilenoglicol por esterificação enzimática em sistema livre de solvente**. 2018. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

PIAZZA, S. P. **Produção de cinamato de benzila via catálise enzimática e avaliação das**

- propriedades biológicas.** 2019. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.
- PINTO, J. R. M.; RIBEIRO, M. G. T. C.; MACHADO, A. A. S. C. The solvent challenge in synthesis – the workup as example. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 971–982, 2019.
- POLIAKOFF, M.; LICENCE, P. Sustainable technology: Green chemistry. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 810–812, 2007.
- QUEIROZ, D. S. DE et al. Efeito Do Solvente Na Atividade Enzimática De Lipases Comerciais Imobilizadas. p. 2097–2104, 2015.
- RAMPIN, M. A. **Síntese de ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de mamona e soja utilizando a lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* (LIPOZYME TL IM).** 2007. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de São Paulo, Brasil, 2007.
- RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975–3981, jul. 2008.
- RAYNAUD, S. *et al.* Squamocin and benzyl benzoate, acaricidal components of *Uvaria pauci-ovulata* bark extracts. **Planta Medica**, v. 66, n. 2, p. 173–175, 2000.
- RICHETTI, A. **Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente.** 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009. Citação com autor incluído n
- ROCHA, C. O. DA. **Nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização de lipases.** 2016. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2016.
- ROMERO, M. D. *et al.* Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in n-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 1, p. 42–48, 2005.
- ROMERO, M. D. *et al.* A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 2, p. 269–277, 1 jan. 2007.
- SÁ, A. G. A. *et al.* A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 69, p. 95–105, nov. 2017.
- SÁ, A. G. A. **Lipase-catalyzed production of benzyl esters in solvent-free system.** 2018. 155 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
- SÁ, A. G. A. *et al.* Biocatalysis of aromatic benzyl-propionate ester by different immobilized lipases. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 5, p. 585–591, 19 jan. 2018.
- SALIHU, A. *et al.* Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36–44, jan. 2012.
- SANTOS, B. L. DOS. **Imobilização de lipase po diferentes técnicas para obtenção de**

- catalizadores estáveis.** 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2014.
- SANTOS, N. C. F. DOS. **Síntese biocatalítica do (r)-2-hidróxi-4-fenilbutanoato de etila.** 2019. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.
- SANTOS, P. DOS *et al.* Synthesis of eugenyl acetate by enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 1–9, 15 out. 2016.
- SAXENA, R. K. *et al.* Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 239–247, 2003.
- SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils : a Review General Aspects of Transesterification Transesterification of Vegetable Oils Acid-Catalyzed Processes Base-Catalyzed Processes. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 9, n. 1, p. 199–210, maio 1998.
- SDBS. **SPECTRAL DATA BASE FOR ORGANIC COMPOUNDS.** Disponível em: <https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi>.
- SENANAYAKE, S. P. J. N.; SHAHIDI, F. Incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oil via lipase-catalyzed transesterification. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 489–496, 2004.
- SHARMA, G. *et al.* Benzyl Benzoate-Loaded Microemulsion for Topical Applications: Enhanced Dermatokinetic Profile and Better Delivery Promises. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 5, p. 1221–1231, dez. 2015.
- SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–14, fev. 2014.
- SHEEMOL, V. N.; TYAGI, B.; JASRA, R. V. Acylation of toluene using rare earth cation exchanged zeolite β as solid acid catalyst. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 215, n. 1–2, p. 201–208, 2004.
- SHIKI, P. S. **Produção de benzoato de benzila por rota enzimática em meio orgânico.** 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
- SHINDE, S. D.; YADAV, G. D. Microwave irradiated immobilized lipase catalyzed synthesis of alkyl benzoate esters by transesterification: Mechanism and kinetic modeling. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 21, p. 8706–8713, 2014.
- SILVA, J. E. D. S. **Utilização de Biocatalisadores para a Obtenção de Ésteres Alifáticos e para a Dessulfurização de Compostos Heterocíclicos.** 2006. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2006.
- SILVA, M. DE L. E *et al.* Bioactive oleanane, lupane and ursane triterpene acid derivatives. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12197–12205, 17 out. 2012.
- SILVA, M. J. A. **LIPOZYME TL IM como catalisador na síntese de acetato de eugenila via acetilação do óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) em sistema**

livre de solvente. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

SILVA, M. J. A. *et al.* Lipozyme TL IM as Catalyst for the Synthesis of Eugenyl Acetate in Solvent-Free Acetylation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 3, p. 782–795, 15 abr. 2015.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486–520, jan. 2012.

SIVAKUMAR, S.; PANGARKAR, V. G.; SAWANT, S. B. Homogeneous system for the synthesis of benzyl salicylate. **Organic Process Research and Development**, v. 6, n. 2, p. 149–151, fev. 2002.

SOLANO, D. M. *et al.* Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 196–207, jul. 2012.

SOUZA, D. A. A. DE; OLIVEIRA, G. N. DE; VALÉRIO, P. P. Estudo Cinético: Hidrólise Alcalina De Ésteres. **E-Xacta**, v. 11, n. 1, p. 109–118, jun. 2018.

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

STENCEL, L. M.; LEADBEATER, N. E. Application of a new interface for rapid optimisation of bio-catalysed processes: Proteolytic digestion and an enzyme-catalysed transesterification as examples. **New Journal of Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 242–247, 2014.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986.

SUAREZ, P. A. Z. *et al.* Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: Desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 768–775, 2009.

TAPLIN, D. *et al.* Comparison of Crotamiton 10% Cream (Eurax) and Permethrin 5% Cream (Elimite) for the Treatment of Scabies in Children. **Pediatr Dermatol**, v. 7, p. 67–73, 1990.

TOMKE, P. D.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification reaction in a solvent free medium. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 241–246, nov. 2015.

TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 716–722, jun. 2007.

VANIN, A. B. *et al.* Antimicrobial and Antioxidant Activities of Clove Essential Oil and Eugenyl Acetate Produced by Enzymatic Esterification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1286–1298, 8 ago. 2014.

VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-INNOWAX. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2031–2034, 2007.

VILLENEUVE, P. *et al.* Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 9,

n. 4–6, p. 113–148, 21 abr. 2000.

WALTON, S. F.; MYERSCOUGH, M. R.; CURRIE, B. J. Studies in vitro on the relative efficacy of current acaricides for *Sarcoptes scabiei* var. *hominis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 92–96, 2000.

WANG, L. *et al.* Preparation of diacylglycerol-enriched oil from free fatty acids using lecithase ultra-catalyzed esterification. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 10, p. 1557–1565, 2011a.

WANG, W. *et al.* Production of extremely pure diacylglycerol from soybean oil by lipase-catalyzed glycerolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 2, p. 192–196, 2011b.

WANG, Y. *et al.* Synthesis of benzyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 256–261, dez. 2015.

WANG, Y. *et al.* High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **Food Chemistry**, v. 190, p. 629–633, 1 jan. 2016.

WOHLGEMUTH, R. Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 713–724, dez. 2010.

YADAV, G. D.; DEVENDRAN, S. Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous medium. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 496–502, mar. 2012.

YADAV, G. D.; DHOOT, S. B. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1–4, p. 34–39, maio 2009.

YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 86, n. 1–3, p. 215–222, 28 nov. 2005.

YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: Kinetic studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, n. 2–3, p. 113–119, 22 out. 2004.

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

ZANETTI M., CARNIEL T. K., VALÉRIO A., OLIVEIRA J. V., OLIVEIRA D., ARAÚJO P. H., RIELLAC G. H. AND FIORI M. A. Synthesis of geranyl cinnamate by lipase-catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 115–121, 3 maio 2016.

ZENEVICZ, M. C. P. **Hidroesterificação enzimática de óleos de soja e de fritura em sistema de ultrassom**. 2015. 174 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.