



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

SÍNTESE DE PROPIONATO DE ISOAMILA POR LIPASE MICROBIANA

BELKIS CHALUP SILVEIRA ROESLER

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT

Orientador

PROF. DRA. DANIELE COLEMBERGUE DA CUNHA VANZIN

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

SÍNTESE DE PROPIONATO DE ISOAMILA POR LIPASE MICROBIANA

BELKIS CHALUP SILVEIRA ROESLER

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre  
em Engenharia Química

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT

Orientador

PROF. DRA. DANIELE COLEMBERGUE DA CUNHA VANZIN

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2016

### Ficha catalográfica

R718s Roesler, Belkis Chalup Silveira.  
Síntese de propionato de isoamila por lipase microbiana / Belkis  
Chalup Silveira Roesler. – 2016.  
73 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –  
FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Rio  
Rio Grande/RS, 2016.

Orientador: Dr. Carlos André Veiga Burkert.

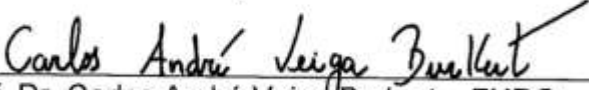
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Daniele Colemberque da Cunha Vanzin.

1. Ésteres de aroma 2. Esterificação 3. Síntese enzimática  
I. Burkert, Carlos André Veiga II. Vanzin, Daniele Colemberque da  
Cunha III. Título.

CDU 66.0


## APROVAÇÃO

Dissertação defendida pela Engenheira Química Belkis Chalup Silveira Roesler e aprovada em 30 de maio de 2016, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

  
Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert – FURG

  
Profa. Dra. Ana Paula Manera – UNIPAMPA

  
Profa. Dra. Susana Juliano Kalil – FURG

  
Profa. Dra. Janaina F. de Medeiros Burkert - FURG



## AGRADECIMENTOS

A Deus, que ilumina e guia meus passos, rege meus pensamentos e ações;

Aos meus pais Belkis e Valdir e ao meu irmão Ervino, pelo apoio, pelo orgulho, compreensão, incentivo permanente e, em especial, por todo amor;

Ao meu orientador André, pela paciência, orientação e ensinamentos;

À minha coorientadora Daniele, pela dedicação, pela força e principalmente pelo carinho na orientação;

Ao meu namorado Rodrigo, pela compreensão, carinho e apoio; estendo o agradecimento ao seu pai Vanderlei e a Sabrine, pela acolhida e carinho que recebi durante essa caminhada;

Ao meu afilhado Santiago, por todo carinho e amor que me reabasteciam a cada ida para casa;

Às minhas dindas Norma e Maninha, pelo carinho e pela oração constante;

Aos meus queridos colegas de laboratório, Bruno, Daniela, Renata, Carina, Liliane, Joice, Fernanda, Vanessa e também aos IC's, pelo agradável convívio e amizade, pelas discussões, sugestões, ajuda nos experimentos, paciência e por tudo o que aprendi ao longo deste trabalho;

Aos colegas de mestrado, Daniela, Samuel, Eduardo e Paola, que tive o prazer de conhecer no mestrado, pelos momentos de alegrias e angústias vividos principalmente no primeiro semestre;

Aos meus colegas do curso Formação Pedagógica, Saul, Daize, Cristina, Juliana e Ângelo, pela amizade e carinho que me fortaleceram durante estes últimos meses de mestrado;

À Islanda, pela paciência e atenção dispensada ao longo destes anos;

Ao meu grupo Semeadoras do Movimento de Emaús de Bagé, minhas anjinhas que estiveram em oração por mais esta conquista e aos meus amigos que de alguma forma me ajudaram nesta fase tão importante;

À LNF Latino Americana pelo fornecimento das enzimas;

À FAPERGS pela concessão de bolsa de mestrado para o desenvolvimento deste trabalho.

“A melhor maneira que a gente tem de fazer possível amanhã alguma coisa que não é possível de ser feita hoje, é fazer hoje aquilo que hoje pode ser feito. Mas se eu não fizer hoje o que hoje pode ser feito e tentar fazer hoje o que hoje não pode ser feito, dificilmente eu faço amanhã o que hoje também não pude fazer”.

Paulo Freire

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Ésteres de álcool isoamílico .....	8
<b>Tabela 2</b> - Coeficiente de partição de solventes comumente utilizados para sínteses orgânicas .....	10
<b>Tabela 3</b> - Limite de solventes permitidos para extração e processamento.....	11
<b>Tabela 4</b> - Percentual de esterificação para o butirato de isoamila em função do tempo. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima.....	22
<b>Tabela 5</b> - Percentual de esterificação para o acetato de isoamila em função do tempo. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima.....	24
<b>Tabela 6</b> - Percentual de esterificação para o propionato de isoamila em função do tempo. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima. ....	26
<b>Tabela 7</b> - Percentual de esterificação para o laurato de isoamila em função do tempo. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima.....	27
<b>Tabela 8</b> - Síntese de propionato de isoamila em diferentes equipamentos. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435). ....	29
<b>Tabela 9</b> – Síntese de propionato de isoamila com diferentes solventes. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435). ....	30
<b>Tabela 10</b> - Síntese de propionato de isoamila com a adição inicial de água. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435). ....	32
<b>Tabela 11</b> - Síntese de propionato de isoamila em diferentes temperaturas. Condições reacionais: 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435). ....	33



**Tabela 12** - Síntese de propionato de isoamila com diferentes razões molares (álcool:ácido).

Condições reacionais: 25°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435). ..... 35

**Tabela 13** - Síntese de propionato de isoamila com diferentes concentrações de ácido propiônico.

Condições reacionais: 25°C; 180 rpm; razão molar álcool:ácido 3:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435). ..... 36

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> - Fluxograma de etapas envolvidas no desenvolvimento da dissertação .....	<b>16</b>
---	-----------

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1. OBJETIVO GERAL.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
3.1. ENZIMAS .....	4
3.2. LIPASES .....	4
3.3. ÉSTERES DE AROMA .....	5
3.4. CONDIÇÕES DE REAÇÃO.....	9
3.4.1. Solvente .....	9
3.4.2. Temperatura.....	12
3.4.3. Água .....	12
3.4.4. Concentração de enzima e razão molar dos substratos.....	12
3.5. SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE AROMA .....	13
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
4.1. MATERIAIS .....	17
4.2. REAGENTES.....	17
4.2.1. Enzimas.....	17
4.2.2. Equipamentos.....	18
4.3. TESTES PRELIMINARES PARA SELEÇÃO DO BIOCATALISADOR E ÁCIDO CARBOXÍLICO.....	18
4.4. AVALIAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS PARA SÍNTESE.....	18
4.5. EFEITO DE DIFERENTES SOLVENTES NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	19
4.6. AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO INICIAL DE ÁGUA NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	19
4.7. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTERIFICAÇÃO .....	19
4.8. EFEITO DA RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÁCIDO NA ESTERIFICAÇÃO.....	19
4.9. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO NA ESTERIFICAÇÃO .....	19

4.10.	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	19
4.10.1.	<b>Determinação do teor de ácido residual e percentual de esterificação</b> .....	20
4.10.2.	<b>Determinação da atividade de esterificação</b> .....	20
4.11.	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS .....	21
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
5.1.	SELEÇÃO DO BIOCATALISADOR E ÁCIDO CARBOXÍLICO .....	22
5.2.	AVALIAÇÃO DO EQUIPAMENTO DE SÍNTESE ENZIMÁTICA.....	28
5.3.	EFEITO DOS SOLVENTES.....	29
5.4.	ADIÇÃO INICIAL DE ÁGUA .....	31
5.5.	TEMPERATURA.....	33
5.6.	RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÁCIDO .....	34
5.7.	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO .....	35
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	38
<b>7.</b>	<b>SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	40
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41
<b>ANEXO 1:</b>	Ficha de informação da enzima Lipozyme® RM IM.....	50
<b>ANEXO 2:</b>	Ficha de informação da enzima Lipozyme® 435 .....	53
<b>APÊNDICE A:</b>	Efeito de Diferentes Solventes na Reação de Esterificação – Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435). .....	56
<b>APÊNDICE B:</b>	Efeito da Adição Inicial de Água na Reação de Esterificação – Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).....	57
<b>APÊNDICE C:</b>	Efeito da Temperatura na Reação de Esterificação - Condições reacionais: 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).....	58
<b>APÊNDICE D:</b>	Efeito da Razão Molar Álcool:Ácido na Reação de Esterificação - Condições reacionais: 25°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435)...	59
<b>APÊNDICE E:</b>	Efeito da Concentração de Ácido Propiônico na Reação de Esterificação - Condições reacionais: 25°C; 180 rpm; razão molar álcool:ácido 3:1; 3 g.L <sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).....	60

## RESUMO

Ésteres de aroma são responsáveis pela fragrância e sabor característico de diversos produtos e são considerados ingredientes críticos, por que sem eles os produtos não teriam aceitação. Os ésteres de aroma são resultantes da reação direta de um álcool com um ácido carboxílico sob a ação de um catalisador em presença ou não de solvente. O uso de enzimas como catalisadores biológicos garantem ao aroma um caráter de produto natural, satisfazendo um público consumidor exigente por sustentabilidade, produtos naturais e livres de químicos. Neste contexto, o trabalho teve por objetivo sintetizar o éster propionato de isoamila, componente do aroma de frutas, aroma adocicado de amêndoas, aroma de cervejas e vinhos. A partir dos testes preliminares para a seleção do biocatalisador e do ácido carboxílico, foram obtidos percentuais máximos de esterificação para as enzimas Lipozyme® 435 e Lipozyme® RM IM na síntese de diferentes ésteres de isoamila, sendo, respectivamente: butirato de isoamila 82,9% (2 h) e 84,4% (6 h); acetato de isoamila 86,0% (2 h) e 90,5% (48 h); propionato de isoamila 86,5% (24 h) e 89,0% (24 h); laurato de isoamila 87,1% (2 h) e 85,4% (2 h). Na seleção do solvente para a síntese de propionato de isoamila por Lipozyme® 435, o uso do hexano resultou em um percentual de esterificação de 87,5% com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos outros solventes testados (acetona, metiletilcetona, éter dietílico, tolueno e heptano). A avaliação da adição inicial de água no sistema indicou que não se faz necessário um pré-tratamento dos reagentes para a remoção da água intrínseca. Entre as condições reacionais testadas, estabeleceu-se a temperatura de 25°C, razão molar álcool:ácido de 3:1 e uma concentração de ácido propiônico de 0,3 M, resultando em um percentual de esterificação de 95,2% em 24 h.

**Palavras-chave:** Ésteres de aroma, esterificação, síntese enzimática.

## ABSTRACT

Flavour esters are responsible for fragrance and characteristic flavor of several products and are considered critical ingredients, because without them the products would not have acceptance. Flavor esters are resulted from the direct reaction of an alcohol with a carboxylic acid under the action of a catalyst in the presence or absence of solvents. The use of enzymes as biocatalysts guarantees to flavour a classification of natural product, satisfying the demand of consumers for sustainability, natural products and chemical free. In this context, the study aimed to synthesize the ester isoamyl propionate, an aroma component of some fruits, almonds, beer and wine. From preliminary tests for the selection of the biocatalyst and the carboxylic acid, maximum percentages of esterification were obtained for the enzymes Lipozyme® 435 and Lipozyme® RM IM in the synthesis of different isoamyl esters, respectively: isoamyl butyrate 82.9% (2 h ) and 84.4% (6 h); isoamyl acetate 86.0% (2 h) and 90.5% (48 h); isoamyl propionate 86.5% (24 h) and 89.0% (24 h); isoamyl laurate 87.1% (2 h) and 85.4% (2 h). In the selection of the solvent for the synthesis of isoamyl propionate, hexane showed a percentage of esterification of 87.5% with significant difference ( $p < 0.05$ ) when compared with the other solvents (acetone, methyl ethyl ketone, diethyl ether, toluene and heptane). The evaluation of the initial addition of water in the system indicated that no pretreatment of the reactants is required for the removal of intrinsic water. Among the reaction conditions tested, it was established a temperature of 25°C, an alcohol:acid molar ratio of 3:1 and a concentration of propionic acid of 0.3 M, resulting in an esterification percentage of 95.2% in 24 h.

**Keywords:** Flavours esters, esterification, enzymatic synthesis.

## 1. INTRODUÇÃO

Novos métodos para produção de aromas naturais por rotas biotecnológicas foram desenvolvidos nos últimos anos, visto que estes bioprodutos são de grande importância industrial. O mercado mundial que abrange aromas, sabores e fragrâncias espera uma aceleração no consumo motivada por tendências do mercado consumidor, em um segmento dito atraente e promissor, atingindo um valor de mercado estimado superior a 30 bilhões de dólares no ano de 2017. Este mercado é dominado principalmente pelas indústrias de cosméticos e higiene pessoal, produtos de limpeza, alimentos e bebidas (AKACHA; GARGOURI, 2015; BNDES, 2014).

*Flavours* são definidos como qualquer substância perceptível aos sentidos do paladar e olfato. São aromas em alimentos, fragrâncias em cosméticos e fármacos, componentes críticos por determinarem as propriedades sensoriais e com isso a aceitação do produto final, podendo ser produzidos em condições reacionais brandas quando se utilizam biocatalisadores (IOFI, 2012; DE BARROS et al., 2012; SINGH; SAXENA; NAIK, 2014; BARÁNKOVÁ; DOHNAL, 2016).

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem uma classe importante de enzimas hidrolíticas. Compreendem um importante grupo de biocatalisadores aplicados em diversos processos biotecnológicos, sendo capazes de catalisar a hidrólise de cadeias longas de triacilgliceróis a diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol na interface óleo-água. Sua aplicação é relacionada com a sua especificidade pelo substrato. Também catalisam reações de esterificação e interesterificação como a acidólise (éster e um ácido), alcoólise (éster e um álcool) e transesterificação (GUMEL et al., 2011; RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009).

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e de micro-organismos, sendo que as últimas merecem destaque devido à maior estabilidade e especificidade quando comparadas às demais fontes. De maneira geral, as lipases não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH, são estáveis a altas temperaturas e possuem elevada especificidade e enantiosseletividade, fazendo com que sejam facilmente controladas e aplicáveis em diversos processos industriais (VERMA; THAKUR; BHATT, 2012; MESSIAS et al., 2011).

As demais reações catalisadas pelas lipases (interesterificação, alcoólise, acidólise, dentre outras) não possuem tanto destaque quanto a esterificação e a transesterificação,

sendo estas importantes industrialmente, em função das inúmeras aplicações (RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009; REINEHR et al., 2014). Em relação aos *flavours*, as lipases podem ser utilizadas na síntese enzimática de diversos ésteres componentes de aroma, tais como etil, isobutil, amil e isoamil acetatos (VERMA; THAKUR; BHATT, 2012), entre outros.

Ésteres de aroma são formados a partir da reação de esterificação direta de um ácido carboxílico com um álcool na presença de um catalisador, o qual define sua rota, seja química ou enzimática, e com a opção da reação ser realizada na presença (ou não) de solvente orgânico. Um dos produtos da reação é a água, a qual necessita ser controlada para evitar a ocorrência da reação inversa, a hidrólise (MACEDO; PASTORE, 1997).

Como a reação ocorre de maneira lenta, o emprego das lipases aumenta a velocidade da reação. Desta forma, a concentração ótima de água no meio reacional deve ser relativamente baixa a fim de minimizar a formação de produtos indesejáveis, mas deve ser suficiente para que a enzima permaneça ativa. Ainda, destaca-se que a temperatura, a razão molar dos substratos, a quantidade de enzima e água adicionada influenciam na velocidade de reação de esterificação (MARTINS, 2012). A reação de esterificação é facilitada em solventes orgânicos, tendo como vantagens a dissolução dos compostos hidrofóbicos e o deslocamento do equilíbrio termodinâmico para a síntese, já que a água, que favorece a reação de hidrólise, está presente em quantidades muito reduzidas (MARTINS et al., 2014; GUMEL et al., 2011; RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009; KUMAR et al., 2006).

Por outro lado, poucos trabalhos na literatura abordam a produção do éster propionato de isoamila, componente de aromas de damasco e abacaxi, também do adocicado de amêndoas, bem como de algumas bebidas alcoólicas (KRISHNA; KARANTH, 2002).

Neste contexto, este trabalho aborda a síntese de ésteres de isoamila, componentes de aromas ditos naturais, por via enzimática, com ênfase na síntese de propionato de isoamila, avaliando diferentes fatores que possam influenciar o desempenho da enzima.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo principal sintetizar o éster propionato de isoamila, resultante da reação do ácido propiônico e álcool isoamílico, utilizando lipases microbianas comerciais como catalisador, em sistema com a presença de solvente orgânico, avaliando a influência de diferentes parâmetros reacionais na esterificação.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar diferentes lipases comerciais e substratos para a síntese de ésteres de isoamila, a fim de selecionar um sistema reacional e um biocatalisador para estudo;
- Selecionar o solvente orgânico apropriado para o sistema reacional em estudo;
- Avaliar o efeito da adição de água no meio reacional;
- Estabelecer temperatura, razão molar álcool:ácido e concentração de ácido no meio reacional a fim de se obter o máximo percentual de esterificação.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos de diversos processos, atuando em organizadas sequências, catalisando etapas de degradação das moléculas, reações que conservam e transformam energia química e também as que constroem macromoléculas biológicas. Tratam-se de grandes moléculas de proteínas que, como outros tipos de catalisadores, não são necessárias em grandes quantidades para tornarem-se efetivas (POTTER; HOTCHKISS, 2007; NELSON; COX, 2013).

O sítio ativo de uma enzima é uma região tridimensional formada por diferentes grupamentos da estrutura primária da enzima que se ligam aos substratos e cofatores a fim de promover a quebra ou gerar novas ligações (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). A catálise ocorre a partir da diminuição da energia de ativação do sistema gerando assim um aumento na velocidade de reação. Parte desta energia origina-se de ligações fracas do substrato com a enzima, como ligações de hidrogênio, interações iônicas e também hidrofóbicas (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Enzimas imobilizadas são utilizadas para uma maior estabilidade e facilidade na separação do meio de reação gerando uma economia nos custos do processo. Apresenta como vantagens o aproveitamento da atividade catalítica por um maior período de tempo, operação em modo contínuo possibilitando um maior controle das variáveis do sistema, facilidade de separação catalisador-produto, redução do volume de reação, possibilidade de alteração das propriedades catalíticas da enzima (garantia de estabilidade de parâmetros como pH e temperatura, redução dos efeitos de inibição substrato–produto) e possibilidade de uma interrupção na reação quando determinada conversão é atingida. Como desvantagens ou limitação das enzimas imobilizadas têm-se a perda de atividade que pode ser provocada durante o processo de imobilização e características físicas do biocatalisador (substrato solúvel ou não) (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

#### 3.2. LIPASES

As lipases são enzimas ativas classificadas como hidrolases utilizadas em reações que envolvem óleos e gorduras como a hidrólise de óleos a ácidos graxos (PICO et al.,2016; SATYARTHI; SRINAVAS; RATNASAMY, 2011); como também em reações reversas

como esterificação (LI et al., 2015; PÖHNLEIN et al., 2014; ABDULMALEK et al., 2012; GUMEL et al., 2011; ARAGÃO et al., 2011; ARAGÃO et al., 2009) e transesterificação (WONG et al., 2015; LOPRESTO et al., 2015; MOHAMMADI et al., 2015), dentre outras. São catalisadores versáteis e muito eficientes, tendo uma posição de destaque devido à gama de reações catalisadas por estas enzimas em sistemas orgânicos e com baixo conteúdo de água (VILLENEUVE, 2007).

De maneira natural são encontradas em tecidos e secreções de animais e vegetais, podendo também ser produzidas por cultivos empregando micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras. As espécies de fungos tem seu cultivo preferencial em meios sólidos (cultivo em superfície), enquanto leveduras e bactérias são cultivadas em meio líquido (cultivo submerso) (MACEDO; PASTORE, 1997; TREICHEL et al., 2010; RIGO et al., 2010).

O uso biotecnológico das enzimas deve-se às inúmeras vantagens, como estabilidade em solventes orgânicos, sua larga especificidade pelo substrato, alta enantiosseletividade (síntese quiral), formação de produtos puros, condições amenas de pH e temperatura. Nas reações de catálise, as lipases têm como função a quebra das ligações de triacilgliceróis, na hidrólise; e, na reação inversa, esterificação em condições microaquosas (STERGIOU et al., 2013; COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; VERMA; THAKUR; BHATT, 2012; JAEGER; EGGERT, 2002).

Lipases de origem microbiana são mais amplamente utilizadas na indústria por apresentarem uma produção em menor tempo, por serem de fácil manipulação genética, por proporcionar um aumento na escala de produção e purificação e por sua especificidade e estabilidade (REINEHR et al., 2014). Lipases comerciais como Novozym® 435 (BANSODE; RATHOD, 2014; MARTINS et al., 2014; MARTINS et al., 2013; MARTINS et al., 2011; TAMALAMPUDI et al., 2008; ROMERO et al., 2005; GÜVENÇ; KAPUCU; MEHMETOGLU, 2002) e Lipozyme® RM IM (MARTINS et al., 2014; ARAGÃO et al., 2009; ARAGÃO et al., 2011; GÜVENÇ; KAPUCU; MEHMETOGLU, 2002) são amplamente utilizadas para síntese de ésteres.

### 3.3. ÉSTERES DE AROMA

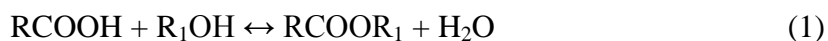
Ésteres de aroma são de grande importância na indústria devido à fragrância e sabor característicos. São responsáveis pela formação e acentuação de aromas nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica (SINGH; SAXENA; NAIK, 2014; KHAN; RATHOD,

2015). Os aromas são responsáveis pela identidade de determinado produto e podem ser considerados como ingredientes críticos pelo simples motivo de que, sem a adição destes, os produtos não teriam aceitação. Outros compostos orgânicos, assim como os ésteres, podem ser utilizados como componentes de aroma, como cetonas, álcoois, aldeídos, éteres de fenóis, dentre outros (AKACHA; GARGOURI, 2015; DE BARROS et al., 2012; MACEDO; PASTORE, 1997).

Os aromas, conforme a *International Organization of the Flavor Industry – IOFI* (2012), são definidos como qualquer material perceptível principalmente pelos sentidos do paladar e do olfato. A indústria alimentícia sofre grande influência por parte de consumidores que buscam conhecimento sobre as características nutricionais dos alimentos e também dos aditivos que neles são empregados. Bioaromas, portanto, são preferidos pelo mercado consumidor, visto que agregam valor ao produto, fazendo com que o custo da biocatálise passe a ter um custo final menos significativo (MACEDO; PASTORE, 1997).

A indústria de cosméticos busca novas alternativas às rotas químicas visando o enfoque na segurança ambiental, sustentabilidade e também pela maior consciência por parte dos consumidores sobre produtos naturais e livres de químicos. Os produtos abrangidos por estas indústrias são necessários aos seus consumidores de diferentes faixas etárias e condições econômicas para consumo diário, como produtos de higiene pessoal, cuidados com o cabelo e maquiagem (KHAN; RATHOD, 2015).

Ésteres são compostos orgânicos sintetizados através de reação de esterificação de um ácido carboxílico e um álcool. A reação de esterificação é direta (Equação 1), podendo ser catalisada ou até mesmo espontânea, dependendo das condições de temperatura, acidez do ácido envolvido e da miscibilidade dos reagentes.



Essa reação comumente produz moléculas voláteis como água e álcoois de baixa massa molar, podendo ser utilizado o excesso de algum dos reagentes para o deslocamento do equilíbrio ou a água pode ser removida por processos como adsorção, destilação, uso de agentes secantes ou membranas seletivas à água.

O grau de esterificação é dependente das condições ao qual o sistema reacional está submetido, visto que a reação inversa à esterificação – a hidrólise - é determinada pelo conteúdo de água presente. Faz-se, assim, o uso de solventes orgânicos para aumentar a

solubilidade de substratos hidrofóbicos, impedindo a hidrólise e favorecendo a esterificação (RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009; GUMEL et al., 2011).

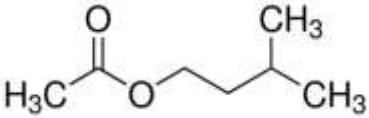
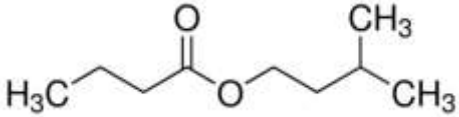
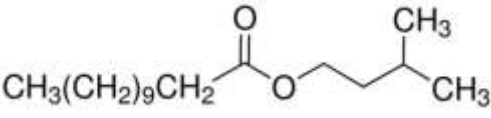
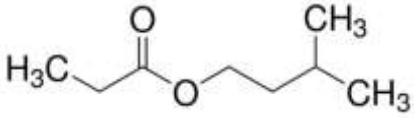
A rota de síntese química do éster é considerada uma prática comum nas indústrias, onde o produto gerado é classificado como éster de aroma artificial, e cuja produção utiliza catalisadores inorgânicos, temperaturas elevadas e pressão reduzida. Tais condições geram um alto custo de produção, a formação de subprodutos indesejáveis e o éster obtido como produto final é heterogêneo (devido a diferenças no grau de esterificação e do posicionamento do grupo acila) (MARTINS et al.; 2014; FERRER et al., 2005).

A síntese biotecnológica apresenta como base o uso de enzimas, oriundas de bactérias, fungos ou leveduras utilizados como reagentes ou agentes catalíticos. Oferece um alto rendimento em comparação com a síntese química e acelera as reações em até  $10^8$ - $10^{15}$  vezes. Requer condições moderadas para reação como meios de temperaturas entre 40°C e 60°C e pH entre 5 e 8. Algumas enzimas atuam em meio aquoso e apresentam elevado grau de seletividade, o que aumenta seu potencial de uso e reduz o consumo de energia durante o processo. O produto, assim gerado, é classificado como éster de aroma natural (GUMEL et al., 2011; BON; FERRARA; CORVO, 2008; AKACHA; GARGOURI, 2015; EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2010).

Álcool isoamílico (3-metil-1-butanol), também conhecido como álcool isopentílico, isobutil carbinol e álcool isoamílico primário, trata-se de um álcool precursor de ésteres de aroma para a indústria de alimentos, de perfumes e cosmética, sendo utilizado como solvente na extração de compostos farmacológicos bem como para produção de ésteres lubrificantes. Como alternativa ao álcool isoamílico, este pode ser obtido de um resíduo denominado óleo fúsel. Óleo fúsel se trata de um resíduo das destilarias de etanol, constituído por uma mistura de álcoois superiores, classificados como congêneres da fermentação alcoólica, retirados da coluna de retificação onde tende a se acumular. Também por estes álcoois serem obtidos da fermentação da cana-de-açúcar, podem ser considerados como naturais, garantindo alto valor agregado ao produto (DE TEVES, 2003; FERREIRA; MEIRELLES; BATISTA, 2013).

Dos ésteres produzidos da reação com álcool isoamílico, muitos deles já tiveram sua síntese estudada. Na Tabela 1, estes são descritos e definidos conforme sua ocorrência, bem como os trabalhos reportados na literatura.

**Tabela 1** - Ésteres de álcool isoamílico.

Éster de Isoamila	Ocorrência	Referências
 <p>Acetato de Isoamila</p>	Aroma de banana	Romero et al. (2005) da Silva (2014)
 <p>Butirato de Isoamila</p>	Característico do aroma de pêra	Aragão et al. (2009) Anschau et al. (2011)
 <p>Laurato de Isoamila</p>	Compõe o aroma de banana, aromas doces, de queijo e de bebidas alcoólicas	Varma; Madras (2007)
 <p>Propionato de Isoamila</p>	Presente no aroma de cervejas e vinhos, compõe formulações de aroma de damasco e abacaxi, também o adocicado de amêndoas	Krishna; Karanth (2002) Leyva et al. (2015)

Ésteres derivados de cadeias curtas como acetatos, butiratos e propionatos apresentam baixa massa molar e representam uma boa parte dos aromas por caracterizar aromas frutados e fragrâncias (MACEDO; PASTORE, 1997).

### 3.4. CONDIÇÕES DE REAÇÃO

O estudo de determinadas variáveis do processo se torna importante para que a estabilidade do sistema não venha a ser afetada. Fatores como solvente, temperatura, água, concentração de enzima e razão molar álcool:ácido são importantes. Nenhuma destas propriedades individualmente é responsável pelas funções enzimáticas, em muitos casos várias destas devem ser consideradas (ZHAO et al., 2009).

#### 3.4.1. Solvente

O uso de solventes orgânicos para reações catalisadas por enzimas apresenta como vantagem o deslocamento do equilíbrio termodinâmico da reação favorecendo a síntese com uma maior solubilidade dos produtos de interesse (FERNANDES, 2002). É de fundamental importância na síntese catalisada por lipases, pois se faz necessária à escolha de um solvente capaz de dissolver suficientemente ambos os substratos envolvidos. Este também não deve afetar a estabilidade e a atividade da enzima (GUMEL et al., 2011).

O coeficiente de partição de um solvente, Log P, está associado à hidrofobicidade do mesmo, podendo ser usado como indicador quantitativo da sua polaridade. Refere-se ao coeficiente de partição de um soluto em um sistema bifásico de octanol e água determinado a partir das concentrações de ambas as fases no equilíbrio. Existe uma correlação entre a atividade da enzima e a polaridade do solvente orgânico, pela habilidade deste em afetar a camada de água que estabiliza o biocatalisador (LAANE et al., 1987). Os solventes que menos afetam a atividade enzimática são os mais hidrofóbicos, por não interagirem com a água necessária para manter a enzima ativa, enquanto que os solventes mais hidrofílicos tendem a retirar a água da camada proteica, ocasionando a perda da atividade enzimática (DE PAULA; BARBOSA; DE CASTRO, 2005).

De fato, a preferência é por solventes inofensivos em que a enzima permaneça ativa e que não seja desativada rapidamente. Geralmente, para o caso de reações catalisadas por lipases, solventes com  $\text{Log P} > 3$  são utilizados, como n-hexano e n-heptano, por exemplo. Eles, porém, não são apropriados para reações que envolvem dois substratos de polaridades diferentes, como no caso da síntese de ésteres de açúcar, onde uma molécula hidrofílica de açúcar é combinada com uma lipofílica de ácido graxo. A solubilidade do açúcar neste meio é quase nula (VILLENEUVE, 2007).

Na Tabela 2, estão os solventes mais empregados para reações de esterificação catalisadas por lipases.

**Tabela 2** - Coeficiente de partição de solventes comumente utilizados para sínteses orgânicas.

<b>Solvente</b>	<b>Log P</b>
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-1,3
Acetonitrila	-0,33
Acetona	-0,23
Metiletilcetona (Butanona)	0,29
Éter dietílico	0,71
Diclorometano	1,25
Clorofórmio	2,0
Tolueno	2,5
Hexano	3,5
Heptano	4,0

Fonte: LAANE et al. (1987)

A ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, na resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, sobre aditivos aromatizantes e quanto ao uso de solvente de extração e processamento de alimentos, fixa a concentração máxima limite dos seguintes solventes no produto final (Tabela 3).



**Tabela 3** - Limite de solventes permitidos para extração e processamento.

<b>Solvente</b>	<b>Concentração máxima (mg.Kg<sup>-1</sup>)</b>
Acetato de etila	10,0
Acetona	2,0
Butano	1,0
1-Butanol	1,0
Ciclohexano	1,0
Diclorometano	0,1
Dióxido de carbono	Limite não especificado
Éter de petróleo	1,0
Éter dibutílico	2,0
Éter dietílico	2,0
Éter metil terc-butílico	2,0
Etilmetilcetona	1,0
Hexano	1,0
Isobutano	1,0
Metanol	10,0
Propano	1,0
Tolueno	1,0

Fonte: ANVISA (2007)

### 3.4.2. Temperatura

A temperatura afeta a reação nos seguintes parâmetros: uma influência direta na velocidade de reação, na posição do equilíbrio, na estabilidade da enzima e na solubilidade dos reagentes e dos produtos. Quando submetidas a altas temperaturas, provoca-se uma diminuição significativa na atividade enzimática devido à desnaturação (STERGIOU et al., 2013; GUMEL et al., 2011).

Empiricamente, a temperatura na qual as lipases apresentam atividade encontra-se numa faixa de 30°C a 80°C. O ótimo de temperatura depende de outros fatores da reação como comprimento da cadeia das moléculas de ácido graxo (GUMEL et al., 2011). Para as lipases comerciais Lipozyme<sup>®</sup> 435 e Lipozyme<sup>®</sup> RM IM as temperaturas estudadas na literatura variam entre 30°C e 60°C (MARTINS et al., 2014; BANSODE; RATHOD, 2014; ARAGÃO et al., 2009; ROMERO et al., 2005; GÜVENÇ; KAPUCU; MEHMETOGLU, 2002).

### 3.4.3. Água

A água é um fator necessário na esterificação para a estabilidade e hidratação da enzima (influencia na flexibilidade da proteína), para promover a conformação correta da enzima, permitindo que o sítio catalítico fique ativo, e também para a atividade enzimática (a água presente dentro da enzima catalisadora é mais importante que a água do sistema quando se tratando da atividade enzimática). Um excesso de água na enzima provoca aumento na camada de água em torno de sua molécula, podendo ocasionar problemas de difusão limitada de entrada em substratos ou produtos liberados. Seu acúmulo na reação pode vir a deslocar o equilíbrio da reação no sentido de uma hidrólise, isto é, provocar a reação inversa à esterificação (GUMEL et al., 2011; WANG et al., 2016).

A água também é um produto da reação. Embora sua concentração seja muito baixa em sistemas enzimáticos em meio orgânico, pequenas variações da quantidade de água podem provocar grandes modificações na atividade da enzima. A diminuição da atividade pode vir a ocorrer devido às limitações à transferência de massa motivada pelo transporte do substrato através de uma fase aquosa ou de uma agregação das partículas de catalisador (AIRES-BARROS, 2002).

### 3.4.4. Concentração de enzima e razão molar dos substratos

Um aumento na quantidade de enzima afeta positivamente a velocidade de reação, sendo que a velocidade da reação aumenta com o aumento da concentração do catalisador até um determinado nível em que estabiliza. Porém, em uma concentração muito elevada, a conversão não apresenta um aumento muito claro. Este fato pode estar associado à dificuldade de manter a suspensão do biocatalisador uniforme (para enzimas imobilizadas), bem como pode ocorrer captura de água livre pelo suporte da enzima, acarretando uma inativação enzimática. Ainda, se o rendimento da reação já for elevado, um novo incremento na quantidade de catalisador não proporcionará um significativo aumento da conversão final. É importante que sejam atingidas altas taxas de conversão com uma menor quantidade de enzima, visto que em reações com enzimas um fator importante é seu alto custo (LAMIN, 2006; MARTINS et al., 2014).

As razões molares dos dois substratos participantes da reação influenciam significativamente a reação por que a solubilidade de um dos substratos pode provocar a dissolução do outro afetando a polaridade da reação (GUMEL et al., 2011).

### 3.5. SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE AROMA

Martins et al. (2014) compararam o desempenho de lipases comerciais imobilizadas (Novozym® 435, Lipozyme® TL IM e Lipozyme® RM IM) na síntese de diferentes ésteres de aroma utilizando como substratos os ácidos acético, propiônico e butírico com etanol, álcool isopropílico, butanol ou pentanol. A enzima Novozym® 435 foi a mais eficaz na maioria das reações, perdendo na síntese do butirato de etila para a Lipozyme® RM IM. As reações com o ácido butírico obtiveram as maiores taxas de conversão. Através da otimização, rendimentos maiores que 90% foram obtidos para as três enzimas testadas. Novozym® 435 manteve sua atividade superior a 80% em 5 vezes de reuso, a Lipozyme® RM IM também 5 vezes e Lipozyme® TL IM apenas 3 vezes.

Kuperkar et al. (2014) estudaram o efeito da temperatura na síntese do propionato de isobutila em sistema livre de solvente com a enzima Novozym 435, variando-a de 30°C para 50°C e mantendo os outros parâmetros constantes. A conversão máxima obtida de 92,5% na temperatura de 40°C em meio contendo 5% de enzima, razão molar álcool: ácido de 3:1 e 300 rpm de agitação.

Da Silva (2014) otimizou a produção enzimática do acetato de isoamila avaliando a concentração de enzima, razão molar álcool:ácido, cinética da reação e ciclo de reutilização de enzima comercial (Novozym® 435) e o efeito das peneiras moleculares em sistema livre

de solvente orgânico. Como resultados, obteve conversões superiores a 90%, após 3 h de reação nas condições de 30°C, razão molar ácido:álcool de 1:5 e com 15% em massa de enzima. Estudando o reuso da enzima, obteve conversões superiores a 83% para 10 ciclos reacionais.

Aragão et al. (2011) sintetizaram o éster butirato de etila com a enzima Lipozyme® RM IM e n-heptano como solvente. Utilizaram um planejamento experimental para estabelecer a ótima condição de esterificação, temperatura, razão molar e concentração dos substratos. Um percentual de esterificação de 88% foi obtido em 3 h de reação para um sistema a 45°C, concentração da enzima Lipozyme® RM IM de 7,7 g.L<sup>-1</sup>, concentração de ácido butírico de 90 mM e razão molar ácido butírico:etanol de 1:1.

Varma e Madras (2010) investigaram a reação de esterificação do ácido propiônico com três diferentes álcoois (álcool isopropílico, álcool isobutílico e álcool isoamílico) em dióxido de carbono supercrítico com cinco diferentes enzimas (Novozym® 435, Lipolase® 100T, lipase de *Candida rugosa* e duas lipases extraídas de pâncreas suíno de diferentes fornecedores). O uso da enzima Novozym® 435 mostrou-se mais eficaz que as demais enzimas, e a esterificação se mostrou mais rápida com os álcoois primários, como o álcool isobutílico e o isoamílico. A taxa de conversão diminuiu com o aumento da cadeia, sendo assim a conversão com o álcool isobutílico foi maior que com o álcool isoamílico.

Aragão et al. (2009) estudaram a síntese do éster butirato de isoamila utilizando as lipases microbianas Lipozyme® TL IM imobilizada em sílica e Lipozyme® RM IM imobilizada em resina aniônica. Testaram diversos solventes e a adição de água no sistema. Como resultado, uma esterificação de 80% foi obtida em 48 h nas condições de 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima Lipozyme® TL IM a 30°C, 180 rpm de agitação, razão molar álcool: ácido de 1:1 e concentração de ácido de 0,06 M. O solvente selecionado para o sistema foi o n-hexano. A adição de água no sistema reacional também foi avaliada, onde com um aumento da quantidade de água (30 µL para 70 µL) a porcentagem de esterificação máxima decresceu de 83% para 72%.

Romero et al. (2005), no estudo da síntese do acetato de isoamila em hexano, avaliaram as variáveis operacionais e o efeito da inibição de reagentes e produtos. Determinaram o efeito do pH sobre a atividade da enzima Novozym® 435, mostrando uma forte influência deste parâmetro, diminuindo a atividade enzimática em até 3 vezes quando a variação do pH se deu de 7,7 a 3,5; sendo 7,7 o pH ótimo para esta enzima. Para esterificação, a máxima conversão de 100% foi obtida nas primeiras 3 h de reação, onde a taxa de formação do éster foi elevada, na temperatura de 37°C e 200 rpm de agitação.

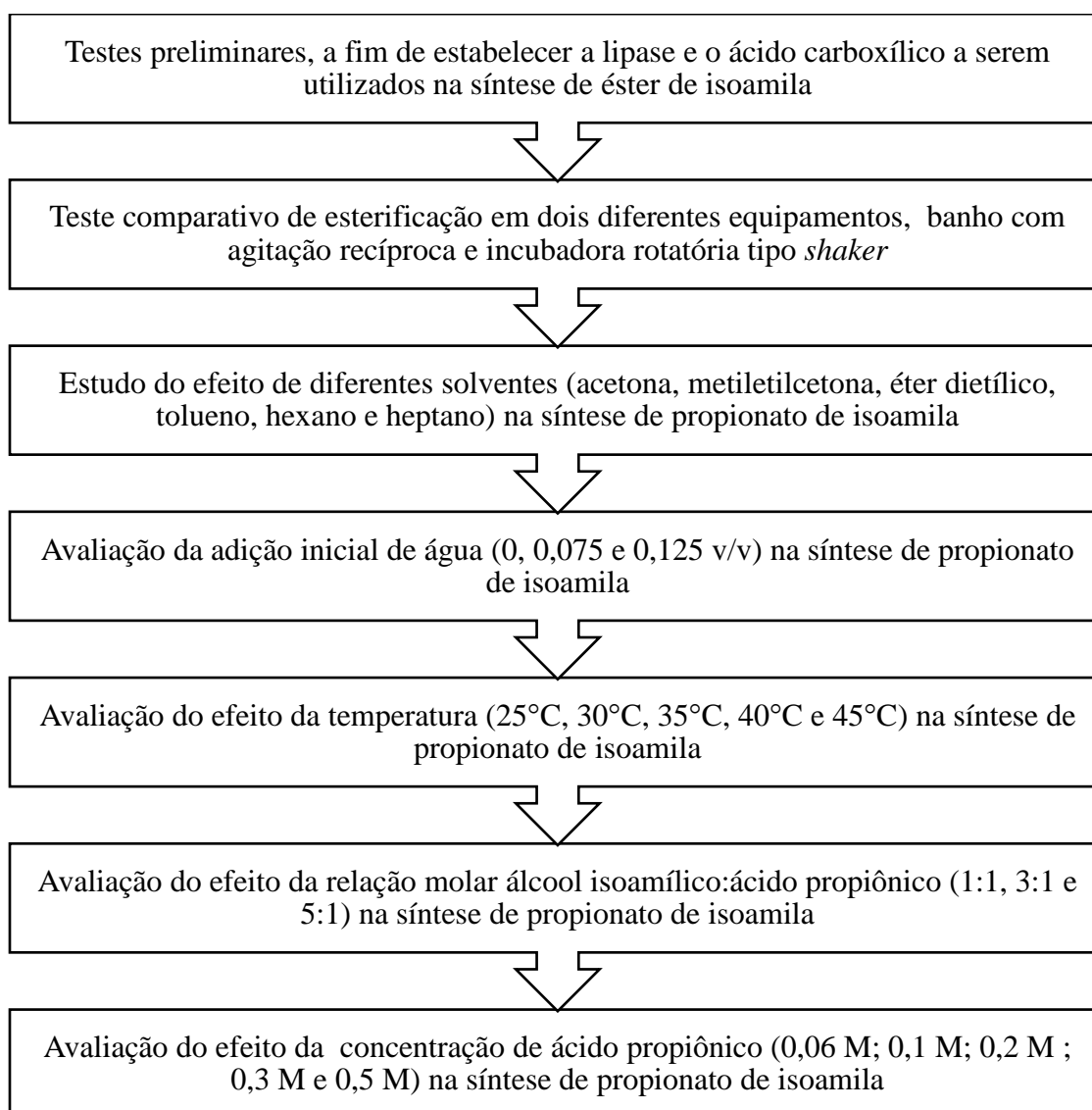
Varma e Madras (2007) estudaram a esterificação do ácido esteárico e ácido láurico com álcool isoamílico na presença de dióxido de carbono supercrítico. Investigaram diversos parâmetros que influenciam a síntese utilizando três diferentes lipases (Novozym® 435, Lipolase® 100T e lipase de *Candida rugosa*). Foi obtida conversão máxima com a enzima Novozym® 435, de 37% para o laurato de isoamila e 53% para o estearato de isoamila. A faixa de temperatura ótima para todas as enzimas foi 40-45°C e ambas as cinéticas mostraram máxima conversão entre 2 e 3 h. Quanto ao estudo da influência da água, seu excesso reduziu a conversão e o excesso de álcool não a reduziu.

Krishna e Karanth (2002) realizaram um estudo para determinar as influências de variáveis sobre o rendimento da síntese do éster propionato de isoamila, bem como uma otimização utilizando a metodologia de superfície de resposta. No estudo para a síntese de propionato de isoamila utilizando a lipase Lipozyme® IM 20, de *Rhizomucor miehei*, um percentual de esterificação máximo de 93% foi atingido para uma relação de 24 g.mol<sup>-1</sup> enzima-substrato, concentração de substrato de 1,5 M (concentração considerada elevada) para uma razão álcool:ácido de 2:1 em um tempo de 24 h. Concluiu-se também que a solubilidade do álcool isoamílico em água minimizou o acúmulo desta sobre a superfície da enzima conduzindo a mais elevada conversão.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Um fluxograma demonstrando as etapas do estudo proposto está apresentado na Figura 1.

**Figura 1** - Fluxograma de etapas envolvidas no desenvolvimento da dissertação.



#### 4.1. MATERIAIS

#### 4.2. REAGENTES

Os reagentes utilizados para as sínteses de ésteres de aroma estão listados a seguir:

- Acetona (Synth, Brasil);
- Ácido acético (Proquimios, Brasil)
- Ácido butírico (Merck, Brasil);
- Ácido láurico (Dinâmica, Brasil);
- Ácido propiônico (Mallinckrodt Chemicals, Estados Unidos);
- Álcool etílico absoluto (Synth, Brasil);
- Álcool isoamílico (Synth, Brasil);
- Éter dietílico (Dinâmica, Brasil);
- Fenolftaleína 1%;
- Heptano (Synth Brasil);
- Hexano (Synth, Brasil);
- Hidróxido de potássio (Vetec, Brasil);
- Metiletilcetona (Vetec, Brasil);
- Sulfato de magnésio (Synth, Brasil);
- Tolueno (Synth, Brasil).

##### 4.2.1. Enzimas

Foram utilizados como biocatalisador para os experimentos as enzimas Lipozyme® RM IM e Lipozyme® 435, fabricadas pela Novozymes e gentilmente fornecidas pela LNF Latino Americana (Bento Gonçalves, RS – Brasil).

A lipase Lipozyme® RM IM (Anexo 1) é uma enzima comercial imobilizada em resina de troca aniônica e produzida por cultivo submerso do fungo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado, onde o micro-organismo doador do gene que produz a lipase é *Rhizomucor miehei*. Lipozyme® 435 (Anexo 2) trata-se de uma lipase de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica, recombinante, expressa em *Aspergillus niger*, conforme o fabricante.

#### 4.2.2. Equipamentos

Foram utilizados dois equipamentos para a realização da síntese, o banho com agitação recíproca (Banho Dubnoff Tecnal TE-053, Brasil) e a incubadora rotatória tipo *shaker* (incubadora com agitação orbital Tecnal TE 420, Brasil).

#### 4.3. TESTES PRELIMINARES PARA SELEÇÃO DO BIOCATALISADOR E ÁCIDO CARBOXÍLICO

Para esta etapa foi utilizado o solvente n-hexano, que apresenta log P 3,5, sendo citado na síntese de diferentes ésteres (CHOWDARY; RAMESH; PRAPULLA, 2000; KRISHNA et al., 2001; SHIH et al., 2007).

Para a seleção do biocatalisador mais apropriado foram realizados ensaios preliminares com duas enzimas comerciais, sendo elas: Lipozyme® RM IM e Lipozyme® 435.

Estas duas enzimas foram utilizadas na síntese de ésteres de isoamila, utilizando-se ácidos de diferentes tamanhos de cadeia a fim de selecionar um para o estudo. Os ácidos estudados foram os ácidos acético, butírico, propiônico e láurico, a fim de obter acetato, butirato, propionato e laurato de isoamila, respectivamente.

A síntese dos ésteres foi realizada através da metodologia para reações de esterificação descrita por Aragão et al. (2009), utilizando frascos de vidro (100 mL) com 40 mL de volume útil contendo ácido na concentração de 0,06 M, razão molar álcool: ácido 1:1 e quantidade de enzima definida em 3 g.L<sup>-1</sup>. A temperatura indicada para o processo foi de 30°C, em banho com agitação recíproca, a 180 rpm, por um período que variou de 6 a 48 h, dependendo da síntese.

#### 4.4. AVALIAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS PARA SÍNTESE

Um estudo comparativo entre dois equipamentos foi realizado, pelo fato de ter sido necessária a substituição do equipamento inicialmente utilizado. Foram comparados o banho com agitação recíproca e a incubadora rotatória tipo *shaker* nas condições reacionais propostas por Aragão et al. (2009) com a enzima e o ácido carboxílico selecionados no item 4.3.



#### 4.5. EFEITO DE DIFERENTES SOLVENTES NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

O efeito dos solventes foi avaliado utilizando-se as mesmas condições reacionais propostas por Aragão et al. (2009), utilizando-se diferentes tipos de solventes: acetona, metiletilcetona, éter dietílico, tolueno, hexano e heptano, em equipamento estabelecido no item 4.4.

#### 4.6. AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO INICIAL DE ÁGUA NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

Com o solvente selecionado, para a avaliação da influência da adição de água no início da reação, primeiramente as soluções de ácido e álcool diluídas em solvente foram tratadas com sulfato de magnésio anidro ( $MgSO_4$ ), com o objetivo de eliminar possíveis vestígios de água presente nas soluções (WANG et al., 2016). Foram realizados ensaios com adição inicial de 0, 0,075 e 0,125% v/v de água, comparando com o ensaio sem a adição de água e sem o tratamento dos reagentes. O sistema de reação e as condições foram as mesmas dos itens anteriores.

#### 4.7. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTERIFICAÇÃO

A fim de avaliar o efeito da temperatura na reação de esterificação, foram testadas as temperaturas de 30°C (adotada até esta etapa), 25°C, 35°C, 40°C e 45°C.

#### 4.8. EFEITO DA RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÁCIDO NA ESTERIFICAÇÃO

Com a melhor temperatura de síntese selecionada, foram testadas diferentes razões molares álcool isoamílico : ácido propiônico. As relações estudadas foram: 1:1 (adotada nas etapas anteriores do estudo), 3:1 e 5:1.

#### 4.9. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO NA ESTERIFICAÇÃO

Diferentes concentrações de ácido propiônico foram testadas a fim de estabelecer a melhor condição: 0,06 M (adotada até esta etapa), 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M e 0,5 M.

#### 4.10. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

O acompanhamento dos experimentos foi realizado com a coleta de alíquotas de 1 mL em intervalos de tempo pré-definidos para determinação do grau de esterificação ao longo do tempo de reação.

#### 4.10.1. Determinação do teor de ácido residual e percentual de esterificação

O teor de ácido foi determinado através da titulação de 1 mL de alíquota, previamente pesada, nos diferentes tempos de síntese, sendo diluída em 10 mL de etanol contendo 0,1% de fenolftaleína e tituladas com KOH 0,02 N previamente padronizado (ARAGÃO et al., 2011).

A determinação do percentual de ácido foi realizada a partir da Equação 4.1, adaptada de AOCS (1998).

$$C (\%) = \frac{V \cdot N \cdot MM}{10 \cdot W} \quad (4.1)$$

onde  $C$  é o percentual de ácido carboxílico,  $V$  é o volume de KOH gasto na titulação,  $N$  é a normalidade do KOH,  $MM$  é a massa molar do ácido carboxílico e  $W$  a massa correspondente a 1 mL de amostra retirada para titulação.

O percentual de esterificação foi expresso em percentual molar do ácido consumido, Equação 4.2, segundo Oliveira et al. (2000).

$$\text{Percentual de esterificação (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (4.2)$$

onde  $C_0$  é concentração inicial dos ácidos residuais livres no tempo 0 h, e  $C$  é a concentração dos ácidos residuais livres em um determinado tempo  $t$ .

#### 4.10.2. Determinação da atividade de esterificação

As determinações das atividades de esterificação foram realizadas de acordo com a metodologia adotada por Rizzardi (2012).

A atividade de esterificação foi quantificada através da reação de síntese do ácido oleico e etanol na razão molar de 1:1 (mistura padrão). A reação foi conduzida em frascos Erlenmeyer contendo 5 mL da mistura padrão e aproximadamente 0,1 g da

enzima, sendo estes incubados em banho a 40°C por 40 min e agitação de 160 rpm. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional e adicionadas a 20 mL de um solução de acetona:etanol (1:1) para paralisar a reação. Após, a quantidade de ácido oleico consumido foi determinada através da titulação com NaOH 0,035M até atingir o pH 11,0. Os ensaios em branco foram feitos adicionando-se 20 mL da solução de acetona-etanol (1:1) e 500 µL da mistura padrão.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto e calculada utilizando a Equação 4.2.

$$AE = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 1000 \cdot Vf}{t \cdot m \cdot Vc} \quad (4.2)$$

onde:

$AE$  = atividade de esterificação (U.g<sup>-1</sup>);

$V_a$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL);

$V_b$  = volume de NaOH gasto na titulação da amostra do branco (mL);

$M$  = molaridade da solução de NaOH;

$Vf$  = volume final de meio reacional (mL);

$t$  = tempo (s);

$m$  = massa de enzima (g);

$Vc$  = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

#### 4.11. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os experimentos foram realizados em triplicata. Foi realizada a análise de variância e aplicados o Teste de Tukey ou o Teste t, a 95% de confiança (p<0,05), para verificar a existência de diferenças significativas. Tais tratamentos foram realizados com o uso do *software* Statistica 5.0 (StatSoft Inc., EUA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. SELEÇÃO DO BIOCATALISADOR E ÁCIDO CARBOXÍLICO

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para o percentual de esterificação médio do butirato de isoamila em função do tempo para as enzimas Lipozyme<sup>®</sup> 435 e Lipozyme<sup>®</sup> RM IM.

**Tabela 4** - Percentual de esterificação para o butirato de isoamila em função do tempo. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima.

Tempo (h)	Percentual médio de esterificação (%) ± desvio padrão	
	Lipozyme <sup>®</sup> 435	Lipozyme <sup>®</sup> RM IM
0	0,0 ± 0,0 <sup>d,A</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>f,A</sup>
0,5	59,2 ± 1,2 <sup>c,A</sup>	14,5 ± 1,8 <sup>e,B</sup>
1	76,3 ± 1,3 <sup>b,A</sup>	29,4 ± 2,7 <sup>d,B</sup>
2	82,9 ± 0,4 <sup>a,A,α</sup>	55,7 ± 1,7 <sup>c,B</sup>
3	84,3 ± 1,8 <sup>a,A</sup>	82,6 ± 1,7 <sup>b,A</sup>
6	83,5 ± 0,2 <sup>a,A</sup>	84,4 ± 1,4 <sup>a,A,α</sup>
24	85,6 ± 1,7 <sup>a,A</sup>	86,4 ± 0,4 <sup>a,A</sup>
48	84,1 ± 1,9 <sup>a,A</sup>	87,9 ± 1,5 <sup>a,A</sup>

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de reação para uma mesma enzima;

Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as enzimas para um mesmo tempo de reação;

Letras gregas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os percentuais de esterificação máximos.

O percentual de esterificação apresentou aumento no decorrer do tempo de reação até certo ponto. Assim, para a enzima Lipozyme<sup>®</sup> 435 não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para os tempos superiores a 2 h de reação, e para enzima

Lipozyme® RM IM verificou-se que a partir das 6 h não houve mais variação do percentual de esterificação. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para as enzimas no mesmo tempo de reação a partir de 6 h. Assim, a partir deste tempo as duas enzimas apresentaram o mesmo comportamento reacional.

Analisando os valores dos percentuais máximos de esterificação para as enzimas Lipozyme® 435 (82,9% em 2 h) e Lipozyme® RM IM (84,4% em 6 h), seus valores não se diferiram a 95% de confiança. Por outro lado, essa diferença de tempo para os máximos percentuais de esterificação comprovou que a enzima Lipozyme® 435 apresentou uma maior taxa de conversão.

Anschau et al. (2011) desenvolveram um estudo sobre a síntese do éster butirato de isoamila (cujo álcool isoamílico utilizado foi obtido a partir da destilação do óleo fúsel), catalisado pela enzima Lipozyme® TL IM com n-hexano como solvente. A partir de um planejamento fatorial estabeleceram como condições temperatura de 50°C, com 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de ácido butírico, concentração de 0,020 g mL<sup>-1</sup> de enzima; razão molar álcool: ácido de 3:1, agitação de 180 rpm, atingindo 94% de conversão após 18 h de reação. Para ensaios nos quais utilizaram baixa concentração de enzima (0,003 g.mL<sup>-1</sup>) ou elevada concentração de ácido (0,5 mol.L<sup>-1</sup>), os resultados obtidos foram baixos, aproximando-se de 0%. Esse fato foi atribuído à reversibilidade da reação, isto é, a hidrólise. Para baixa concentração de enzima (0,003 g.mL<sup>-1</sup>), alta concentração de ácido (0,5 mol.L<sup>-1</sup>) e razão molar de 3:1 (álcool:ácido), o percentual de esterificação máximo alcançou 69,6% em 6 h, porém em 18 h de reação ele reduziu-se, atingindo 0%. O excesso de álcool pode reduzir a formação do complexo acil-enzima, resultando numa diminuição da alcoólise ou até mesmo distorcer a camada de água essencial das moléculas de enzima.

Macedo, Pastore e Rodrigues (2004) otimizaram a síntese o éster butirato de isoamila com a lipase de *Rhizopus* sp. em um sistema livre de solvente. A melhor condição de esterificação foi na razão molar álcool:ácido de 1,5:1, uma concentração de enzima de 5,5% a 40°C, obtendo-se um percentual de esterificação de 75% em 48 h de reação.

O percentual de esterificação médio obtido para o acetato de isoamila é apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5** - Percentual de esterificação para o acetato de isoamila em função do tempo. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima.

<b>Lipozyme® 435</b>		<b>Lipozyme® RM IM</b>	
<b>Tempo (h)</b>	<b>Percentual médio de esterificação (%) ± desvio padrão</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Percentual médio de esterificação (%) ± desvio padrão</b>
0	0,0 ± 0,0 <sup>f</sup>	0	0,0 ± 0,0 <sup>f</sup>
0,25	35,7 ± 2,6 <sup>e</sup>	1	15,1 ± 0,7 <sup>e</sup>
0,5	58,0 ± 0,3 <sup>d</sup>	2	23,3 ± 1,4 <sup>d</sup>
0,75	73,4 ± 1,4 <sup>c</sup>	3	22,4 ± 1,8 <sup>d</sup>
1	82,0 ± 1,7 <sup>b</sup>	6	38,4 ± 1,6 <sup>c</sup>
2	86,0 ± 0,1 <sup>a,α</sup>	24	85,3 ± 0,2 <sup>b</sup>
3	88,1 ± 1,5 <sup>a</sup>	48	90,5 ± 0,7 <sup>a,α</sup>
6	86,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	-	-

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os tempos de reação para uma mesma enzima

Letras gregas iguais representam que não há diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os percentuais de esterificação máximos.

Para a enzima Lipozyme® 435 não foram observadas diferenças significativas ( $p>0,05$ ) a partir de 2 h de reação, atingindo-se neste tempo 86,0% de esterificação. Para tempos superiores não houve diferença significativa nos percentuais de esterificação. Para a enzima Lipozyme® RM IM observou-se um incremento elevado no percentual de esterificação, de 6 h de reação até 24 h. O percentual máximo correspondeu a 90,5% em 48 h de reação.

Ambos os valores máximos não diferiram a 95% de confiança, mas os tempos de reação distintos para atingir o percentual máximo de esterificação, de 2 h e 48 h

respectivamente, implicam em produtividades distintas (não calculada), sendo Lipozyme® 435 a que apresentou uma maior taxa de reação.

No estudo de Güvenç, Kapucu e Mehmetoglu (2002) em sistema livre de solvente para a síntese do acetato de isoamila com a enzima Novozym® 435, a máxima conversão foi obtida em 6 h, com 80% de conversão em uma concentração de 5% de enzima. Também avaliaram a enzima Lipozyme® RM IM, na presença de hexano como solvente, e obtiveram uma conversão máxima de 96% em 72 h para concentrações enzimáticas de 7,5–10%.

Na síntese do acetato de isoamila, conforme estudo realizado por Romero et al. (2005) com a enzima comercial imobilizada Novozym® 435 usando hexano como solvente, na temperatura de 37°C e 200 rpm de agitação, a máxima conversão de 100% foi obtida nas primeiras 3 h de reação, onde a taxa de formação do éster foi elevada. Com o decorrer do tempo, a reação tendeu a ficar mais lenta à medida que os substratos eram consumidos.

A síntese do éster propionato de isoamila é apresentada na Tabela 6. Para ambas as enzimas, o percentual de esterificação máximo foi observado após 24 h de reação, sendo de 86,5% e 89,0% para Lipozyme® 435 e Lipozyme® RM IM, respectivamente. Apesar dos valores estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) para máxima conversão, Lipozyme® 435 apresentou um aumento expressivo no percentual de esterificação nas primeiras 2 h de reação, quando comparado com a enzima Lipozyme® RM IM, implicando em uma maior taxa de reação nesse intervalo de tempo.

Em relação aos tempos de reação, as duas enzimas se diferenciaram estatisticamente a 95% de confiança ( $p < 0,05$ ), nos tempos de reação até 3 h.

No estudo de Krishna e Karanth (2002) para a síntese de propionato de isoamila utilizando a lipase Lipozyme IM-20, também de *Rhizomucor miehei*, um percentual de esterificação máximo de 93% foi atingido para uma relação de 24 g.mol<sup>-1</sup> enzima-substrato, concentração de substrato de 1,5 M (concentração considerada elevada) em um tempo razoavelmente curto (24 h).

**Tabela 6** - Percentual de esterificação para o propionato de isoamila em função do tempo. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima.

Tempo (h)	Percentual médio de esterificação (%) ± desvio padrão	
	Lipozyme® 435	Lipozyme® RM IM
0	0,0 ± 0,0 <sup>f,A</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>g,A</sup>
0,5	32,4 ± 0,7 <sup>e,A</sup>	14,0 ± 1,7 <sup>f,B</sup>
1	59,6 ± 0,6 <sup>d,A</sup>	25,6 ± 1,1 <sup>e,B</sup>
2	79,2 ± 1,0 <sup>c,A</sup>	42,7 ± 0,9 <sup>d,B</sup>
3	82,7 ± 0,1 <sup>b,A</sup>	55,7 ± 2,2 <sup>c,B</sup>
6	82,1 ± 0,3 <sup>b,A</sup>	80,3 ± 1,7 <sup>b,A</sup>
24	86,5 ± 1,6 <sup>a,A,α</sup>	89,0 ± 1,6 <sup>a,A,α</sup>
48	87,4 ± 0,2 <sup>a,B</sup>	89,8 ± 0,3 <sup>a,A</sup>

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de reação para uma mesma enzima;

Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as enzimas para um mesmo tempo de reação;

Letras gregas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os percentuais de esterificação máximos.

A Tabela 7 apresenta os resultados para a síntese do éster laurato de isoamila. Para a enzima Lipozyme® 435, conforme observado na Tabela 7, o máximo percentual de esterificação foi atingido em 2 h de reação, com 87,1%. Para a enzima Lipozyme® RM IM, o comportamento foi similar, onde a esterificação correspondeu a 85,4% em 2 h. Para ambos os casos não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os percentuais de esterificação para os tempos posteriores.

Na análise estatística a 95% de confiança para comparação das enzimas em tempos iguais, tem-se que para os tempos até 2,5 h de reação os comportamentos das duas enzimas foram iguais, e que para tempos posteriores, de 3 e 6 h, a enzima



Lipozyme® 435 apresentou um maior percentual de esterificação em comparação com a Lipozyme® RM IM.

Varma e Madras (2007) estudaram a síntese do éster laurato de isoamila em um sistema utilizando dióxido de carbono supercrítico, em substituição ao solvente, e a enzima Novozym® 435, encontrando 95% de conversão em 4 h de reação.

**Tabela 7** - Percentual de esterificação para o laurato de isoamila em função do tempo. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima.

Tempo (h)	Percentual médio de esterificação (%) ± desvio padrão	
	Lipozyme® 435	Lipozyme® RM IM
0	0,0 ± 0,0 <sup>e,A</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>e,A</sup>
0,5	38,7 ± 0,2 <sup>d,A</sup>	38,4 ± 0,4 <sup>d,A</sup>
1	71,7 ± 2,2 <sup>c,A</sup>	47,1 ± 0,1 <sup>c,A</sup>
1,5	84,3 ± 2,0 <sup>b,A</sup>	82,6 ± 0,2 <sup>b,A</sup>
2	87,1 ± 2,0 <sup>a,b,A,α</sup>	85,4 ± 0,4 <sup>a,A,α</sup>
2,5	87,3 ± 1,7 <sup>a,b,A</sup>	86,4 ± 1,7 <sup>a,A</sup>
3	88,5 ± 0,2 <sup>a,A</sup>	85,4 ± 0,3 <sup>a,B</sup>
6	88,3 ± 0,2 <sup>a,A</sup>	85,5 ± 0,2 <sup>a,B</sup>

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de reação para uma mesma enzima;

Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as enzimas para um mesmo tempo de reação;

Letras gregas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os percentuais de esterificação máximos.

De modo geral, a síntese de ésteres de isoamila com diferentes tipos de ácidos e com dois tipos de enzimas provou ser eficiente de modo a alcançar a formação dos produtos desejados. Os percentuais de esterificação máximos alcançados foram, respectivamente, para as enzimas Lipozyme® 435 e Lipozyme® RM IM: butirato de

isoamila 82,9% (2 h) e 84,4% (6 h); acetato de isoamila 86,0 (2 h) e 90,5% (48 h); propionato de isoamila 86,5% (24 h) e 89,0% (24 h); laurato de isoamila 87,1% (2 h) e 85,4% (2 h). Desta forma, tem-se que todas as sínteses ocorreram de forma bem sucedida, com percentuais de esterificação superiores a 80%. Entretanto, considerou-se que a enzima Lipozyme® 435 apresentou um melhor desempenho, pela tendência de maior taxa de reação observada nas primeiras horas de síntese de butirato, laurato e propionato de isoamila, indicando a possibilidade de se estabelecer processos com maior produtividade. Em adição, optou-se pela escolha do ácido propiônico, pois o propionato de isoamila é componente de diversos aromas (aroma de banana, abacaxi e damasco, aroma doce como amêndoas, de queijo e bebidas alcoólicas), havendo poucos trabalhos na literatura a respeito de sua síntese.

É importante frisar que este melhor desempenho da enzima Lipozyme® 435 está associado à sua maior atividade de esterificação. Foi obtida uma atividade de  $46,28 \pm 1,49 \text{ U.g}^{-1}$  para a enzima Lipozyme® 435 e  $25,06 \pm 2,24 \text{ U.g}^{-1}$  para a enzima Lipozyme® RM IM, diferindo estatisticamente entre si.

## 5.2. AVALIAÇÃO DO EQUIPAMENTO DE SÍNTESE ENZIMÁTICA

Por motivo de um possível desgaste do banho com agitação recíproca, e por diversos trabalhos citarem o uso de incubadora rotatória tipo *shaker*, foi realizado um ensaio de esterificação comparativo nestes dois equipamentos. O resultado deste experimento pode ser observado na Tabela 8.

Analisando os resultados, o percentual máximo de esterificação no decorrer do tempo de reação foi de 86,5% para o banho com agitação recíproca e 87,5% para a incubadora rotatória, ambos em 24 h. Na comparação entre os dois equipamentos em um mesmo tempo, com exceção do tempo de reação de 6 h, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o banho com agitação recíproca e a incubadora rotatória. As máximas conversões obtidas para ambos equipamentos ocorreram em 24 h de reação (86,5% e 87,5%, respectivamente), não observando-se diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre eles. Desta forma, foi possível a substituição do banho com a agitação recíproca pela incubadora rotatória para realização dos experimentos, sem mudanças no desempenho da reação.

**Tabela 8** - Síntese de propionato de isoamila em diferentes equipamentos. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).

Tempo (h)	Percentual médio de esterificação (%) ± desvio padrão	
	Banho com agitação recíproca	Incubadora rotatória
0	0,0 ± 0,0 <sup>f,A</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>e,A</sup>
0,5	32,4 ± 0,7 <sup>e,A</sup>	33,7 ± 1,1 <sup>d,A</sup>
1	59,6 ± 0,6 <sup>d,A</sup>	59,2 ± 1,4 <sup>c,A</sup>
2	79,2 ± 1,0 <sup>c,A</sup>	81,2 ± 1,2 <sup>b,A</sup>
3	82,7 ± 0,1 <sup>b,A</sup>	83,8 ± 1,2 <sup>b,A</sup>
6	82,1 ± 0,3 <sup>b,B</sup>	83,3 ± 0,6 <sup>b,A</sup>
24	86,5 ± 1,6 <sup>a,A,α</sup>	87,5 ± < 0,1 <sup>a,A,α</sup>
48	87,4 ± 0,2 <sup>a,A</sup>	87,5 ± < 0,1 <sup>a,A</sup>

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de reação, para um mesmo equipamento.

Letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os equipamentos para um mesmo tempo de reação;

Letras gregas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os percentuais de esterificação máximos obtidos com os diferentes equipamentos.

### 5.3. EFEITO DOS SOLVENTES

Nesta etapa do estudo, foram realizados experimentos nas mesmas condições reacionais em termos de concentração dos substratos e enzima, agitação e temperatura, a fim de avaliar diferentes solventes, sendo eles: acetona, metiletilcetona, éter dietílico, tolueno, hexano e heptano. Os solventes foram escolhidos de forma a cobrir uma ampla faixa de log P.

Para cada solvente, o teste de Tukey foi aplicado a fim de comparar o percentual de esterificação ao longo do tempo, visando estabelecer o percentual máximo de

esterificação e o respectivo tempo de reação (Apêndice A). Os resultados obtidos para o percentual máximo de esterificação e o respectivo tempo para atingí-lo são apresentados na Tabela 9, onde os diferentes solventes são comparados através do teste de Tukey.

Para Laane (1987), autor de um dos primeiros estudos sobre a correlação da função enzimática com solventes orgânicos, há três regras em relação ao Log P (fator que descreve a hidrofobicidade do solvente) e a biocatálise em solventes orgânicos: (1) Solventes orgânicos com  $\text{Log P} < 2$ , ou solventes polares, não são adequados a reações biocatalíticas visto que atuam na interação água-biocatalisador, inativando ou desnaturando a enzima; (2) Solventes com  $\text{Log P}$  entre 2 e 4, muito pouco solúveis em água, captam a água da camada proteica da enzima que poderá vir a afetar a atividade da enzima; (3) Solventes com  $\text{Log P} > 4$  são apolares e praticamente insolúveis em água, e não costumam afetar a quantidade de água essencial da enzima, assim permanecendo em um estado ativo.

**Tabela 9** – Síntese de propionato de isoamila com diferentes solventes. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).

Solvente	Log P	Esterificação máxima (%) $\pm$ desvio padrão	Tempo de reação (h)*
Acetona	-0,23	21,3 $\pm$ 2,3 <sup>e</sup>	48
Metiletilcetona	0,29	24,5 $\pm$ 1,1 <sup>e</sup>	48
Éter dietílico	0,77	58,9 $\pm$ 0,7 <sup>d</sup>	24
Tolueno	2,5	76,6 $\pm$ 1,9 <sup>c</sup>	6
Hexano	3,5	87,5 $\pm$ < 0,1 <sup>a</sup>	24
Heptano	4,0	83,8 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	6

\*Tempo para atingir a esterificação máxima.

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os percentuais de esterificação máximos obtidos em cada solvente.

Observa-se que o hexano resultou no maior percentual de esterificação, de 87,5% em 6 h de reação, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais solventes.

Conforme Xiao et al. (2015), solventes altamente hidrofóbicos, como o hexano, são preferidos para sínteses catalisadas por lipases, por não penetrarem na camada de água que envolve a enzima, favorecendo a manutenção de sua conformação.

Yadav e Lathi (2003), em estudo para síntese do éster isobutirato de butila usando a enzima Novozym® SP 435 como catalisador, avaliaram diferentes solventes como tolueno, heptano, isoctano e hexano, obtendo conversões de 39,7%, 57%, 46% e 47%, respectivamente. Afirmam que no meio reacional, quando adicionado de solvente orgânico, a eficiência da enzima muda drasticamente. As enzimas possuem estabilidade em solventes com  $\text{Log } P > 4$ . Quando em meio aquoso, a água atua como um lubrificante molecular, aumentando a flexibilidade da enzima bem como a sua atividade, e os solventes muito apolares não atuam sobre a camada essencial de água que envolve a enzima, deixando-a em estado ativo.

Pelo motivo de ter apresentado maior percentual de esterificação, bem como por ser um solvente de uso liberado pela ANVISA de acordo com a resolução RDC nº2, de 15 de janeiro de 2007, e ser amplamente empregado industrialmente em processos de extração de óleos vegetais, o hexano foi escolhido como solvente para a síntese do propionato de isoamila.

#### 5.4. ADIÇÃO INICIAL DE ÁGUA

A adição inicial de água ao sistema reacional foi avaliada, pois pode influenciar no equilíbrio da reação e na estabilidade da enzima. Os resultados obtidos para o percentual de esterificação em função do tempo, e tratamento estatístico dos dados, podem ser conferidos no Apêndice B. Na Tabela 10, são apresentados os valores dos percentuais de esterificação máximos obtidos para cada quantidade de água adicionada ao sistema, e respectivos tempos de reação.

A análise estatística dos resultados mostrou que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a adição de água nas proporções de 0,75% v/v e 0,125% v/v e sem a adição de água, nos ensaios em que houve tratamento dos reagentes. Entretanto, estas mesmas condições diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do sistema sem tratamentos e sem adição de água. O maior valor para o percentual de esterificação máximo

observado para esta condição (87,5%) indica que não há necessidade de tratamentos dos reagentes para remoção de água.

**Tabela 10** - Síntese de propionato de isoamila com a adição inicial de água. Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).

Quantidade inicial de água (%v/v)	Esterificação máxima (%) ± desvio padrão	Tempo de reação (h)*
Controle**	87,5 ± < 0,1 <sup>a</sup>	24
0	83,2 ± 0,7 <sup>b</sup>	6
0,075	83,3 ± 0,8 <sup>b</sup>	3
0,125	83,0 ± 1,9 <sup>b</sup>	6

\*Tempo para atingir a esterificação máxima.

\*\*Reagentes sem tratamento e sem adição de água.

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os percentuais de esterificação máximos.

Kuperkar et al. (2014) realizaram um estudo para síntese do éster propionato de isobutílica em sistema livre de solvente investigando parâmetros como a influência da adição inicial de água no sistema. Verificaram que ao aumentar a concentração de água inicial de 0,1 M para 0,3 M, a conversão reduziu de 77,3% para 60,5%. Atribuiu-se essa diminuição ao fato de que a adição de água desloca o equilíbrio da reação em direção à reação de hidrólise.

Aragão et al. (2009), na síntese do butirato de isoamila em solvente n-hexano, estudaram a adição inicial de água no sistema, em quantidades de 0,075% a 0,175% v/v, comparando esses resultados com um controle, sem remoção de água, bem como sem a adição inicial de água nos reagentes tratados. Como resultados, o percentual de esterificação decresceu de 83% para 72% quando a adição de água variou de 0,075% para 0,175% v/v, sendo que o sistema em que houve o tratamento e sem adição de água

resultou em um percentual de 87%, maior que o ensaio controle, sem tratamentos e adição de água, no qual os autores obtiveram 80%.

### 5.5. TEMPERATURA

Para cada temperatura, foi acompanhado o percentual de esterificação em função do tempo, conforme Apêndice C. São exibidos na Tabela 11 os resultados obtidos para o máximo percentual de esterificação para cada uma das temperaturas.

**Tabela 11** - Síntese de propionato de isoamila em diferentes temperaturas. Condições reacionais: 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).

Temperatura (°C)	Esterificação máxima (%) ± desvio padrão	Tempo de reação (h)*
25	87,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	24
30	87,5 ± < 0,1 <sup>a</sup>	24
35	86,5 ± 1,3 <sup>a,b</sup>	48
40	84,6 ± < 0,1 <sup>b</sup>	24
45	81,6 ± 0,7 <sup>c</sup>	3

\*Tempo para atingir a esterificação máxima.

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os percentuais de esterificação máximos obtidos em cada temperatura.

Pela análise estatística, considera-se que as temperaturas de 25°C e 30°C resultaram em comportamentos iguais, por apresentarem percentuais máximos de esterificação que não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ) no mesmo tempo de reação (24 h), sendo, respectivamente, 87,3% e 87,5%. Estes valores não diferiram estatisticamente ao obtido na temperatura de 35°C (86,5%), porém este foi alcançado em um maior tempo de reação (48 h). Para as temperaturas de 40°C e 45°C a redução do percentual de esterificação observada pode ter sido motivada pela diminuição da sua atividade enzimática devido à desnaturação. Desta forma estabeleceu-se a temperatura de 25°C, que representa também uma condição com menor gasto energético.

Kupekar et al. (2014), em seu estudo da síntese do éster propionato de isobutila, variaram a temperatura de 30°C a 50°C, mantendo os outros parâmetros da reação, como velocidade de agitação, quantidade de enzima e razão molar, constantes. Um aumento da conversão de 66% para 82% foi observado com a temperatura aumentando de 30°C até 40°C, porém ao elevar a temperatura para 50°C a conversão foi reduzida a 75%. Atribuiu-se essa redução à desnaturação térmica, em que a temperatura pode vir a diminuir a conversão em função do tempo. O aumento da conversão inicialmente pode ter sido devido ao fato de que o aumento da temperatura pode reduzir a viscosidade aumentando a solubilidade, melhorando o processo de difusão e com isso as interações entre enzima e substratos.

Güvenç, Kapucu e Mehmetoglu (2002) propuseram o estudo de parâmetros na síntese do éster acetato de isoamila em sistema livre de solvente. O sistema contendo como catalisador a enzima Novozym® 435 foi submetido a diferentes de temperaturas (30°C, 40°C e 50°C). A máxima conversão alcançada para as três temperaturas testadas foi de 81% com concentração de 68 mmol.L<sup>-1</sup> de enzima. As reações atingiram seu equilíbrio em 6 h de reação. A tendência crescente das curvas de concentração em função do tempo demonstrou que não houve inativação térmica das enzimas durante o processo reacional. Sua ótima condição foi estabelecida na menor temperatura (30°C) em um tempo de 6 h suficiente para atingir uma concentração de éster elevada.

## 5.6. RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÁCIDO

Na Tabela 12 são apresentados os máximos percentuais de esterificação para diferentes razões molares álcool isoamílico:ácido propiônico. Os dados relativos ao percentual de esterificação em função do tempo e tratamento estatístico são apresentados no Apêndice D.

Valor máximo foi obtido para razão molar de 5:1 (92,5%), que diferiu das demais. Por outro lado, a razão molar de 3:1 foi estatisticamente superior à razão molar 1:1, salientando que nesta condição o tempo de reação para atingir a esterificação máxima foi reduzido de forma expressiva em relação às demais condições (de 24 h para 6 h). Desta forma, a fim de conciliar o aumento do percentual de esterificação e a redução do tempo de reação foi estabelecida a razão molar de 3:1, com 89,9% de esterificação.



**Tabela 12** - Síntese de propionato de isoamila com diferentes razões molares (álcool:ácido). Condições reacionais: 25°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).

<b>Razão molar (álcool:ácido)</b>	<b>Esterificação máxima (%) ± desvio padrão</b>	<b>Tempo de reação (h)*</b>
1:1	87,3 ± 0,6 <sup>c</sup>	24
3:1	89,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	6
5:1	92,5 ± < 0,1 <sup>a</sup>	24

\*Tempo para atingir a esterificação máxima.

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os percentuais de esterificação máximos obtidos em cada razão molar.

Kupekar et al. (2014), no estudo do efeito da razão molar na síntese do éster propionato de isobutila, afirmam que o fato de aumentar a concentração de álcool pode fazer com que a reação demore mais tempo para atingir seu equilíbrio, bem como pode diminuir as taxas de reação. A conversão apresentou um acréscimo de 82,5% para 90% quando a proporção álcool-ácido mudou de 1:1 para 1:3, mas para razão molar de 1:4 a conversão não mudou, indicando, segundo os autores, um efeito inibitório do álcool sobre a enzima, mas esta evidência, porém, não foi provada.

## 5.7. CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO

Foram testadas diferentes concentrações de ácido propiônico nas condições selecionadas nos passos anteriores. Os percentuais de esterificação em função do tempo para cada uma das concentrações de ácido estão apresentados no Apêndice F. Na Tabela 13, são expostos os resultados referentes ao percentual de esterificação máximo para cada concentração.

**Tabela 13** - Síntese de propionato de isoamila com diferentes concentrações de ácido propiônico. Condições reacionais: 25°C; 180 rpm; razão molar álcool:ácido 3:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).

<b>Concentração de ácido (M)</b>	<b>Esterificação máxima (%) ± desvio padrão</b>	<b>Tempo de reação (h)*</b>
0,06	89,9 ± 0,1 <sup>d</sup>	6
0,1	93,7 ± 0,1 <sup>c</sup>	24
0,2	97,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	48
0,3	95,2 ± <0,1 <sup>b</sup>	24
0,5	57,1 ± 0,1 <sup>e</sup>	24

\*Tempo para atingir a esterificação máxima.

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os percentuais de esterificação máximos obtidos para cada concentração de ácido propiônico.

A melhor condição para concentração de ácido propiônico foi de 0,2 M, atingindo 97,4% de esterificação para um tempo de reação de 48 h, diferindo significativamente das outras condições testadas. Entretanto, considerando que o aumento da concentração de ácido no meio reacional é interessante, pois representa uma maior concentração de éster produzido, favorecendo sua recuperação, optou-se por selecionar a concentração de 0,3 M, cujo máximo percentual de esterificação foi de 95,2% em 24 h. Apesar do valor do percentual de esterificação ser um pouco menor em relação ao obtido com 0,2 M, o tempo para atingir a máxima conversão foi menor (24 h para 0,3 M e 48 h para 0,2 M), indicando uma maior produtividade. Observa-se ainda que na concentração de 0,5 M o percentual de esterificação sofreu uma drástica redução, significando que a acidificação do meio para concentrações iguais ou maiores que esta provoca uma provável desnaturação ou inibição enzimática, diminuindo a atividade catalítica.

Lorenzoni et al. (2012) estudaram a síntese do éster butirato de butila em sistema com presença da lipase Lipozyme® RM IM. Avaliaram o efeito do ácido sobre a atividade enzimática, variando a concentração de 0,1 a 2,0 M. Constatou-se um aumento na velocidade de reação até a concentração de 1,0 M. Uma diminuição na atividade foi

observada quando a concentração variou de 1 a 2 M, relacionada a uma possível inibição ou acidificação excessiva do meio.

## 6. CONCLUSÃO

Os testes preliminares para síntese de ésteres de isoamila com diferentes tipos de ácidos e com dois tipos de enzimas foram promissores, de modo a alcançar a formação dos produtos desejados. Os percentuais de esterificação máximos alcançados foram, respectivamente, para as enzimas Lipozyme® 435 e Lipozyme® RM IM: butirato de isoamila 82,9% (2 h) e 84,4% (6 h); acetato de isoamila 86,0% (2 h) e 90,5% (48 h); propionato de isoamila 86,5% (24 h) e 89,0% (24 h); laurato de isoamila 87,1% (2 h) e 85,4% (2 h). Desta forma, tem-se que todas as sínteses ocorreram de forma bem sucedida, com percentuais de esterificação superiores a 80%, o que demonstra a capacidade de esterificação das enzimas para ácidos carboxílicos de diferentes tamanho de cadeia.

Na síntese do éster propionato de isoamila, o hexano apresentou o maior percentual de esterificação, de 87,5%, entre os solventes testados, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos outros solventes.

O sistema foi submetido à adição de diferentes quantidades iniciais de água após um tratamento dos reagentes para remoção da água intrínseca, comparando com a esterificação sem tratamentos e sem a adição inicial de água, verificando-se que não se faz necessário um pré-tratamento dos reagentes para a remoção da água.

Com relação à variável temperatura, a síntese de propionato de isoamila nas temperaturas de 25°C e 30°C demonstrou comportamentos que não diferiram entre si, sendo estabelecida a temperatura de 25°C, que implica em menor gasto energético. Para as temperaturas de 40°C e 45°C a redução do percentual de esterificação pode ter sido motivada pela diminuição da sua atividade enzimática devido à desnaturação.

Um máximo percentual de esterificação foi encontrado para a razão molar de 5:1, entretanto optou-se pela razão de 3:1, na qual houve uma redução no tempo de reação associada ao ganho no percentual de esterificação quando comparado à razão 1:1.

Utilizando concentração de ácido propiônico de 0,2 M, atingiu-se o máximo percentual de esterificação entre as concentrações testadas. Entretanto, optou-se por 0,3 M, em que foi possível conciliar concentração de ácido mais elevada (e consequentemente do éster formado), alto percentual de esterificação e menor tempo de reação, sendo que uma redução no percentual de esterificação foi observada a 0,5 M, possivelmente associada à desnaturação da enzima em condições mais ácidas.

Desta forma, definiu-se como condição para a reação de esterificação do éster propionato de isoamila: temperatura de 25°C; 180 rpm de agitação; razão molar álcool:ácido 3:1; concentração de ácido 0,3 M; e 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme<sup>®</sup> 435). Nestas condições, o percentual de esterificação foi de 95,2% em 24 h.

## 7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Propor um modelo matemático para a reação de síntese do éster propionato de isoamila;
- Estudar a síntese do éster propionato de isoamila em sistema livre de solvente;
- Estudar a síntese do éster laurato de isoamila.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULMALEK, E.; SAUPI, H.S.M.; TEJO, B.A.; BASRI, M.; SALLEH, A.B.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; RAHMAN, M.B.A. Improved enzymatic galactose oleate ester synthesis in ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 37-43, 2012.

AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia**, v.72. p. 22 -29, 2002.

AKACHA, N.B.; 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, p. 675-706, 2015.

ANSCHAU, A.; ARAGÃO, V.C.; PORCIUNCULA, B.D.A.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A V.; BURKERT, J.F.M. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 2148-2156, 2011.

ANVISA - Agência Nacional de vigilância Sanitária (2007). **Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes**. Disponível em:

<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B11218-1-0%5D.PDF>. Acesso em: 23 de ago, 2015, 09:02.

AOCS. **Official and tentative methods of the American Oil Chemist's Society**, 1998. Disponível em: <http://www.aocs.org/Methods/content.cfm?ItemNumber=40798>. Acesso em: 12 de mai, 2016, 11:30.

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

ARAGÃO, V.C; PORTO, M.R.A; BURKERT, C.A.V.; KALIL, S.J.; BURKERT, J.F.M. Response surface methodology approach for the synthesis of ethyl butyrate. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, p. 103-110, 2011.

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

BARÁNKOVÁ, E.; DOHNAL, V. Effect of additives on volatility of aroma compounds from dilute aqueous solutions. **Fluid Phase Equilibria**, v. 407, p. 217-223, 2016.

BNDES – Banco Nacional do Desenvolvimento (2014). **Potencial de diversificação da indústria Brasileira. Relatório 4 – Aromas, sabores e fragrâncias**. Disponível em: [http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes\\_pt/Galerias/Arquivos/produtos/download/aep\\_fep/chamada\\_publica\\_FEPprospec0311\\_Quimicos\\_Relat4\\_aromas.pdf](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/produtos/download/aep_fep/chamada_publica_FEPprospec0311_Quimicos_Relat4_aromas.pdf). Acesso em 10 de jun, 2016, 13:30.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia. Produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506 p.

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

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: EPUB, 2008. 288 p.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, v. 4, p. 1-14, 2012.

DA SILVA, J.B. **Produção de acetato de isoamila via esterificação enzimática em sistema livre de solvente**. 2014. 76f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

DE BARROS, P.C.; AZEVEDO, A.M; CABRAL, J.M.S.; FONSECA, L.P. Optimization of flavour esters synthesis by *Fusarium Solani Psi* cutinase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, p. 275-284, 2012.

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

DE TEVES, M.L.U. **Álcool isoamílico. Ficha técnica**. Faculdade Oswaldo Cruz, São Paulo, SP, 2003. Disponível em



<https://www.oswaldocruz.br/download/fichas/%C3%81lcool%20isoam%C3%ADlico2003.pdf>. Acesso em 12 de mai, 2016, 22:00.

EISENMENGER, M.J.; REYES-DE-CORCUERA, J.I. Enhanced synthesis of isoamyl acetate using an ionic liquid–alcohol biphasic system at high hydrostatic pressure.

**Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 36-40, 2010.

FENNEMA, O.R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L. **Química de alimentos de Fennema**. 4ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010. 900 p.

FERNANDES, M.L.M. **Hidrólise de triglicerídeos e síntese de éster de ácido graxo em sistema de micelas reversas**. 2002. 123f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

FERRER, M.; SOLIVERI, J.; PLOU, F.J.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; REYES-DUARTE, D.; CHRISTENSEN, M.; COPA-PATIÑO, J.L.; BALLESTEROS, A. Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 391-398, 2005.

FERREIRA, M.C.; MEIRELLES, A.J.A.; BATISTA, E.A.C. Study of the fusel oil distillation process. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 2336-2351, 2013.

GUMEL, A.M.; ANNUAR, M.S.M.; HEIDELBERG, T.; CHISTI, Y. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2079-2090, 2011.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOĞLU, U. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 379-386, 2002.

IOFI - International Organization of the Flavor Industry. **Code of practice - definitions**.

Disponível em: <http://www.iofi.org/Home/Teaser-Code-of-Practice/IOFI-Code-of-Practice/page.aspx/103>. Acesso em: 23 de ago, 2015, 08:45.

KHAN, N.R.; RATHOD, V.K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1793-1806, 2015.

- KRISHNA, S.H.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 193-201, 2001.
- KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. Response surface modeling of lipase – catalyzed isoamyl propionate synthesis. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 32-36, 2002.
- KUMAR, K.S.V.; RAMUSUBHAN, B.; LAKSHMI, B.S.; GAUTAM, P. Sensitive assay for lipase using tetra sulfonatophenyl porphyrin. **Analytical Biochemistry**, v. 356, p. 294-296, 2006.
- KUPERKAR, V.; LADE, V.G.; PRAKASH, A.; RATHOD, V.K. Synthesis of isobutyl propionate using immobilized lipase in a solvent free system: optimization and kinetic studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 143-149, 2014.
- LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 81-87, 1987.
- LAMIN, P. C. **Utilização de um método alternativo ao uso de padrões para determinação de ácidos graxos trans**. 2006. 53 f. Relatório de Estágio Supervisionado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- LEYVA, F.; ORJUELA, A.; KOLAH, A.; LIRA, C.; MILLER, D.; RODRÍGUES, G. Isoamyl propionate production by reactive distillation. **Separation and Purification Technology**, v. 146, p. 199-212, 2015.
- LI, M.; YANG, L.R.; XU, G.; WU, J.P. Cloning and characterization of a novel lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* GS11: the first member of a new bacterial lipase family XVI. **Journal of Biotechnology**, v. 228, p. 30-36, 2016.
- LOPRESTO, C.G.; NACCARATO, S.; ALBO, L.; DE PAOLA, M.G.; CHAKRABORTY, S.; CURCIO, S.; CALABRÒ, V. Enzymatic transesterification of waste vegetable oil to produce biodiesel. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 121; p. 229-235, 2015.
- LORENZONI, A.S.G.; GRAEBIN, N.G.; MARTINS, A.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M.A.; RODRIGUES, R.C. Optimization of pineapple flavour

synthesis by esterification catalysed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*.

**Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, p. 196-200, 2012.

MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 17, p. 115-119, 1997.

MACEDO, G.A.; PASTORE, G.M.; RODRIGUES, M.I. Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus* sp. lipase with a central composite rotatable design.

**Process Biochemistry**, v. 39, p. 687-693, 2004.

MARTINS, A.B.; GRAEBIN, N.G.; LORENZONI, A.S.G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2311-2316, 2011.

MARTINS, A.B. **Comparação entre agitação mecânica e ultrassônica na análise de ésteres de aromas catalisada por lipase**. 2012. 77f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

MARTINS, A.B.; DA SILVA, A.M.; SCHEIN, M.F.; GARCIA-GALAN, C.; AYUB, M.A.Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavour esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 18-25, 2014.

MARTINS, A.B.; SCHEIN, M.F.; FRIEDRICH, J.L.R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym 435: Enhanced activity and operational stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 1155-1160, 2013.

MESSIAS, J.M.; COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G.; GIESE, E.C.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, p. 213-234, 2011.

MOHAMMADI, M.; HABIBI, Z.; DEZVAREI, S.; YOUSEFI, M.; ASHJARI, M.; Selective enrichment of polyunsaturated fatty acids by hydrolysis of fish oil using immobilized and stabilized *Rhizomucor miehei* lipase preparations. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 414-421, 2015.

- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1274 p.
- OLIVEIRA, P.C; ALVES, G.M.; CASTRO, H.F.; MEI, L.H.I. Síntese do butirato de nbutila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 632-636, 2000.
- PICO, J.; NOZAL, M. J.; GÓMEZ, M.; BERNAL, J.L. An alternative method based on enzymatic fat hydrolysis to quantify volatile compounds in wheat bread crumb. **Food Chemistry**, v. 206, p. 110-118, 2016.
- PÖHNLEIN, M.; SLOMKA, C.; KUKHARENKO, O.; GÄRTNER, T.; WIEMANN, L. O.; SIEBER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Enzymatic synthesis of amino sugar fatty acid esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, p. 423-428, 2014.
- POTTER, N.N.; HOTCHKISS, J.H. **Ciencia de los alimentos**. 5ª Edição. Zaragoza: Acribia, 2007. 667 p.
- RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 207-219, 2009.
- REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M.F.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. COLLA, L.M. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Química Nova**, v. 37, p. 454-460, 2014.
- RIGO, E.; NINOW, J.L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V.; POLLONI, A.E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1132-1137, 2010.
- RIZZARDI, J. **Produção de lipases fúngicas visando à catálise de reações de síntese**. 2012. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2012.

ROMERO, M.D.; CALVO, L.; ALBA, C.; HABULIN, M.; PRIMOZIC, M.; KNEZ, Z. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 77-84, 2005.

SATYARTHI, J.K.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids over solid acid catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 391, p. 427-435, 2011.

SINGH, P.; SAXENA, D.K.; NAIK, S.N. Synthesis of food flavors by enzymatic esterification process. **International Journal of Science and Research**, v. 3, p. 2113-2116, 2014.

SHIH, I.; HUNG, S.; CHEN, F.; JU, H.; SHIEH, C. Optimized synthesis of lipase catalyzed l- menthyl butyrate by *Candida rugosa* lipase. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1223-1228, 2007.

STERGIOU, P.Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L.G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A.; PAPAMICHEL, E.M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1846-1859, 2013.

TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M. R.; HAMA, S. NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: a comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 185-189, 2008.

TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182-196, 2010.

VARMA, M.N.; MADRAS, G. Synthesis of isoamyl laurate and isoamyl stearate in supercritical carbon dioxide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, p. 139-147, 2007.

VARMA, M.N.; MADRAS, G. Effect of chain length of alcohol on the lipase – catalyzed esterification of propionic acid in supercritical carbon dioxide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 2342-2354, 2010.

VERMA, N.; THAKUR, S.; BHATT, A.K. Microbial lipases: industrial applications and properties (A review). **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 88-92, 2012.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 515-536, 2007.

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

WONG, Y.C.; TAN, Y.P.; TAUFIQ-YAP, Y.H.; RAMLI, I.; TEE, H.S. Biodiesel production via transesterification of palm oil by using CaO-CeO<sub>2</sub> mixed oxide catalysts. **Fuel**, v. 162, p. 288-293, 2015.

XIAO, Z.; HOU, X.; LYU, X.; ZHAO, J.Y.; XI, L.; LI, J.; LU, J.R. Enzymatic synthesis of aroma acetoin fatty acid esters by immobilized *Candida antarctica* lipase B. **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 1671-1677, 2015.

YADAV, G.D.; LATHI, P.S. Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 245-252, 2003.

ZHAO, H.; BAKER, G.A.; OLUBAJO, O.; ZANDERS, L.; CAMPBELL, S.M. Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation. **Journal of Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 149-157, 2009.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1:** Ficha de informação da enzima Lipozyme® RM IM



## Ficha de Informação do Produto



1 de 2

Válida a partir de 2014-09-06

## Lipozyme® RM IM

Neste produto a atividade enzimática chave é fornecida por lipase, que hidrolisa ligações éster em glicérides.

### CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO

Enzima Declarada	lipase
Atividade declarada	275 IUM/g
Cor	marrom claro a escuro
Apresentação	granulado inativado
Densidade de aproximadamente (g/ml)	0,33
Transportadores	Resina Fenólica

A cor pode variar de lote para outro. A intensidade da cor não é um indicativo da atividade enzimática.

### ESPECIFICAÇÃO DO PRODUTO

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Identificação unit IUM	275		/g
Perda durante a secagem	-	5	%
Conteúdo total de água	-	20000	/g
Bactéria Coliforme	-	30	/g
E. Coli	Não detectado		/25 g
Salmonella	Não detectado		/25 g
Metais pesados		Máx. 30	mg/kg
Chumbo		Máx. 5	mg/kg
Ársenico		Máx. 3	mg/kg
Cádmio		Máx. 0,5	mg/kg
Mercurio		Máx. 0,5	mg/kg

O método analítico da enzima está disponível no Portal do Cliente (Customer Centre) ou com o seu representante de vendas.

### COMPOSIÇÃO

Transportadores	Resina Fenólica
-----------------	-----------------

### STATUS GM

Este produto não é um OGM.

O produto enzimático é produzido por fermentação de um microrganismo que não está presente no produto final. O organismo de produção foi melhorado por meio da biotecnologia moderna.

### CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Temperatura de armazenamento: 0-10 °C (32-50 °F)

A embalagem deve ser mantida intacta, seca e ao abrigo da luz. Siga as recomendações e use o produto antes da data de validade expirar para evitar a necessidade de uma dosagem maior.

**Melhor utilizar antes de:** A data de validade encontra-se no certificado de análise ou na embalagem do produto.

O produto oferece desempenho ideal quando armazenado conforme recomendado e usado antes da data de validade.

O produto pode ser entregue em temperatura ambiente. Após a entrega, o produto deve ser armazenado conforme recomendado a 0-10°C(32-50°F).

### PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA E MANUSEIO

Enzimas são proteínas. A inalação de pó ou aerosol pode induzir sensibilização e causar reações alérgicas em indivíduos sensibilizados. Algumas enzimas podem irritar a pele, os olhos e as membranas mucosas em caso de contato prolongado. Veja a FISPQ ou o Manual de Segurança para mais informações sobre como manusear o produto com segurança e o que fazer em caso de desamontamento.

### CONFORMIDADE

O produto está em conformidade com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício definidas pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Food Chemicals Codex (FCC).

Os certificados Kosher e Halal encontram-se disponíveis no Customer Center ou com o representante de vendas.

### CERTIFICAÇÕES

A Novozymes é signatária do Pacto Global das Nações Unidas, da Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade Biológica e reportamos o nosso desempenho de sustentabilidade através da Global Reporting Initiative (GRI). Ver todos os nossos compromissos no âmbito da sustentabilidade em [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com).



## Lipozyme® RM IM

novozymes®  
2492

### SEGURANÇA ALIMENTAR

A Novozymes conduziu uma análise de risco e preparou um plano APPCC descrevendo os pontos críticos de controle (PCCs). O plano APPCC é respaldado por um amplo programa de pré-requisitos implementado nas suas Políticas de Fabricação da Novozymes.

O produto é fabricado de acordo com o plano APPCC da Novozymes, as BPF e outros requisitos do Sistema de Gestão de Qualidade Novozymes.

O produto está em conformidade com os requisitos de pureza relacionados a microrganismos recomendados pelo IECQ FADQMS e FCC.

O produto é produzido em conformidade com a certificação FSC 22000.



### EMBALAGEM

O produto está disponível em diferentes tipos de embalagem. Entre em contato com o representante de vendas para mais informações.

Novozymes Latin America Ltda.  
Rua professor Francisco Roberto 683  
CEP 03707-003 - Aracaju - Sergipe  
Brasil

Tel: +55 49 641 1000  
Fax: +55 49 643 1443

Para mais informações, os endereços de nossos escritórios, visite: [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)

A legislação, a regulamentação ou os direitos de terceiros podem impedir os clientes de importar, utilizar, processar ou revender os produtos aqui mencionados de determinada maneira. Sem um acordo em separado e por escrito entre o cliente e a Novozymes com essa finalidade, este documento não se constitui em uma representação ou garantia de qualquer espécie e está sujeito a alterações sem aviso prévio.

© Novozymes A/S

## ANEXO 2: Ficha de informação da enzima Lipozyme® 435

Ficha de Informação do Produto



novozymes  
Rethink Tomorrow

1 de 3  
Válido a partir de 2014-09-06

## Lipozyme® 435

Neste produto a atividade enzimática chave é fornecida por  
Epsa, que hidrolisa ligações entre em glicolídeos

### CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO

Enzima Declarada	Epsa
Atividade declarada	8000 PLU/g
Cor	Branco natural
Apresentação	granulado imobilizado
Densidade de aproximadamente (g/ml)	0,40
Transportadores	Resina artificial

A cor pode variar de um lote para outro. A intensidade da cor não é um indicador de atividade enzimática.

### CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

A embalagem deve ser mantida intacta, seca e ao abrigo da luz. Siga as recomendações e use o produto antes da data de validade expirar para evitar a necessidade de uma dosagem maior.

**Método utilizar antes de:** A data de validade encontra-se no certificado de análise ou na embalagem do produto.

O produto oferece desempenho ideal se armazenado a 0-10 °C(32-50 °F) e usado antes da data de validade. Se armazenado a até 25 °C(77 °F), o produto deve ser usado dentro de 3 meses após a entrega.

### ESPECIFICAÇÃO DO PRODUTO

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Propyl Laurate Unit PLU	8000		/g
Perda durante a secagem	-	3	%
Conteúdo total H <sub>2</sub> O vácuo	-	10000	/g
Bactéria Coliforme	-	30	/g
E. Coli	Não detectado		25 g
Salmonella	Não detectado		25 g
Moléstias pesadas		Máx. 20	mg/kg
Cinábrio		Máx. 5	mg/kg
Amélio		Máx. 3	mg/kg
Cádmio		Máx. 0,5	mg/kg
Mercurio		Máx. 0,5	mg/kg

O método analítico da enzima está disponível no Portal do Cliente (Customer Centre) ou com o seu representante de vendas.

### PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA E MANUSEIO

Enzimas são proteicas. A inalação de poeira ou injeção pode induzir sensibilização e causar reações alérgicas em indivíduos sensibilizados. Algumas enzimas podem irritar a pele, os olhos e as membranas mucosas em caso de contacto prolongado. Veja a FISPQ ou o Manual de Segurança para mais informações sobre como manusear o produto com segurança e o que fazer em caso de desastamento.

### COMPOSIÇÃO

Transportadores	Resina artificial
-----------------	-------------------

### CONFORMIDADE

O produto está em conformidade com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício definidas pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Food Chemicals Codex (FCC).

Os certificados Kosher e Halal encontram-se disponíveis no Customer Centre ou com o representante de vendas.


### STATUS GM

Este produto não é um OGM.

O produto enzimático é produzido por fermentação de um microrganismo que não está presente no produto final. O organismo de produção foi melhorado por meio de biotecnologia moderna.

### CERTIFICAÇÕES

A Novozymes é signatária do Pacto Global das Nações Unidas, da Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade Biológica e reportamos o nosso desempenho de sustentabilidade através da Global Reporting Initiative (GRI). Ver todos os nossos compromissos no âmbito da sustentabilidade em [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com).




© Novozymes A/S

## Lipozyme® 435

novozymes®  
2 de 2

### SEGURANÇA ALIMENTAR

A Novozymes conduziu uma análise de risco e preparou um plano APPCC descrevendo os pontos críticos de controle (PCCs). O plano APPCC é regulado por um amplo programa de pré-requisitos implementado nas de base Práticas de fabricação da Novozymes.

O produto é fabricado de acordo com o plano APPCC da Novozymes, as BPF e outros requisitos do Sistema de Gestão de Qualidade Novozymes.

O produto está em conformidade com os requisitos de pureza relacionados à micotoxinas recomendados pelo IECFA TACONS e FCC.

O produto é produzido em conformidade com a certificação FSSC 22000.



### EMBALAGEM

O produto está disponível em diferentes tipos de embalagem. Entre em contato com o representante de vendas para mais informações.

Novozymes Latin America Ltda.  
Rua professor Francisco Fabeiro 683  
CIP 20707-660 - Anápolis - Paraná  
Brasil

Tel: +55 41 641 1000  
Fax: +55 41 943 1443

Para mais informações, ou endereços de nossos escritórios, visite: [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)

A legislação, a regulamentação ou os direitos de terceiros podem impedir os clientes de importar, utilizar, processar ou revender os produtos aqui mencionados de determinada maneira. Sem um acordo em separado e por escrito entre o cliente e a Novozymes com essa finalidade, este documento não se constitui em uma representação ou garantia de qualquer espécie e está sujeito a alterações sem aviso prévio.

© Novozymes AS

## **APÊNDICE**

**APÊNDICE A:** Efeito de Diferentes Solventes na Reação de Esterificação – Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).

Tempo (h)	Percentual de esterificação (%)					
	Acetona	Metiletilcetona	Éter dietílico	Tolueno	Hexano	Heptano
0	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>f</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>f</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>e</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>f</sup>
0,5	0,5 ± 1,2 <sup>c</sup>	-	-	23,4 ± 8,4 <sup>c</sup>	33,7 ± 1,1 <sup>d</sup>	31,2 ± 1,5 <sup>e</sup>
1	-	-	-	45,4 ± 0,9 <sup>d</sup>	59,2 ± 1,4 <sup>c</sup>	52,6 ± 2,8 <sup>d</sup>
2	0,7 ± 0,7 <sup>c</sup>	-	4,4 ± 1,0 <sup>e</sup>	63,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	81,2 ± 1,2 <sup>b</sup>	75,8 ± 2,5 <sup>c</sup>
3	-	-	12,9 ± 1,4 <sup>d</sup>	71,4 ± 0,9 <sup>b,c</sup>	83,8 ± 1,2 <sup>b</sup>	79,4 ± 1,9 <sup>b,c</sup>
6	-	-	36,5 ± 0,7 <sup>c</sup>	<b>76,6 ± 1,9<sup>a,b</sup></b>	83,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	<b>83,8 ± 0,1<sup>a,b</sup></b>
24	14,0 ± 2,4 <sup>b</sup>	16,7 ± 1,1 <sup>b</sup>	<b>63,6 ± 0,5<sup>a</sup></b>	81,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	<b>87,5 ± &lt; 0,1<sup>a</sup></b>	87,0 ± 0,8 <sup>a</sup>
48	<b>21,3 ± 2,3<sup>a</sup></b>	<b>24,5 ± 1,1<sup>a</sup></b>	58,9 ± 0,7 <sup>b</sup>	80,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	87,5 ± < 0,1 <sup>a</sup>	88,0 ± 0,1 <sup>a</sup>

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de reação para um mesmo solvente.

**APÊNDICE B:** Efeito da Adição Inicial de Água na Reação de Esterificação – Condições reacionais: 30°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).

Tempo (h)	Percentual de esterificação (%)			
	Controle	0% v/v	0,075% v/v	0,125% v/v
0	0,0 ± 0,0 <sup>e</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>f</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>e</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>f</sup>
0,5	33,7 ± 1,1 <sup>d</sup>	32,3 ± 0,5 <sup>e</sup>	36,0 ± 2,3 <sup>d</sup>	33,5 ± 1,9 <sup>e</sup>
1	59,2 ± 1,4 <sup>c</sup>	57,3 ± 0,3 <sup>d</sup>	59,4 ± 3,3 <sup>c</sup>	54,7 ± 0,8 <sup>d</sup>
2	81,2 ± 1,2 <sup>b</sup>	79,1 ± 1,5 <sup>c</sup>	81,3 ± 1,4 <sup>b</sup>	78,0 ± 1,4 <sup>b</sup>
3	83,8 ± 1,2 <sup>b</sup>	83,6 ± 1,2 <sup>b</sup>	<b>83,3 ± 0,8<sup>a,b</sup></b>	81,3 ± 0,6 <sup>b,c</sup>
6	83,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	<b>83,2 ± 0,7<sup>a,b</sup></b>	84,9 ± 0,7 <sup>a,b</sup>	<b>83,0 ± 1,9<sup>a,c</sup></b>
24	<b>87,5 ± &lt; 0,1<sup>a</sup></b>	85,3 ± 0,8 <sup>a,b</sup>	87,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	85,6 ± 0,7 <sup>a</sup>
48	87,5 ± < 0,1 <sup>a</sup>	85,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	87,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	86,5 ± 1,4 <sup>a</sup>

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de reação para uma mesma adição de água.

**APÊNDICE C:** Efeito da Temperatura na Reação de Esterificação - Condições reacionais: 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; razão molar álcool:ácido 1:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).

Tempo (h)	Percentual de esterificação (%)				
	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C
0	0,0 ± 0,0 <sup>g</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>e</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>f</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>e</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>e</sup>
0,5	24,1 ± 1,3 <sup>f</sup>	33,7 ± 1,1 <sup>d</sup>	28,5 ± 1,9 <sup>e</sup>	27,3 ± 1,7 <sup>d</sup>	37,2 ± 2,6 <sup>d</sup>
1	49,3 ± 1,8 <sup>e</sup>	59,2 ± 1,4 <sup>c</sup>	52,9 ± 1,0 <sup>d</sup>	60,3 ± 1,3 <sup>c</sup>	63,4 ± 1,4 <sup>c</sup>
2	79,2 ± 1,1 <sup>d</sup>	81,2 ± 1,2 <sup>b</sup>	79,2 ± 1,3 <sup>c</sup>	79,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	76,2 ± 1,3 <sup>b</sup>
3	83,6 ± 0,9 <sup>c</sup>	83,8 ± 1,2 <sup>b</sup>	81,7 ± 1,2 <sup>b,c</sup>	79,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	<b>81,6 ± 0,7<sup>a</sup></b>
6	84,9 ± 0,9 <sup>b,c</sup>	83,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	81,6 ± 1,2 <sup>b,c</sup>	79,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	80,4 ± 0,7 <sup>a</sup>
24	<b>87,3 ± 0,6<sup>a,b</sup></b>	<b>87,5 ± &lt; 0,1<sup>a</sup></b>	82,9 ± 1,2 <sup>b</sup>	<b>84,6 ± &lt; 0,1<sup>a</sup></b>	81,7 ± 0,7 <sup>a</sup>
48	87,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	87,5 ± < 0,1 <sup>a</sup>	<b>86,5 ± 1,3<sup>a</sup></b>	85,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	82,5 ± 0,1 <sup>a</sup>

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de reação para uma mesma temperatura.



**APÊNDICE D:** Efeito da Razão Molar Álcool:Ácido na Reação de Esterificação - Condições reacionais: 25°C; 180 rpm; concentração de ácido 0,06 M; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).

Tempo (h)	Percentual de esterificação (%)		
	1:1	3:1	5:1
0	0,0 ± 0,0 <sup>g</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>f</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>g</sup>
0,5	24,1 ± 1,3 <sup>f</sup>	33,6 ± 1,4 <sup>e</sup>	28,3 ± 0,7 <sup>f</sup>
1	49,3 ± 1,8 <sup>e</sup>	58,7 ± 2,1 <sup>d</sup>	48,3 ± 0,8 <sup>e</sup>
2	79,2 ± 1,1 <sup>d</sup>	82,3 ± 0,2 <sup>c</sup>	72,5 ± 0,1 <sup>d</sup>
3	83,6 ± 0,9 <sup>c</sup>	87,8 ± 0,8 <sup>b</sup>	83,3 ± 1,4 <sup>c</sup>
6	84,9 ± 0,9 <sup>b,c</sup>	<b>89,9 ± 0,1<sup>a,b</sup></b>	90,0 ± < 0,1 <sup>b</sup>
24	<b>87,3 ± 0,6<sup>a,b</sup></b>	92,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	<b>92,5 ± &lt; 0,1<sup>a</sup></b>
48	87,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	92,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	92,5 ± < 0,1 <sup>a</sup>

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de reação para uma mesma razão molar.

**APÊNDICE E:** Efeito da Concentração de Ácido Propiônico na Reação de Esterificação - Condições reacionais: 25°C; 180 rpm; razão molar álcool:ácido 3:1; 3 g.L<sup>-1</sup> de enzima (Lipozyme® 435).

Tempo (h)	Percentual de esterificação (%)				
	0,06 M	0,1 M	0,2 M	0,3 M	0,5 M
0	0,0 ± 0,0 <sup>f</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>g</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>h</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>g</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>g</sup>
0,5	33,6 ± 1,4 <sup>c</sup>	28,4 ± 0,4 <sup>f</sup>	18,0 ± 0,2 <sup>g</sup>	14,7 ± 0,6 <sup>f</sup>	5,9 ± 0,5 <sup>f</sup>
1	58,7 ± 2,1 <sup>d</sup>	45,1 ± 0,5 <sup>e</sup>	35,7 ± 0,7 <sup>f</sup>	24,2 ± 0,1 <sup>e</sup>	9,6 ± 0,4 <sup>e</sup>
2	82,3 ± 0,2 <sup>c</sup>	73,9 ± 1,6 <sup>d</sup>	60,1 ± 0,2 <sup>e</sup>	40,9 ± 0,7 <sup>d</sup>	22,2 ± 0,4 <sup>d</sup>
3	87,8 ± 0,8 <sup>b</sup>	83,8 ± 0,8 <sup>c</sup>	76,0 ± 0,7 <sup>d</sup>	56,4 ± 0,6 <sup>c</sup>	30,6 ± 0,3 <sup>c</sup>
6	<b>89,9 ± 0,1<sup>a,b</sup></b>	93,0 ± 0,8 <sup>b</sup>	91,6 ± 0,3 <sup>c</sup>	83,4 ± 0,4 <sup>b</sup>	49,1 ± 0,2 <sup>b</sup>
24	92,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	<b>93,7 ± 0,1<sup>a,b</sup></b>	95,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	<b>95,2 ± &lt;0,1<sup>a</sup></b>	<b>57,1 ± 0,1<sup>a</sup></b>
48	92,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	95,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	<b>97,4 ± 0,2<sup>a</sup></b>	95,2 ± <0,1 <sup>a</sup>	57,4 ± 0,1 <sup>a</sup>

Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de reação para uma mesma concentração de ácido.

