



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

**SÍNTESE DO ÉSTER AROMÁTICO BENZOATO DE BENZILA VIA
ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA**

Elaine de Andrade Jasper

FLORIANÓPOLIS -SC

2018

ELAINE DE ANDRADE JASPER

**SÍNTESE DO ÉSTER AROMÁTICO BENZOATO DE BENZILA VIA
ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina apresentado como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Oliveira
Coorientadora: Me. Alessandra Cristina de Meneses

FLORIANÓPOLIS -SC

2018

Dedico este trabalho a todos os alunos que estudam para obter um futuro promissor através da ciência e tecnologia como base para seu desenvolvimento como ser humano. Dedico ainda a meus pais que como eternos educandários, sempre fizeram questão de me ensinar os valores para alcançar uma vida feliz e próspera.

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família, em especial meus pais e ídolos, Roberto e Neusa, que não mediram esforços para me proporcionar todo o amor e conforto que eu tanto precisava para vencer esta etapa. Sem vocês a realização desse sonho não seria possível. Sou grata também aos meus amigos pelas palavras de otimismo, força e apoio em todos os momentos. Agradeço especialmente meu companheiro de vida, Nando, por todo o carinho, paciência e incentivo nesta etapa de nossa trajetória.

" O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos."

Elleanor Roosevelt

RESUMO

Os processos considerados naturais representam uma gama promissora de estudo para a indústria, uma vez que os produtos gerados pelos mesmos atendem às demandas do consumidor contemporâneo. Neste cenário, a biotecnologia cresce e várias reações orgânicas são estudadas através da catálise enzimática, como a esterificação, possibilitando a síntese de compostos em escala industrial até então apenas produzidos por via química, como é o caso do benzoato de benzila, droga utilizada principalmente no tratamento da escabiose. No presente trabalho foi explorado o processo de síntese natural do benzoato de benzila via esterificação enzimática, utilizando três lipases imobilizadas, a Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM e Novozym 435 e duas lipases na forma livre, *Candida antarctica* fração B (Cal B) e a *Thermomyces lanuginosus* (NS 40116). Foram analisadas diferentes metodologias (batelada e batelada alimentada em agitador mecânico convencional e batelada em banho de ultrassom) bem como a variação de parâmetros experimentais (temperatura, razão molar, presença de solventes). Nos experimentos iniciais foi observado que o sistema constituído por anidrido benzoico: álcool benzílico (acil doador: acil receptor) foi mais eficiente para realizar a reação do que o composto por ácido benzoico: álcool benzílico. Comparando os solventes testados, os mais eficientes foram o terc-butanol e o 2-propanol, mas as maiores conversões foram atingidas com o sistema na ausência de solventes e com excesso de álcool benzílico. Dentre as razões molares testadas de anidrido: álcool (3:1, 1:1, 1:3, 1:9, 1:18), os melhores resultados foram encontrados para o sistema a 1:9. Nesta etapa, a conversão máxima chegou a ~77% com o biocatalisador Lipozyme TL IM (10 m/m % em relação aos substratos), temperatura de 50 °C e razão molar de 1:9. O desempenho da Lipozyme TL IM foi testado sob as temperaturas de 50, 60 e 70 °C. O maior valor de conversão para a Lipozyme TL IM foi de ~83% na temperatura de 60 °C, em 24 horas de reação, na razão molar 1:9 com 10 % de biocatalisador no sistema. O desempenho da enzima na forma livre *Thermomyces lanuginosus* (TL livre) e na forma imobilizada Lipozyme TL IM (ambas alcançaram ~77% de conversão) foi similar às enzimas imobilizadas, por outro lado a enzima livre *Candida antarctica* fração B (Cal B livre) alcançou 17% a mais de conversão em relação à forma imobilizada Novozym 435. O emprego do modo batelada alimentada trouxe conversões semelhantes ao modo batelada, de forma, portanto, a não justificar a implementação da alimentação controlada do anidrido à grandes escalas. O ultrassom, por outro lado, mostrou-se uma tecnologia vantajosa para a reação de síntese via esterificação enzimática do benzoato de benzila, com ela foi alcançado o maior valor de conversão do éster, ~88%, com a lipase Lipozyme RM IM (10% de biocatalisador), a 50 °C, em 8 horas de reação, no entanto, o suporte da enzima foi destruído durante o processo, impossibilitando o reuso. Pode-se concluir que a síntese do benzoato de benzila via esterificação enzimática é uma alternativa promissora para a produção deste composto e mais vertentes desta reação podem ser explorados no futuro, visando a otimização do processo.

Palavras-chave: Benzoato de Benzila; Esterificação Enzimática; Lipases; Agitação Convencional; Ultrassom.

ABSTRACT

The processes considered natural represent a promising range of study for the industry, since the products generated by them meet the demands of the contemporary consumer. In this scenario biotechnology grows and several organic reactions are studied through enzymatic catalysis, such as esterification, enabling the synthesis of compounds on industrial scale until then only produced chemically, as is the case of benzyl benzoate, a drug used mainly in the treatment of scabies. In the present work the natural synthesis process of benzyl benzoate via enzymatic esterification using three immobilized lipases, Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM and Novozym 435 and two lipases in free form, *Candida antarctica* fraction B (Cal B) and to *Thermomyces lanuginosus* (NS 40116). Different methodologies (batch and batch fed on conventional mechanical stirrer and batch in ultrasonic bath) were analyzed for the variation of experimental parameters (temperature, molar ratio, presence of solvents). In the initial experiments it was observed that the system consisting of benzoic anhydride: benzyl alcohol (acyl donor: acyl receptor) was more efficient to carry out the reaction than the benzoic acid: benzylic acid compound. Comparing the solvents tested, the most efficient were tert-butanol and 2-propanol, but the highest conversions were achieved with the system in the absence of solvents and with excess benzyl alcohol. Among the anhydride tested molar ratios: alcohol (3:1, 1:1, 1:3, 1:9, 1:18), the best results were found for the 1:9 system. In this step, the maximum conversion reached ~ 77% with the biocatalyst Lipozyme TL IM (10 m / m% in relation to the substrates), temperature of 50 °C and molar ratio of 1: 9. The performance of Lipozyme TL IM was tested under the temperatures of 50, 60 and 70 ° C. The highest conversion value for Lipozyme TL IM was ~ 83% at 60 ° C, in 24 hours reaction, at the 1: 9 molar ratio with 10% biocatalyst in the system. The enzyme performance in the free form *Thermomyces lanuginosus* (TL free) and in the immobilized form Lipozyme TL IM (both reached ~ 77% conversion) was similar to immobilized enzymes, on the other hand the free enzyme *Candida antarctica* fraction B (free Cal B) was 17% higher than the Novozym 435 immobilized form. The use of the fed batch mode led to conversions similar to the batch mode, so it did not justify its implementation of controlled anhydride feed at large scales. Ultrasound, on the other hand, proved to be an advantageous technology for the synthesis reaction via enzymatic esterification of benzyl benzoate, whereby the highest conversion value of the ester was achieved, ~88% conversion with lipase Lipozyme RM IM (10% of biocatalyst) at 50 ° C in 8 hours of reaction, however, the enzyme support was destroyed during the process, making it impossible to reuse. It can be concluded that the synthesis of benzyl benzoate via enzymatic esterification is a promising alternative for the production of this compound and more strands of this reaction can be explored in the future, aiming the optimization of the process.

Keywords: Benzyl benzoate; enzymatic esterification; lipases; conventional agitation; ultrasound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Restrição da mobilidade da enzima após sua imobilização em suporte sólido e descrição do substrato (S) e difusão do produto (P) através da partícula do catalisador.	17
Figura 2: Esquema do princípio da reação de esterificação	22
Figura 3: Estrutura química do benzoato de benzila.	26
Figura 4: Esquema da reação de esterificação do benzoato de benzila a partir do ácido benzoico como acil doador e álcool benzílico como acil receptor.	27
Figura 5: Esquema da reação de esterificação do benzoato de benzila a partir do anidrido benzoico como acil doador e álcool benzílico como acil receptor.	27
Figura 6: Influência dos solventes terc-butanol e 2-propanol e de diferentes lipases na esterificação enzimática do benzoato de benzila, a 50 °C, 10 % de catalisador, e razão molar 1:9 (anidrido benzoico: álcool benzílico).	37
Figura 7: Conversão do benzoato de benzila através da reação de esterificação enzimática com diferentes biocatalisadores e na ausência de solvente no sistema reacional, em condições fixas de 50°C, 10% de catalisador, e razão molar 1:9 (anidrido benzoico: álcool	38
Figura 8: Influência de diferentes razões molares (anidrido benzoico: álcool benzílico) entre três biocatalisadores, a 50 °C, 10 % de catalisador e 24 h de reação. Razões molares 3:1, 1:1 e 1:3 contém solvente propanol enquanto 1:9 e 1:18 são livres de solvente.....	39
Figura 9: Influência da temperatura na cinética de esterificação enzimática do benzoato de benzila, com 10% de catalisador no sistema, na razão molar 1:9 (anidrido benzoico : álcool benzílico), e 24 h de reação.	41
Figura 10: Cinética de conversão do benzoato de benzila utilizando a Cal B e a TL livres como catalisadores, a 50 °C, 10% de catalisador, e razão molar 1:9 (anidrido benzoico: álcool benzílico).	42
Figura 11: Valores de conversão do benzoato de benzila na reação de esterificação enzimática em modo batelada alimentada, a 50 °C, 10% de catalisador (Lipozyme TL IM), e razão molar 1:18 (anidrido benzoico: álcool benzílico).	44
Figura 12: Cinética de conversão do benzoato de benzila em banho de ultrassom, a 50 °C, 10% de enzima, na razão molar de 1:9 (anidrido benzoico: álcool benzílico), utilizando três diferentes catalisadores (enzimas imobilizadas).....	45
Figura 13: Cromatograma obtido a partir da análise de CG acoplado com espectrometria de massas do meio reacional ao final de 12 h de esterificação entre anidrido benzoico e álcool benzílico (1:9) utilizando a Lipozyme TL IM como biocatalisador (10 %)......	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 OBJETIVOS.....	14
1.1.1 Objetivo Geral.....	14
1.1.2 Objetivos Específicos	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Enzimas.....	15
2.1.1 Imobilização de enzimas	16
2.1.2 Lipases.....	18
2.2 Biotecnologia na síntese de ésteres aromáticos	20
2.2.1 Esterificação enzimática.....	21
2.3 Catálise enzimática em ultrassom.....	22
2.4 Ésteres aromáticos	23
2.4.1 Benzoato de benzila	25
2.5 Considerações sobre o estado da arte	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 MATERIAIS.....	29
3.1.1 Biocatalisadores	29
3.1.2 Substratos utilizados na reação de esterificação	29
3.1.3 Solventes	29
3.1.4 Equipamentos	30
3.2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS	30
3.2.1 Avaliação da ausência ou presença de diferentes solventes orgânicos no meio reacional utilizando diferentes biocatalisadores.....	30
3.2.2 Variação da razão molar dos substratos anidrido: álcool.....	31
3.2.3 Cinética de conversão utilizando enzima imobilizada como catalisador.....	32
3.2.4 Cinética de conversão utilizando enzima livre como catalisador	33
3.2.5 Cinética de conversão em modo batelada alimentada com enzima imobilizada como catalisador.....	33
3.2.6 Cinética de conversão em banho de ultrassom.....	34
3.2.7 Quantificação do Benzoato de Benzila	34
3.2.8 Determinação de produtos intermediários presentes no meio reacional via Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Efeito da ausência ou presença de diferentes solventes orgânicos no meio reacional e análise do biocatalisador mais eficaz para a síntese do benzoato de benzila.....	36

4.2 Efeito da razão molar dos substratos anidrido: álcool na síntese enzimática do benzoato de benzila	38
4.3 Efeito da temperatura na cinética de conversão utilizando enzima imobilizada como catalisador	40
4.4 Análise da cinética de conversão utilizando enzima livre como catalisador	41
4.5 Efeito da reação em modo batelada alimentada com enzima imobilizada como catalisador na conversão do produto.....	43
4.6 Efeito do uso do ultrassom na síntese enzimática do benzoato de benzila.....	44
4.7 Identificação dos produtos da reação	45
5. CONCLUSÃO.....	47
5.1 Sugestões para trabalhos futuros	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia é considerada uma área da ciência de alto impacto e influência em diversos setores industriais. Em um cenário onde os consumidores estão cada vez mais atentos aos rótulos, bem como a procedência de seus produtos, e preocupados com a sustentabilidade e saúde, os processos biotecnológicos acabam por ganhar não somente espaço, mas também preferência e visibilidade. A biocatálise constitui uma tecnologia limpa, ou seja, caracteriza processos considerados “verdes” e gera, portanto, produtos classificados como naturais, de forma a atender às exigências do mercado atual (SÁ et al., 2017).

Dentre os processos catalíticos nos quais as enzimas desempenham papel fundamental como biocatalisadores pode-se citar a esterificação, que é um processo que pode ser melhorado com a aplicação da biotecnologia, uma vez que constitui essencialmente uma reação considerada lenta, e o emprego de biocatalisadores aumenta a velocidade da mesma, deixando o processo mais atraente e viável. A reação de esterificação catalisada por enzimas é denominada como esterificação enzimática. Dentre as vantagens da utilização de enzimas, destacam-se as demandas relativamente baixas de energia e conseqüentemente baixos custos, em decorrência do fato de que os processos enzimáticos são realizados sob condições amenas de temperatura e pressão (AITKEN, 1993). O que torna interessante o emprego da esterificação enzimática na síntese de ésteres aromáticos, que são amplamente utilizados pela indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética.

O benzoato de benzila é um éster aromático de valor para a indústria farmacêutica, o qual pode ser utilizado por exemplo como solvente ou na composição de pesticidas (JOHNSON et al., 2017). Dentre suas aplicações, destaca-se a utilização como droga no tratamento da escabiose (infecção de pele altamente contagiosa), uma vez que apresenta maior eficiência contra a doença em relação a outros medicamentos destinados à mesma função, como a ivermectina e a permetrina (LY, 2009; BACHEWAR et al., 2009; THAWANI et al., 2009). Apesar da importância do benzoato de benzila, este composto ainda não foi bem explorado na literatura. Ele já foi obtido por esterificação enzimática, porém em conversões consideradas baixas e inviáveis industrialmente, e por transesterificação, processo com custos relativamente altos, dificultando também a aplicação deste na indústria (SHIKI, 2018; GRYGLEWICZ, 2000). Por esta razão, sua produção em escala industrial atualmente se limita à síntese via rota química.

Face ao exposto, justifica-se a importância da análise e avaliação das condições e parâmetros de reação de síntese do benzoato de benzila, via esterificação enzimática. A

viabilidade de aplicação de um processo deve ser avaliada por diversos aspectos, e para isto é de suma importância que os parâmetros e condições de reação sejam bem explorados e analisados, visando a melhoria e eficiência do processo para possíveis futuras aplicações industriais. Por esta razão, a esterificação enzimática do benzoato de benzila foi explorada no presente trabalho sob diversas formas, através do processo utilizando agitador mecânico convencional, bem como em equipamento de ultrassom, em batelada e batelada alimentada, e variando-se parâmetros operacionais, como diferentes lipases imobilizadas como catalisadores, temperatura, razão molar, e presença de solvente orgânico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi explorar o processo de síntese do benzoato de benzila, via esterificação enzimática, de maneira a avaliar o desempenho de enzimas imobilizadas e livres como biocatalisadores, sob diferentes condições de processo, visando a viabilização técnica do processo, almejando um aumento de escala.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho de diferentes substratos na reação de esterificação em batelada: anidrido benzoico ou ácido benzoico como doador do grupo acila e álcool benzílico como receptor acila;
- Avaliar e comparar o desempenho de diferentes lipases imobilizadas e livres como biocatalisadores na síntese do benzoato de benzila;
- Avaliar o desempenho dos solventes terc-butanol e propanol na síntese enzimática do benzoato de benzila;
- Avaliar a eficiência do sistema na ausência de solventes orgânicos;
- Avaliar a eficiência do processo de esterificação enzimática do benzoato de benzila em batelada alimentada;
- Avaliar parâmetros reacionais como temperatura e razão molar entre os substratos frente à conversão;
- Avaliar o desempenho das enzimas livres em relação às enzimas imobilizadas na conversão do benzoato de benzila pela esterificação enzimática;
- Avaliar a eficiência do emprego do ultrassom no processo de síntese enzimática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será realizada uma breve revisão sobre o estado da arte no que concerne à importância e aplicabilidade da biotecnologia, mais especificamente em relação a utilização de enzimas para catalisar processos. Com base no exposto na introdução, levando em consideração os objetivos delineados para este trabalho, a ênfase será dada especialmente à síntese do benzoato de benzila através do processo de esterificação enzimática.

2.1 Enzimas

As enzimas são essencialmente definidas como proteínas, presentes em todas as células vivas, sem os quais a vida não existiria da forma na qual é atualmente conhecida. A maioria das enzimas são proteínas na forma globular, que atuam de maneira altamente específica em reações de catálise em sistemas biológicos. Elas são capazes de acelerar os processos químicos, sem consumir os substratos, caracterizando então ótimos catalisadores de reações. Além disto elas possuem a capacidade de participar de processos de quebra de nutrientes complexos em substâncias mais simples, de modo a facilitar a absorção dos mesmos pelo organismo, e assim exercem funções vitais nos seres vivos (NELSON et al., 2004).

A natureza proteica das enzimas permite que elas apresentem uma alta especificidade pelo substrato, característica que se destaca positivamente quando comparada a outros catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos. Esta característica se apresenta como uma grande vantagem no meio industrial, uma vez que produtos secundários acabam por gerar mais gastos financeiros para a empresa, a qual precisa arcar com custos para a purificação do produto de interesse, bem como o tratamento dos efluentes gerados (AITKEN, 1993).

O princípio de funcionamento das enzimas é bem estabelecido na literatura. As enzimas se ligam a substratos ou reagentes específicos, de maneira a formar um complexo conhecido por enzima-substrato, onde ocorre a catálise e então finalmente a transformação dos substratos em produtos. Tal mecanismo é proposto por Michaelis-Menten. Para que esta catálise enzimática ocorra, as moléculas de substrato devem imprescindivelmente possuir uma conformação adequada que possibilite a ligação aos sítios ativos da enzima, ou seja, respeitando sua especificidade e caracterizando o conhecido sistema chave-fechadura (BORZANI et al., 2001).

Mais de 1500 enzimas já são conhecidas, elas se diferem entre si por sua estrutura e pelo substrato pelo qual apresentam afinidade. O mecanismo de ação da enzima é caracterizado não só por sua estrutura, mas também pelo complexo formado entre a enzima, o substrato, e os produtos intermediários e finais (FERSHT, 1985). As enzimas acompanharam a história do ser humano desde os primórdios, na produção de pão, queijo, iogurte e bebidas alcoólicas, embora sua existência não fosse devidamente conhecida. Atualmente as enzimas ganharam espaço através da biotecnologia, e são cada vez mais exploradas com o intuito de viabilização de projetos mais sustentáveis. Trata-se de compostos biodegradáveis, atóxicos e que podem ser produzidos em grandes quantidades a partir da biotecnologia. Setores como o fármaco, alimentício e o têxtil, já desfrutam das aplicações das enzimas em grande escala (Smith, 1996).

A biocatálise é um processo considerado “verde”, ou seja, uma tecnologia limpa para a síntese de diversos compostos, incluindo os ésteres aromáticos. O produto resultante deste processo também é considerado natural, e em um cenário onde a importância de processos sustentáveis e limpos ganha cada vez mais visibilidade e preferência, as enzimas representam uma gama promissora de possibilidades de aplicações. Além de proporcionar vantagens como a alta especificidade, os processos enzimáticos podem ser realizados em condições amenas de temperatura e pressão, com demandas relativamente baixas de energia, o que as torna interessantes do ponto de vista industrial (SÁ et al., 2017).

2.1.1 Imobilização de enzimas

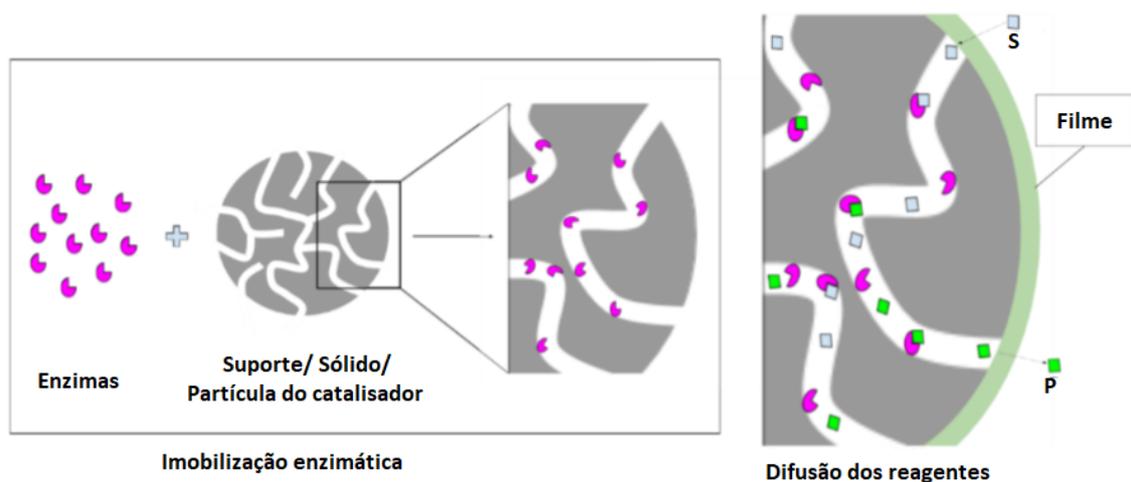
A utilização de enzimas na forma livre para processos de biocatálise homogênea apresentam algumas limitações e desvantagens do ponto de vista financeiro, pois elas acabam muitas vezes por possuir baixa solubilidade, instabilidade térmica e mecânica, e não podem ser recicladas para reuso, o que acarreta mais custos no processo. Neste cenário, as enzimas imobilizadas se apresentam como uma alternativa viável e prática, uma vez que a técnica de imobilização faz com que a atividade, a seletividade e a especificidade enzimática sejam otimizadas, além de aumentar a estabilidade estrutural e permitir a reciclagem e reutilização destas enzimas, resultando assim em um processo mais econômico e eficiente (NARWAL et al., 2016).

O termo imobilização é empregado de forma geral para descrever o fenômeno de retenção de uma biomolécula na parte interna de um sistema analítico. No caso da imobilização de enzimas, o termo é utilizado para descrever o confinamento da proteína em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso ou em solvente orgânico. Existem, no entanto, diversos métodos de

imobilização de enzimas e o mesmo deve ser selecionado levando-se em conta fatores como a atividade global do catalisador, toxicidade dos reagentes de imobilização, propriedades hidrodinâmicas e principalmente o custo do procedimento (MENDES et. al. 2011; MATEO et. al. 2007).

Quando comparadas às enzimas livres, as enzimas imobilizadas apresentam algumas vantagens, como o aumento no número de moléculas por unidade de área, maior eficiência de reação, elas possibilitam a reutilização e uso contínuo da enzima, geram um produto livre de enzimas, evitam contaminação microbiana no processo, além do aumento nas propriedades cinéticas e no controle do processo catalítico (GARCIA-GALAN et al. 2011). A agitação se faz necessária em alguns meios reacionais para garantir uma boa homogeneização do meio, neste cenário, as enzimas imobilizadas também se destacam por sua elevada resistência mecânica. Vale ressaltar que apesar da perda de atividade por parte da enzima no decorrer do tempo, o suporte tem capacidade de ser renovado com enzimas novas e ativas (YAHYA et al., 1998). A figura 1 ilustra o esquema do processo de imobilização enzimática.

Figura 1: Restrição da mobilidade da enzima após sua imobilização em suporte sólido e descrição do substrato (S) e difusão do produto (P) através da partícula do catalisador.



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2015).

Após a imobilização de uma enzima em um suporte polimérico poroso (Figura 1) ocorre a restrição da mobilidade da enzima (ligada à superfície dos poros), e conseqüentemente, a difusão dos substratos até o sítio ativo da enzima (que agora fica alocado dentro dos poros do suporte) desempenham um papel fundamental para que a reação ocorra de forma eficiente. A partir deste momento, diversos fenômenos de transferência de massa estão presentes.

Inicialmente, ocorre a difusão dos reagentes através do filme estático que envolve a superfície da partícula do suporte. Em seguida os substratos se difundem pelos poros do suporte à procura dos sítios ativos das enzimas (difusão intrapartícula), quando os substratos atingem um sítio ativo eles são adsorvidos e a reação acontece. Desta forma, ocorrem reações de superfície que envolvem a formação ou conversão dos intermediários adsorvidos, possivelmente incluindo etapas de difusão superficial. Em seguida ocorre a dessorção de produtos dos sítios ativos das enzimas, que por sua vez se difundem no interior dos poros a fim de deixar a partícula polimérica. Por fim ocorre a difusão dos produtos através do filme que envolve a partícula sólida, e estes então acabam por se dispersar no meio reacional (DUMESIC; HUBER; BOUDART, 2008).

A taxa e performance da reação de catálise é, portanto, controlada pelo fenômeno de difusão através do filme e nos poros, além da influência das condições de reação cinéticas intrínsecas. O filme estático que envolve o sólido é formado pelos reagentes e produto, e acaba por dificultar a movimentação tanto dos próprios reagentes para o interior do sólido, onde estão as enzimas, quanto a difusão dos produtos para o exterior da partícula. Por esta razão, é importante que a reação ocorra em meio agitado, com o intuito de evitar a estagnação de reagentes ao redor da partícula catalisadora. Quanto ao meio interno da partícula, as limitações reacionais estão associadas com o tamanho dos poros e dos substratos, onde poros maiores são mais desejáveis para facilitar o fluxo (TISCHER; WEDEKIND, 1999).

Para superar as limitações e dificuldades relatadas quanto à utilização de enzimas imobilizadas, pesquisadores dedicaram seus esforços para desenvolver técnicas mais avançadas de imobilização, de forma a alcançar maior atividade e seletividade enzimática, menores custos de processo e maior estabilidade estrutural (BADGUJAR, BHANAGE 2015; FERRAZ et al. 2015; NARWAL 2016). Atualmente muitas enzimas imobilizadas comerciais já são utilizadas em diversos processos industriais.

2.1.2 Lipases

As lipases são uma classificação de enzimas, pertencentes ao grupo das hidrolases, as quais são capazes de catalisar a conversão de triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol. As lipases são reconhecidas por seu alto potencial biotecnológico, pois atuam como catalisadores em reações de síntese orgânica em meio não aquoso, mantendo-se estáveis nos mesmos, e assim simplificando processos de alto rendimento. Outras vantagens das lipases são sua alta enantioseletividade e grande especificidade pelo substrato. As lipases são consideradas

biocatalisadores versáteis, utilizadas em detergentes para hidrolisar gorduras, no tratamento de efluentes oleosos, na indústria de cosméticos, farmacêutica e agroquímica. Estas enzimas têm sido também utilizadas em reações de transesterificação, com o objetivo de transformar óleos em biodiesel (MESSIAS et al., 2011; MENDES et al., 2014; SÁ et al., 2017). As lipases digestivas, presentes nos seres vivos, também são de grande importância para a utilização de gorduras como fonte de energia (VILLENEUVE et al. 2010).

As lipases são encontradas de forma abundante na natureza, em plantas (grãos, sementes oleaginosas), animais (em alguns órgãos como o fígado, pâncreas e estômago), em algumas bactérias, mas suas principais fontes de obtenção para aplicações industriais são os fungos e leveduras (GUPTA, KUMARI, SYAL, SINGH, 2015). Uma vez que os ésteres produzidos por biocatálise podem ser rotulados como “naturais”, as lipases passam a protagonizar estudos nesta direção, para expandir as vias de síntese dos mesmos e assim atender às expectativas do mundo moderno, que anseia cada vez mais por processos “verdes” e sustentáveis. Neste contexto, a aplicação das lipases imobilizadas já explorada para a síntese de compostos como o acetato de eugenila (SÁ et al., 2017), o acetato de benzila (BADGUJAR et al. 2016), acetato de amila, dentre diversos outros (BADGUJAR et al. 2015).

Atualmente, as lipases comerciais imobilizadas mais utilizadas para reações de esterificação são as produzidas pela empresa Novozymes®, as quais diferem entre si pela fonte de lipase (microrganismo responsável pela produção da enzima), material de suporte, dentre outros aspectos, assim como descrito na Tabela 1. Tais enzimas demonstraram atividade satisfatória em diversos estudos, sendo que a Novozym 435® foi a de maior destaque, devido a sua alta estabilidade e atividade enzimática frente a diversos processos químicos (BEZBRADICA et al., 2017).

O método de imobilização das enzimas, bem como a fonte de lipase, influencia diretamente na interação entre o substrato e o catalisador, de forma a impactar no grau de conversão da reação e conseqüentemente, na eficiência do processo. A Novozym 435® é preparada via ativação interfacial da superfície hidrofóbica do suporte, enquanto a Lipozyme RM-IM e a Lipozyme TL-IM são imobilizadas via troca aniônica (MARTINS et al., 2014). Há disponível na literatura diversos trabalhos que utilizam essas enzimas imobilizadas como biocatalisadores de esterificação e transesterificação enzimática na síntese de ésteres alifáticos e ésteres aromáticos. Ainda, pesquisadores avaliaram a eficácia das três lipases anteriormente citadas, com o intuito de compará-las, através da realização da síntese do laurato de cinamila. Após duas horas de reação, a conversão final foi de 60% com a Novozym 435®, 16,5% com a Lipozyme TL-IM, e apenas 9% com a Lipozyme TL-IM. Este resultado evidenciou a influência

das condições de imobilização na eficiência do processo e da conformação do sítio ativo das enzimas provenientes de diferentes microrganismos (YADAV, DHOOT, 2009).

Tabela 1: Propriedades físicas e fonte de algumas lipases comerciais imobilizadas da Novozymes®.

Propriedades	Novozym 435®	Lipozyme TL-IM	Lipozyme RM-IM
Fonte de lipase	<i>Candida antarctica B</i> lipase	<i>Thermomyces</i> <i>lanuginosus</i> lipase	<i>Rhizomucor miehei</i> lipase
Material de suporte	Lewatit VP OC 1600 / resina acrílica macroporosa com superfície hidrofóbica.	Silicato de gel hidrofílico.	Duolite ES562 / resina de troca aniônica fraca, baseada em copolímeros de fenol- formaldeído.
Temperatura (°C)	30-60	50-75	50-75
pH	5-9	6-8	6-8
Atividade Enzimática (U/g)	54,6 ± 0,7	19,3 ± 0,4	58,8 ± 0,9

Fonte: (HAIGH et al., 2013; BASSO et al., 2016; SÁ et al., 2017)

2.2 Biotecnologia na síntese de ésteres aromáticos

A biotecnologia é considerada um campo multidisciplinar e caracteriza-se fundamentalmente pela tecnologia que utiliza organismos vivos (ou partes constituintes deles) para modificar produtos, com o foco em unir a viabilidade econômica a processos sustentáveis (BICAS et al., 2010). A biotecnologia, tanto por via microbiana quanto por via enzimática, já é amplamente aplicada em processos de catálise, e neste cenário, a síntese de ésteres aromáticos através da catálise enzimática, utilizando-se lipases, apresenta-se como um campo promissor (STENCEL, LEADBEATER, 2014).

A maior segurança dos processos biocatalíticos, em relação às condições ambientais e de purificação do produto, quando comparados aos químicos, é considerada uma grande

vantagem. Deste modo, é possível afirmar que a aplicação de enzimas como biocatalisadores em processos industriais constitui uma boa alternativa às metodologias convencionais (WAGHMARE et al., 2015).

As enzimas são os principais catalisadores biotecnológicos e dentre as vantagens da biocatálise enzimática, destaca-se a alta especificidade e seletividade das enzimas, bem como o alto rendimento sob condições consideradas amenas de reação (baixa temperatura e pressão), o que resulta em um baixo consumo de energia para a realização do processo, além de fatores como a redução da formação de subprodutos e possibilidade de reutilização do biocatalisador (FERRAZ et al. 2015).

2.2.1 Esterificação enzimática

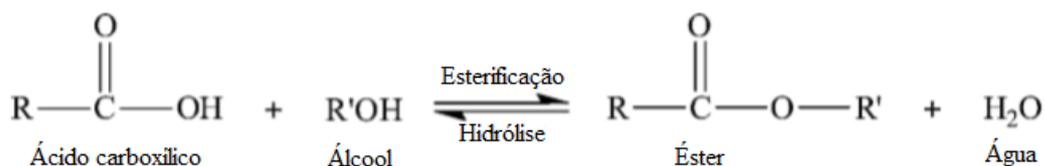
A reação de esterificação consiste basicamente na condensação do ácido carboxílico livre (acil doador) e o álcool (acil receptor), o que resulta na formação de éster e água. A reação de esterificação pode ocorrer em sistemas com um baixo teor de água, com a utilização de solventes ou até mesmo em meios com ausência de solvente. O emprego do solvente é considerado interessante pois aumenta a solubilidade de substratos e produtos, deslocando o equilíbrio termodinâmico da reação para favorecer a esterificação, e não a hidrólise (AKACHA; GARGOURI, 2015).

Por outro lado, a utilização de solventes pode apresentar algumas desvantagens associadas ao custo de separação e purificação do produto de interesse, bem como a possível presença de substâncias residuais nocivas no produto final, o que poderia ser prejudicial para a saúde humana. Neste contexto, a síntese de ésteres aromáticos mediada por lipases em sistemas isentos de solventes pode representar uma boa alternativa para garantir uma maior pureza e menores custos de recuperação do produto (SILVA et al., 2015).

Na reação de esterificação, são vários os fatores que influenciam o desempenho das lipases, dentre eles a natureza do substrato e do solvente, a temperatura e a quantidade de água (EISENMENGER, 2010). A água compõe um dos produtos de esterificação, o qual em excesso pode representar um fator negativo na velocidade da reação. Algumas enzimas parecem ter sua atividade inibida em meios com excesso de água (OGNJANOVIC et al., 2009). Por outro lado, uma quantidade mínima de água se faz indispensável para que a enzima mantenha seu estado tridimensional, além de contribuir também para manter a estabilidade e a atividade do sítio de polaridade (YAHYA et al., 1998). A razão molar do substrato também é um fator de alta

influência na reação, e para melhorar o rendimento da mesma, opta-se geralmente pelo excesso de álcool (GRAEBIN et al., 2012). A Figura 2 ilustra o princípio da reação de esterificação.

Figura 2: Esquema do princípio da reação de esterificação



Fonte: Autor.

Como a reação de esterificação é considerada lenta, a utilização de catalisadores apresenta-se como uma opção desejável, para que assim a reação possa ser acelerada, sejam eles homogêneos, heterogêneos ou enzimas. O processo com o emprego da enzima é denominado, portanto como esterificação enzimática. A escolha do catalisador ideal é de extrema importância para que a reação de esterificação tenha uma boa eficiência. Para isto, alguns atributos são levados em consideração para qualificar e justificar a escolha do catalisador, como uma boa seletividade para a produção dos produtos desejados, com produção mínima de produtos secundários indesejáveis. O catalisador deve ter um desempenho estável nas condições de reação propostas (tempo e temperatura), além da possibilidade de reutilização em outros ciclos de reação. Também é importante que os reagentes consigam acessar os sítios ativos da enzima, de forma a garantir altas taxas de difusão (RAJENDRAN et al., 2009).

2.3 Catálise enzimática em ultrassom

Os métodos convencionais são amplamente utilizados na catálise enzimática, como agitadores orbitais ou mecânicos na escala de bancada visando a ampliação de escala para reatores encamisados. No entanto, pesquisadores dedicaram então seus esforços para explorar a biocatálise em meios reacionais não convencionais, nas quais foram incluídos os fluidos supercríticos, fluidos iônicos, solventes orgânicos, fases sólidas e gasosas (BALEN, 2016).

Neste contexto, um sistema interessante seria a cavitação ultrassônica, uma técnica promissora que além da sua eficiência, baixos requisitos instrumentais e vantagens econômicas permitem que o ultrassom seja considerado uma tecnologia sustentável, e que muitas vezes

acaba por apresentar grandes vantagens em relação ao tempo de processamento, quando comparado a agitação mecânica convencional (ROKHINA et al., 2009; BALEN, 2016).

A mistura e dispersão do meio reacional é de extrema importância, pois impacta diretamente na transferência de massa entre o substrato e a enzima e conseqüentemente na velocidade de reação. A utilização de ultrassom de alta intensidade (baixa frequência) é eficaz para promover esta mistura, contribuindo com o processo. As ondas sonoras emitidas pelo ultrassom se propagam no meio reacional de forma alternada, causando então intervalos de alta e baixa pressão. No intervalo de baixa pressão pequenas bolhas de vácuo são geradas no meio, até atingir um volume no qual não conseguem mais absorver energia e então elas colapsam de forma abrupta. Tal fenômeno é denominado de cavitação. É válido ressaltar, porém, que a influência de tais ondas ultrassônicas na estabilidade enzimática é altamente específica e dependente do catalisador e dos parâmetros de reação (HIELSCHEIR, 2005).

2.4 Ésteres aromáticos

Os ésteres aromáticos são definidos basicamente como ésteres que possuem um anel aromático em sua estrutura molecular. Estes ésteres estão amplamente presentes na natureza e são conhecidos por contribuir, em sua maioria, com agradáveis atributos organolépticos, que permitem assim uma grande variedade de aplicações na indústria de alimentos, bem como na indústria farmacêutica (GAO et al., 2016). Tais compostos são geralmente obtidos por extração direta de plantas, porém as desvantagens do produto tornam tal técnica inadequada para aplicações industriais. Trata-se de um processo que possui dependência sazonal e climática da matéria prima, além do baixo rendimento e altos custos de produção necessários para extração e purificação (SANTOS et al., 2016).

Por outro lado, a produção química de ésteres aromáticos também possui vários inconvenientes e impactos ambientais nos processos de produção e purificação, como o uso de substâncias químicas e catalisadores considerados perigosos, solventes tóxicos, e a necessidade condições mais intensas de operação (altas temperaturas e pressões). Além disso, a síntese química acaba por apresentar altos custos devido à falta de seletividade do substrato, a necessidade de remoção de subprodutos, longos tempos de reação, consumo excessivo de energia e possível depreciação dos equipamentos por corrosão. Ademais, os produtos finais não podem ser legalmente rotulados como naturais e os ésteres sintetizados quimicamente contêm vestígios de impurezas tóxicas, que podem resultar em complicações de saúde para os seres

humanos. Por todos esses fatores tornam, o processo se torna industrialmente indesejável (MANAN et al., 2016).

Ademais, ésteres aromáticos produzidos por métodos microbianos ou enzimáticos são rotulados como naturais de acordo com as Legislações dos Estados Unidos e da Europa, satisfazendo assim a tendência de consumo de produtos naturais em vários setores (TOMKE, RATHOD 2015). A otimização do processo pode ser alcançada através da análise de estudos que avaliam os efeitos dos parâmetros de reação, visando alcançar um alto rendimento e uma alta conversão do produto (STENCEL; LEADBEATER, 2014).

Diferentes rotas para a síntese de ésteres aromáticos vêm sendo estudadas nas últimas décadas, e grande parte dos trabalhos utilizam a rota biotecnológica utilizando enzimas imobilizadas como biocatalisadores da esterificação. Alguns exemplos estão listados na Tabela 2.

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

Lipases	Produto	Conversão (%)	Fonte
<i>Rhizopus</i> sp.	Laurato de isoamila	88	(MACEDO et al., 1997)
<i>Rhizopus</i> sp.	Propionato de isoamila	72	(MACEDO et al., 1997)
<i>Alcaligenes</i> sp.	Acetato de isopropila	82	(MACEDO et al., 1997)
<i>Candida antarctica</i>	Butirato de etila	72,9	(NOGALES et al., 2005)
<i>Mucor miehei</i>	Acetato de vinila	100	(MAJUMDER et al., 2006)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Acetato de butila	80	(SALAH et al., 2007)
<i>Candida antarctica</i>	Palmitato de	27	(LERIN et al., 2011)

	ascorbila		
<i>Candida antarctica</i>	Carbonato de glicerol	99	(WAGHMARE et al., 2015)
<i>Candida antarctica</i>	Ascorbil oleato	90	(BALEN, 2016)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Benzoato de eugenila	66	(MANAN et al., 2018)
<i>Candida rugosa</i> <i>Geotrichum candidum</i>	Butirato de isoamila	80	(ARAGÃO et al., 2009)

Fonte: SHIKI, 2018.

Neste cenário, a produção biotecnológica destes ésteres aromáticos constitui uma alternativa vantajosa frente à extração da fonte natural e à produção química, de forma a representar uma proposta promissora para aplicações industriais. Alguns estudos foram realizados nesta área com diferentes lipases imobilizadas como biocatalisadores heterogêneos na síntese de diversos compostos, como o acetato de benzila (GARLAPATI et al., 2013), o acetato de cinamila (BADGUJAR et al., 2015) e acetato de 2-metil benzila (DHAKA et al., 2012).

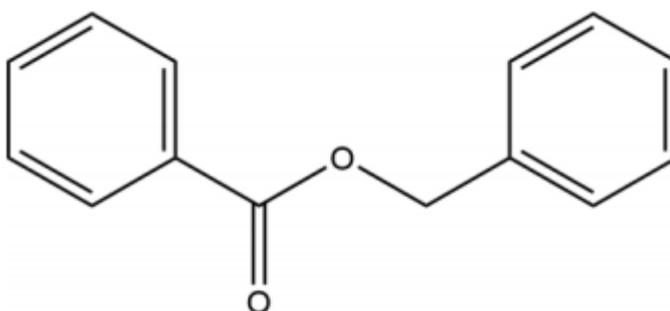
2.4.1 Benzoato de benzila

O benzoato de benzila é um éster aromático, utilizado principalmente como medicamento para o tratamento da escabiose (uma infecção de pele altamente contagiosa), tendo aplicação também na indústria de alimentos, na formulação de aromas como o de maçã, banana, uva, jasmim, melão, damasco, mirtilo, cereja e framboesa, e ele pode ser encontrado de forma natural em plantas como o Jasmim e a Magnolia champaca (SÁ et al., 2017). Este éster pode também ser utilizado como solvente ou na composição de pesticidas (JOHNSON et al., 2017). A Figura 3 ilustra a estrutura química do benzoato de benzila.

O benzoato de benzila é considerado a droga mais efetiva contra a escabiose, de acordo com vários estudos que o comparam com outras drogas também empregadas para tal tratamento, como a ivermectina e a permetrina (LY, 2009; BACHEWAR et al., 2009; THAWANI et al., 2009). Segundo Ly (2009), o tratamento tópico com benzoato de benzila é mais eficiente do que a administração de ivermectina por via oral. O tratamento tópico para

escabiose com o benzoato de benzila vem sendo utilizado não só em adultos, mas também de forma diluída para crianças e lactantes (HENGGE et al., 2006).

Figura 3: Estrutura química do benzoato de benzila.



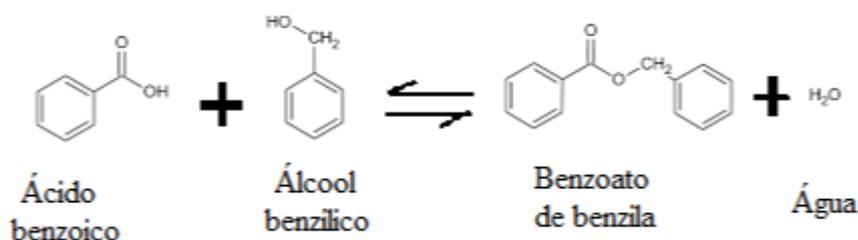
Fonte: (JOHNSON et al., 2017).

A escabiose é uma doença comum ao redor do mundo, mas acaba sendo mais frequente em áreas com superlotação ou que sofrem uma falta de saneamento básico. Tal doença é provocada pelo ácaro *Sarcoptes scabiei*, o qual é capaz de se enterrar na pele e consumir a epiderme do hospedeiro, onde ocorre a inflamação, reações alérgicas e pruriginosas (MCCARTHY et al., 2004). A escabiose costuma representar um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, uma vez que é frequentemente negligenciada nos mesmos. A América do Sul é muito afetada pela doença, principalmente o Brasil, mais especificamente em comunidades carentes, onde já é considerada uma doença hiperendêmica (HEUKELBACH et al., 2003).

No entanto, sua produção industrial ainda é estritamente via rota química, não havendo alternativas verdes ou biotecnológicas disponíveis até o presente momento. Na literatura, há apenas o trabalho de Gryglewicz et al. (2000) que sintetizou o benzoato de benzila através de um processo de transesterificação utilizando o álcool benzílico e o éster benzoato de metila, em uma razão molar de 2:1, a 55°C, com a Novozym 435®, sem solvente, e atingiu a conversão de 90% em 100 horas de reação. Apesar de ter alcançado uma conversão alta, este processo em larga escala seria inviável do ponto de vista econômico, tanto pelo elevado tempo necessário para atingir uma a conversão máxima quanto pelo uso de um éster como acil doador. Neste cenário, o processo de esterificação seria muito mais vantajoso pois ele utiliza substratos mais baratos, como ácido ou anidrido benzoico e o álcool benzílico. Os esquemas das reações de

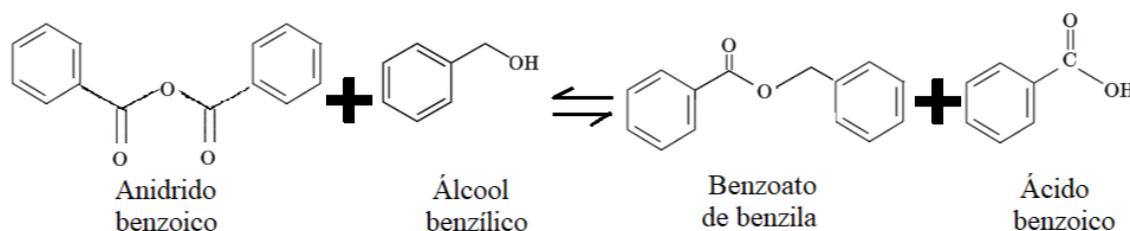
esterificação do benzoato de benzila a partir destes substratos estão ilustrados pelas figuras 4 e 5.

Figura 4: Esquema da reação de esterificação do benzoato de benzila a partir do ácido benzoico como acil doador e álcool benzílico como acil receptor.



Fonte: Autor.

Figura 5: Esquema da reação de esterificação do benzoato de benzila a partir do anidrido benzoico como acil doador e álcool benzílico como acil receptor.



Fonte: Autor.

Em um trabalho recente, Shiki (2018) avaliou e comparou o desempenho das enzimas Novozym 435® e Lipozyme RM IM na síntese do benzoato de benzila, através da reação de esterificação, e chegou em uma conversão máxima de 51% após 24 horas de reação, utilizando a enzima Lipozyme RM IM numa concentração de 10%, a 40°C, com o anidrido benzóico como substrato em uma razão molar de 1:5 (álcool benzílico:anidrido benzóico) e o terc-butanol como solvente. Embora o trabalho tenha mostrado que a esterificação enzimática é uma rota possível para a síntese do benzoato de benzila, baixos níveis de conversão foram encontrados, mostrando que ainda são necessárias mais investigações quanto as condições do processo a fim de maximizar e viabilizar a produção do éster para uma futura aplicação em escala industrial.

2.5 Considerações sobre o estado da arte

Diante do exposto neste capítulo, é possível perceber que os processos biotecnológicos apresentam uma série de vantagens para a indústria, decorrentes da possibilidade de utilização de condições amenas de processo, além de atenderem às tendências de consumo contemporâneas, pois os produtos obtidos através dos mesmos podem ser rotulados como naturais. Neste contexto, as enzimas vêm tomando espaço como objeto de interesse em estudos científicos, os quais visam explorar e melhorar as condições de diversos processos, incluindo a síntese de ésteres aromáticos, que são de interesse para diversos segmentos da indústria, como a alimentícia e a farmacêutica.

O éster benzoato de benzila é de extrema importância para o tratamento da escabiose, e até o presente momento, apresenta apenas rota química para síntese industrial. Algumas investigações foram realizadas via transesterificação e via esterificação, no entanto, os resultados foram um tanto insatisfatórios economicamente, inviabilizando um aumento de escala. O que desperta o interesse da realização desse trabalho, em busca de uma rota biotecnológica viável para a produção do éster benzoato de benzila.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e métodos empregados, bem como os experimentos laboratoriais realizados neste trabalho, visando a avaliação das condições de processo para a síntese do benzoato de benzila via esterificação enzimática

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Biocatalisadores

Como catalisadores enzimáticos, foram testadas as seguintes lipases comerciais:

- Novozym 435® - produzida a partir da lipase de *Candida antarctica* fração B (Cal B), imobilizada em resina acrílica macroporosa;
- Lipozyme RM IM - sintetizada a partir do *Rhizomucor miehei*, imobilizada em resina fenólica;
- Lipozyme TL IM - sintetizada a partir da lipase *Thermomyces lanuginosus*, imobilizada em silicato de gel hidrofílico;
- *Candida antarctica* fração B (Cal B) lipase na forma livre (NZL-102);
- *Thermomyces lanuginosus* lipase na forma livre (NS 40116);

As enzimas livres foram obtidas na forma de caldo enzimático e passaram por processo de concentração, remoção de estabilizante e liofilização conforme procedimento descrito por Chiaradia et al. (2016).

Todos os biocatalisadores foram generosamente doados pela Novozymes®.

3.1.2 Substratos utilizados na reação de esterificação

- Ácido benzóico PA (99%, Lafan);
- Anidrido benzóico (98%, Acros);
- Álcool Benzílico PA (Neon).

3.1.3 Solventes

Para definir o solvente que melhor solubiliza os substratos da reação de esterificação, foram testados os solventes:

- terc-butanol;
- ciclo-hexano;

- n-heptano;
- n-octano;
- n-pentano;
- 2-propanol;
- Isooctano;

Diclorometano foi utilizado para solubilização das amostras para análise de Cromatografia Gasosa.

3.1.4 Equipamentos

- Balança analítica (Mettler Toledo, AB204-S);
- Agitador mecânico com banho maria (Dist);
- Cromatógrafo Gasoso (Shimadzu GC 2010) com auto injetor acoplado Shimadzu AOC 5000;
- Agitador magnético (IKA);
- Banho termostático (Microquímica);
- Ultrassom (UNIQUE)

3.2 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Nesta seção, serão descritos detalhadamente os experimentos realizados neste trabalho, organizados com o intuito de melhorar a eficiência da síntese do benzoato de benzila, por via enzimática, atualmente pouco explorada na literatura. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2.1 Avaliação da ausência ou presença de diferentes solventes orgânicos em meio reacional utilizando diferentes biocatalisadores

Foram testados como substratos dois acil doadores, o ácido benzoico e o anidrido benzoico, e um acil receptor, o álcool benzílico, combinados em dois diferentes sistemas. Para ambos os sistemas inicialmente foram realizados testes de solubilidade para todos os solventes citados no item 3.1.3. Além disso, testes de solubilidade foram realizados com excesso de álcool e sem nenhum solvente, com o intuito de também tentar viabilizar a reação em um sistema livre de solvente, o que representaria uma possível vantagem econômica para a indústria.

Após o teste de solubilidade indicar os melhores solventes para os sistemas, testes de esterificação foram realizados utilizando uma razão molar fixa de 1:9 (ácido ou anidrido benzóico: álcool benzílico) com diferentes enzimas imobilizadas como catalisadores do sistema, conforme previamente descrito no item 3.1.1, ou seja, a Novozym 435®, a Lipozyme TL IM e a Lipozyme RM IM. Para isso, os substratos (razão molar acil doador: receptor 1:9) e enzima (10% em relação à quantidade total de substratos) foram adicionados em tubos de ensaio de 2 mL, em seguida 1 mL de solvente foi adicionado em cada reator para os sistemas com solvente e nenhum solvente foi adicionado nos sistemas livre de solvente (apenas excesso de álcool) e acondicionados a 50 °C em agitador mecânico com agitação branda por 24 h. Ao final do tempo de reação, os tubos foram centrifugados, alíquotas do sobrenadante foram retiradas e adequadamente diluídas em diclorometano para análise de quantificação.

Em suma, nesta etapa do projeto, foram fixadas certas condições de processo (temperatura, tempo reacional, quantidade de catalisador e razão molar) e como variáveis foram testados diferentes tipos de solventes, a ausência de solvente, e três diferentes catalisadores. Tais condições iniciais foram estabelecidas com base no trabalho de Shiki (2018). O objetivo destes testes preliminares foi avaliar o desempenho da presença e dos diferentes solventes descritos no item 3.1.3, bem como das enzimas imobilizadas (biocatalisadores) citadas no item 3.1.1.

3.2.2 Variação da razão molar dos substratos anidrido benzóico:álcool benzílico

Nesta etapa foram testadas diferentes razões molares de anidrido benzoico:álcool benzílico, que foram de 3:1, 1:1, 1:3, 1:9, e 1:18, para definir a proporção de substratos na qual obtém-se uma maior conversão do benzoato de benzila. Sendo que, nos meios reacionais das razões molares 3:1, 1:1 e 1:3 foi utilizado o solvente 2-propanol para solubilização dos substratos, uma vez que o anidrido benzoico é um sólido de difícil solubilização. Os meios reacionais contendo elevado excesso de álcool benzílico como 1:9 e 1:18 foram livres de solventes, uma vez que o próprio álcool já desempenha o papel de solvente para a solubilização do anidrido benzoico. A quantidade de substratos utilizados para cada razão molar, em moles e em gramas, pode ser observada na Tabela 3. Os biocatalisadores testados nesta etapa foram os mesmos do item 3.2.1, ou seja, a Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, e Novozym 435. Os outros parâmetros da reação como temperatura, quantidade de catalisador e tempo reacional foram fixados em 50 °C, 10 % de catalisador e 24 h de duração (reação em batelada), respectivamente, pré estabelecidos com base no trabalho de Shiki (2018).

As reações de esterificação foram conduzidas em tubos de ensaio de 2 mL. Inicialmente, foram adicionados os substratos nas proporções descritas na Tabela 3. Em seguida, 1 mL de solvente foi adicionado nas reações que necessitavam de solvente para solubilização dos substratos, e nenhum solvente foi adicionado nas reações contendo excesso de álcool benzílico. Os reatores foram então acondicionados em agitador mecânico com controle de temperatura, para que a reação inicie adicionou-se a enzima, e ao final do tempo reacional as amostras foram centrifugadas, alíquotas do sobrenadante coletadas e diluídas adequadamente para posterior quantificação de benzoato de benzila através de cromatografia gasosa.

Tabela 3 - Quantificação dos substratos em sistemas de diferentes razões molares (anidrido benzoico: álcool benzílico).

Razão molar do sistema (anidrido benzoico: álcool benzílico)	Quantidade em moles (mmol)	Quantidade de substratos em massa (g)	Quantidade de enzima em massa (g)
1:18	0,27:5	0,0588:0,5407	0,0600
1:9	0,43:4	0,0973:0,4326	0,0530
1:3	1:3	0,2262:0,3244	0,0551
1:1	2:2	0,4525:0,2163	0,0669
3:1	4,0:0,8	0,4885:0,0865	0,0575

Fonte: Autor.

3.2.3 Cinética de conversão utilizando enzima imobilizada como catalisador

Com o objetivo de analisar o desempenho do sistema reacional ao longo do tempo, foram realizados experimentos para observar a cinética de conversão do benzoato de benzila em diferentes temperaturas, 50, 60 e 70 °C, utilizando a enzima imobilizada Lipozyme TL IM como catalisador. Os parâmetros operacionais fixados nesta etapa foram a razão molar anidrido benzóico:álcool benzílico (1:9), o tempo de reação (24 h), e a quantidade de enzima (10 % da massa total de substrato). As amostras foram preparadas em balões volumétricos de 50 mL de volume, onde foi adicionado inicialmente o anidrido benzoico (2,6 mmols), seguido pelo álcool benzílico (24 mmols), e pelo biocatalisador (10 % da massa total de substrato) correspondente

a 0,3182 g. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 min, e novas alíquotas do sobrenadante foram coletadas, devidamente diluídas em diclorometano e armazenadas sob refrigeração para posterior análise em cromatografia gasosa.

3.2.4 Cinética de conversão utilizando enzima livre como catalisador

Com o intuito de comparar o desempenho e eficácia das enzimas livres em relação às imobilizadas, foram realizados experimentos com as enzimas *Candida antarctica* fração B (Cal B) lipase na forma livre (NZL-102) e *Thermomyces lanuginosus* lipase na forma livre (NS 40116). Estes experimentos foram realizados com uma razão molar 1:9, a 50 °C, durante 24 horas. As amostras foram preparadas em balões de 50 mL de volume, no qual foi adicionado 2,6 mmols de anidrido benzoico e 24 mmols de álcool benzílico. Em seguida, as enzimas livres foram adicionadas ao reator, sendo que, nas amostras preparadas com a enzima NZL-102, foram adicionadas 0,0255 g da mesma, enquanto nas amostras preparadas com a enzima NS 40116, adicionou-se 0,0312 g. Em seguida, os reatores foram acondicionados em agitador mecânico com controle de temperatura. Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 min, e então novas alíquotas foram coletadas do sobrenadante. As amostras foram armazenadas sob refrigeração para posterior diluição em diclorometano e análise em cromatografia gasosa.

3.2.5 Cinética de conversão em modo batelada alimentada com enzima imobilizada como catalisador

Nesta etapa foi testada a eficácia do método de batelada alimentada, com o intuito de comparar com os resultados obtidos pelo método de batelada, previamente testado. Para a realização destes experimentos fixou-se a razão molar anidrido benzóico:álcool benzílico (1:18), a quantidade do catalisador Lipozyme TL IM (10% da massa total de substrato do sistema), a temperatura (50°C) e o tempo de reação (24h). As amostras foram preparadas em um reator de vidro encamisado, de 100 ml de volume. Inicialmente adicionou-se o álcool benzílico (35 mmols) e o biocatalisador (10 % - 0,4212 g), e em seguida o reator foi acoplado ao equipamento de banho termostático. O reator foi mantido na superfície do Agitador (IKA), sob uma agitação de 150 rpm, com o auxílio de uma barra magnética de dimensões 3x10 mm, adicionada junto ao sistema dentro do reator. Por fim, o anidrido benzoico foi alimentado no reator a cada 1 h nas 6 h iniciais, totalizando 6 adições (1,88 mmol). Alíquotas da reação foram

coletadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 e 24 h. Em cada um destes tempos, após a coleta das alíquotas, foram adicionados 0,0712 g de anidrido benzóico, de forma a caracterizar a reação em batelada alimentada.

3.2.6 Cinética de conversão em banho de ultrassom

Outra técnica empregada no trabalho em pauta foi o ultrassom, com o objetivo de avaliar e comparar os resultados com os obtidos pelo método convencional via agitação mecânica. Foram realizados os experimentos fixando-se alguns parâmetros reacionais, a razão molar 1:9 (anidrido benzoico: ácido benzoico), a quantidade de enzima (10 %), a temperatura a 50 °C, e o tempo de reação, de 8 h. Nesta etapa, foram testadas todas as enzimas imobilizadas apresentadas no item 3.1.1, ou seja, a Lipozyme RM IM, a Lipozyme TL IM, e a Novozym 435®.

Inicialmente, os substratos foram adicionados em um balão de vidro de 50 mL nas quantidades 2,6 mmols e 24 mmol, respectivamente para o anidrido benzoico e para o álcool benzílico. Em seguida 10 % de enzima (em relação à quantidade total dos substratos) foi adicionada (0,3182 g), e o reator foi acondicionado ao banho de ultrassom previamente aquecido a 50 °C. Alíquotas da reação foram coletadas nos tempos 0, 1, 2, 4, 6 e 8 h e depositadas em eppendorfs de 2 mL de volume. Posteriormente, as amostras coletadas foram centrifugadas a 10000 rpm por 5 min e novas alíquotas do sobrenadante foram então coletadas, adequadamente diluídas em diclorometano e armazenadas sob refrigeração para posterior análise por cromatografia gasosa.

3.2.7 Quantificação do Benzoato de Benzila

A quantificação do éster benzoato de benzila foi realizado conforme descrito previamente por Sá et al. (2018) via cromatografia gasosa. Para isso, foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu 2010 com injetor automático acoplado (Shimadzu AOC 5000). Uma coluna DB-5 (27 m comprimento × 0.25 mm diâmetro interno × 0.25 µm espessura) foi empregada para separação dos compostos e a detecção foi feita por detecção via ionização de chama (flame ionization detector -FID). A rampa de temperatura foi programada para 100 °C (2 min), 100-135 °C (3 °C/ min), 135-250 °C (10 °C/ min) e 250 °C por 15 min, a fim de garantir a separação adequada de todos os componentes do meio reacional. A temperatura do injetor e detector foi de 250 °C, sendo que para a injeção da amostra foi mantido um Split de 1:100, o

volume de injeção foi de 10 µL de amostra diluída em diclometano e o gás de arraste foi hidrogênio (H₂, 56 KPa).

A quantidade do benzoato de benzila no meio reacional foi calculada através da área total do pico que corresponde ao éster encontrada no cromatograma gerado. Para isso, uma curva de calibração (Equação 1) foi previamente preparada com diferentes concentrações e diluições sequenciais de benzoato de benzila padrão em diclorometano.

$$\text{Área} = 147649 * C + 35962, \quad (1)$$

onde,

Área é a área do pico encontrada no cromatograma e C é a concentração (mg/mL) do benzoato de benzila na amostra, seguindo um R²=0,99.

3.2.8 Determinação dos produtos intermediários presentes no meio reacional via Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas

Com o objetivo de identificar as substâncias correspondentes a todos os picos observados pela análise de cromatografia gasosa obtidos pelo procedimento descrito no item 3.2.7, recorreu-se à análise em Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas. Para isso, foi utilizado um Cromatógrafo Gasoso Agilent 7890A com injetor automático CTC-Combi-Pal acoplado a um espectrômetro de massas Agilent. Uma coluna capilar HP-5MS 19091S-433 (30 m comprimento x 0,32 mm diâmetro interno x 0,25 µm espessura) foi empregada para separação dos compostos. A programação do forno foi de 40 °C por 2 min, seguido de um aquecimento até 145 °C a uma taxa de 3 °C/min, um novo aquecimento até 250 °C a uma taxa de 10 °C/min, por fim, a temperatura de 250 °C foi mantida por 5 min. A temperatura do injetor foi de 250 °C, com modo split em uma razão 1:30. Para o GC-MS foi utilizada temperatura da fonte de ionização em 230 °C e temperatura do quadrupolo 150 °C. A identificação dos compostos foi realizada a partir da comparação dos espectros de massa obtidos com a biblioteca NIST MS (Willey).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da ausência ou presença de diferentes solventes orgânicos no meio reacional e análise do biocatalisador mais eficaz para a síntese do benzoato de benzila

A análise da necessidade e do efeito de solventes nos meios reacionais é de grande importância para a viabilidade do processo, uma vez que determinados solventes podem auxiliar na solubilização e maximização das condições para a conversão do produto, porém acabam por acarretar mais custos ao processo. No presente trabalho, primeiramente foram testados como substratos dois acil doadores e um acil receptor, combinados em dois diferentes sistemas. Para estes foram realizados testes de solubilidade utilizando os solventes listados no item 3.1.3, com o intuito principalmente de comparar as duas opções de acil doadores disponíveis (anidrido benzoico e ácido benzoico).

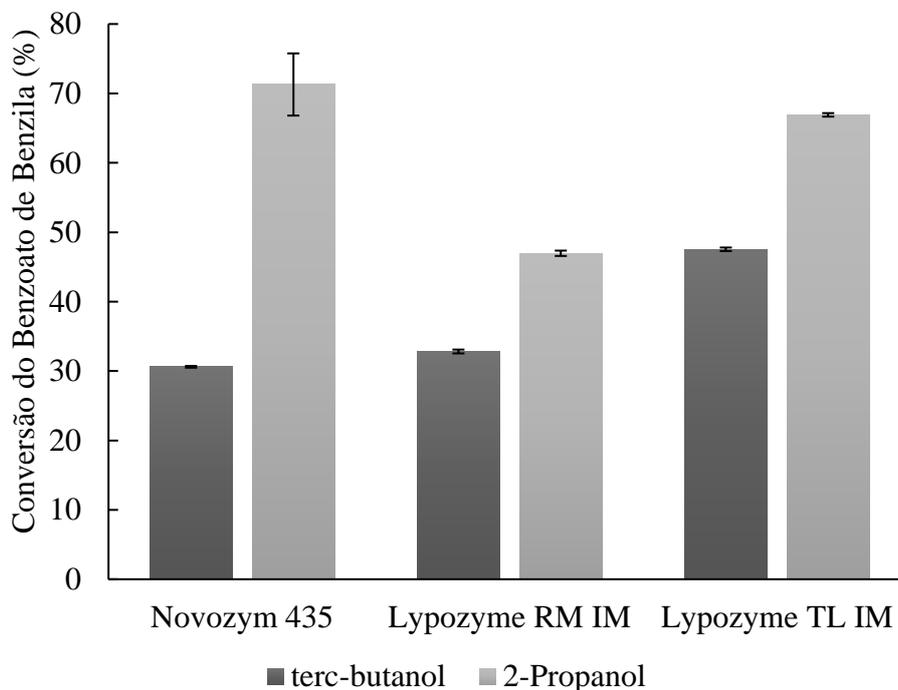
Constatou-se então que o anidrido benzoico foi solúvel em todos os solventes testados, bem como na ausência de solvente e em excesso de álcool benzílico, enquanto o ácido benzoico só foi solúvel nos solventes terc-butanol e 2-propanol, e não apresentou solubilidade no sistema livre de solvente, ou seja, é insolúvel ao álcool benzílico. Para a realização dos experimentos posteriores foram escolhidos, portanto, os solventes terc-butanol, 2-propanol e o sistema livre de solvente com excesso de álcool, uma vez estes constituíram condições as quais ambos os acil doadores poderiam ser utilizados para compor a reação.

Durante a realização dos experimentos, para o sistema composto pelo ácido benzoico como acil doador e álcool benzílico como acil receptor, não houve conversão do benzoato de benzila na presença do solvente terc-butanol, do 2-propanol, e não foi possível realizar o experimento na ausência de solvente pois o ácido benzoico não demonstrou solubilidade no álcool benzílico. Este sistema mostrou-se, portanto, ineficiente para a realização da esterificação enzimática do benzoato de benzila, pois além da limitação quanto à solubilidade nos solventes e no álcool benzílico, este também mostrou-se ineficaz durante o processo. Já para o sistema composto pelo anidrido benzoico como acil doador e álcool benzílico como acil receptor, a realização do experimento na ausência de solvente foi possibilitada pelo fato de que o anidrido benzoico mostrou-se solúvel no excesso de álcool benzílico (uma vez que os experimentos nesta etapa foram realizados na razão molar de 1:9).

Nesta etapa foi então selecionado o melhor sistema de substratos, composto pelo anidrido benzoico como acil doador e pelo álcool benzílico como acil receptor. Para este sistema foi possível então comparar o desempenho dos três biocatalisadores empregados nos experimentos, descritos no item 3.1.1, na presença dos solventes terc-butanol e 2-propanol, bem

como na ausência de solvente. A Figura 6 possibilita a comparação dos resultados experimentais entre os dois diferentes solventes empregados, evidenciando que o solvente 2-propanol foi o mais eficaz com todos os biocatalisadores testados.

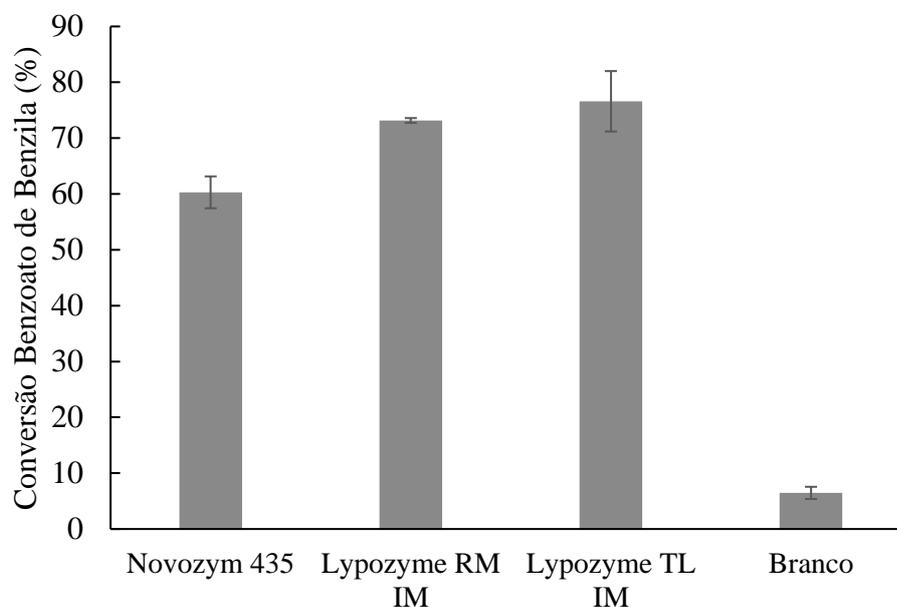
Figura 6 - Influência dos solventes terc-butanol e 2-propanol e de diferentes lipases na esterificação enzimática do benzoato de benzila, a 50 °C, 10 % de catalisador, e razão molar 1:9 (anidrido benzoico: álcool benzílico).



A presença do solvente 2-propanol demonstrou desempenhos notáveis para a Novozym 435® e a Lipozyme TL IM, de forma a alcançar aproximadamente 71 e 66 % de conversão, respectivamente. De maneira análoga, foram comparados os resultados obtidos pela realização dos experimentos na ausência de solvente, conforme ilustra a Figura 7. Apesar do desempenho da Novozym 435® ter sido reduzido nesta condição, para ~60 % na conversão, os números obtidos com a utilização da Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM aumentaram, chegando a 73 e 77 %, respectivamente, onde a Lipozyme TL IM alcançou então a maior eficiência dentre os parâmetros testados inicialmente.

Visto isso, o solvente propanol foi definido como melhor solvente para o sistema e foi selecionado para solubilização dos substratos quando realizar ensaios em razões molares sem excesso de álcool enquanto que, um sistema livre de solvente também foi adotado quando houver um excesso de álcool na reação.

Figura 7 - Conversão do benzoato de benzila através da reação de esterificação enzimática com diferentes biocatalisadores e na ausência de solvente no sistema reacional, em condições fixas de 50 °C, 10% de catalisador, e razão molar 1:9 (anidrido benzoico: álcool benzílico).



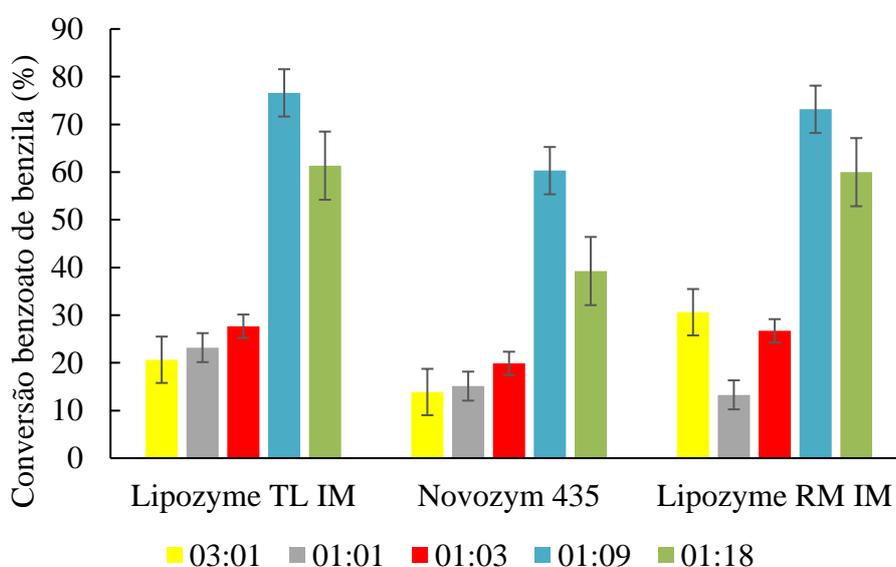
4.2 Efeito da razão molar dos substratos anidrido:álcool na síntese enzimática do benzoato de benzila

O estudo da razão molar dos substratos é de extrema importância, pois representa o fator que determina a influência dos substratos na atividade enzimática, bem como a transferência de massa no sistema reacional. Altas razões molares tendem a permitir uma rápida formação do complexo acil enzimático, enquanto em baixas razões molares acaba existindo uma limitação na transferência de massa, desacelerando o processo. Quando há excesso de um dos substratos, o equilíbrio da reação se desloca para a formação do produto (BALEN, 2016).

No presente estudo, para verificar a influência da razão molar no sistema reacional fixou-se a temperatura em 50 °C e a quantidade de catalisador em 10 %, e a razão molar variou-se em entre 3:1, 1:1, 1:3, 1:9, e 1:18, (anidrido benzoico: álcool benzílico). Os resultados de conversão do benzoato de benzila nessas condições estão apresentados na Figura 8. Onde é possível observar que o excesso de álcool benzílico foi positivo para a eficácia da conversão da reação, conforme já visualizado anteriormente por Graebin et al. (2012) o qual obteve os melhores resultados para a síntese do éster acetato de butila na razão molar de 1:3 (ácido benzóico:álcool benzílico) com a lipase Novozym 435®. No entanto, um aumento na quantidade de álcool foi eficiente na conversão do éster até certo ponto, pois quando elevadas quantidades de álcool foram utilizadas na razão molar de 1:18 uma leve redução na conversão

foi visualizada, mostrando que uma razão de 1:9 já é o suficiente para obter uma adequada esterificação, mas a razão molar 1:18 dilui demais o anidrido o que dificulta o processo de difusão da molécula pelos poros do material de suporte, consequentemente, reduzindo a conversão. Por outro lado, quando um excesso de anidrido benzoico (razão molar de 3:1) foi usado, obteve-se a menor conversão do éster para todos os biocatalisadores, indicando que provavelmente existe alguma inibição/bloqueio do sítio ativo da enzima na presença de elevadas quantidades de anidrido benzóico.

Figura 8: Influência de diferentes razões molares (anidrido benzoico: álcool benzílico), três diferentes biocatalisadores (10 % de catalisador), a 50 °C, e 24 h de reação. Razões molares 3:1, 1:1 e 1:3 contém solvente propanol enquanto 1:9 e 1:18 são livres de solvente.



As diferentes lipases imobilizadas foram testadas sob diferentes condições de razões molares de substrato anidrido benzóico: álcool benzílico, variando de 3:1 a 1:18. Foi possível visualizar um comportamento não homogêneo conforme houve um aumento da quantidade de álcool ao meio reacional. Apesar de todas as enzimas apresentarem bons valores de conversão na razão molar de 1:9 (sem solvente), a enzima Lipozyme TL IM foi selecionada como catalisador do sistema, por ter apresentado conversões superiores e também por ser o biocatalisador mais barato, em relação as outras duas enzimas utilizadas nesse trabalho. Por esta razão, a Lipozyme TL IM foi escolhida para prosseguir com os experimentos subsequentes, uma vez que o objetivo do presente trabalho é viabilizar a esterificação enzimática do benzoato de benzila e esta, além de apresentar o menor custo, ela ainda foi a mais eficiente dentre os biocatalisadores testadas, sob todos os parâmetros experimentais empregados. O valor máximo de conversão observado na Figura 8 é de 77 %, para a Lipozyme TL IM, seguido pelo valor de

73 e 60 %, para a Lipozyme RM IM e Novozym 435®, respectivamente, com o sistema na razão molar de 1:9 (anidrido benzoico: álcool benzílico). Como não houve necessidade de adição de solventes para os experimentos na razão molar de 1:9, e visto que esta razão molar apresentou os melhores resultados, estabeleceu-se, portanto que as etapas subsequentes seriam realizadas nesta razão molar, na ausência de solvente.

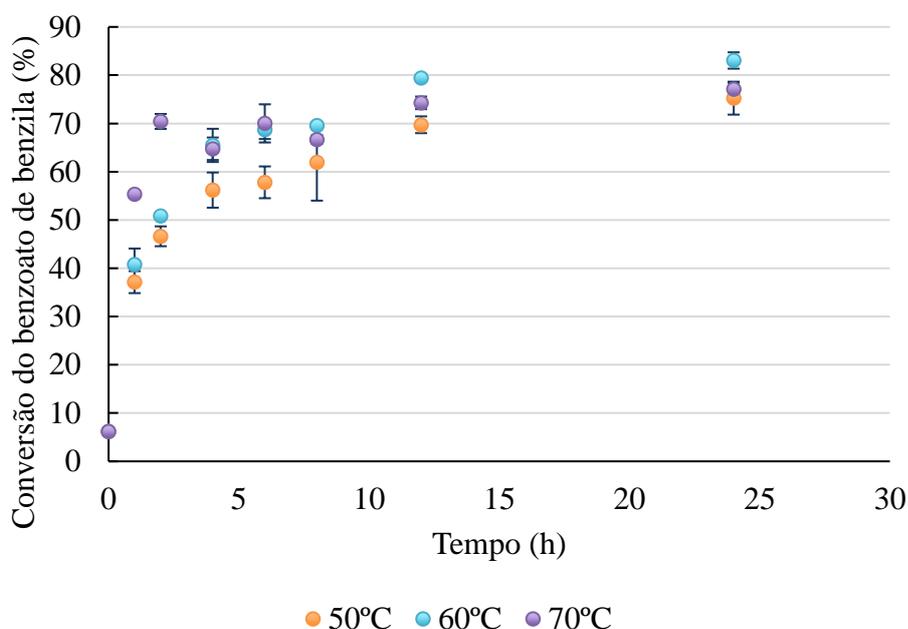
4.3 Efeito da temperatura na cinética de conversão utilizando enzima imobilizada como catalisador

A análise do efeito da temperatura é de extrema importância pois esta acaba por influenciar o sistema reacional sob duas vertentes. Uma delas seria a difusão dos substratos, fenômeno de transferência de massa o qual é favorecido com a aplicação de altas temperaturas, as quais determinam um maior coeficiente de difusão e conseqüentemente, uma maior velocidade de reação. O outro item levado em consideração seria o fato de que as enzimas possuem uma temperatura ótima de atuação, e o aumento indiscriminado da mesma pode levar a inativação destes biocatalisadores (KRISTENSEN et al., 2005).

Nesta etapa do presente estudo foram testadas as temperaturas de 50, 60 e 70 °C, em um sistema composto por 10% do biocatalisador Lipozyme TL IM, razão molar de 1:9 (anidrido benzoico: álcool benzílico), em uma batelada de 24 horas de duração. Foram coletadas e analisadas alíquotas nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h, para os sistemas nas três temperaturas pré-estabelecidas. Os resultados estão organizados na Figura 9, a qual permite a comparação do efeito destas temperaturas neste sistema na eficiência de conversão do benzoato de benzila.

Conforme a Figura 9, nota-se que a taxa inicial de reação parece estar fortemente ligada à temperatura, pois em 1 hora de reação a conversão chega a 55 % para a temperatura de 70 °C, enquanto alcança apenas 37 e 41 % para as temperaturas de 50 e 60 °C, respectivamente. O valor de aproximadamente 70 % de conversão do benzoato de benzila é alcançado em apenas 2 h de reação pelo sistema submetido à temperatura de 70 °C, enquanto para o sistema a 50 e 60 °C este processo demora 12 e 8 h para alcançar este valor de conversão, respectivamente. Por outro lado, é possível observar que em 12 e 24 h de reação, as diferenças entre os valores de conversão dos sistemas sob as diferentes temperaturas são similares. Após 24 h de reação por exemplo, o sistema a 60 °C alcança 83% de conversão, enquanto o sistema a 70 °C alcança 77 % e por último, o sistema a 50 °C chega a 75 %, indicando que 12 h de reação são suficientes para garantir a conversão máxima do sistema.

Figura 9 - Influência da temperatura na cinética de esterificação enzimática do benzoato de benzila, com 10 % de catalisador no sistema, razão molar 1:9 (anidrido benzoico: álcool benzílico) e 24 h de reação.



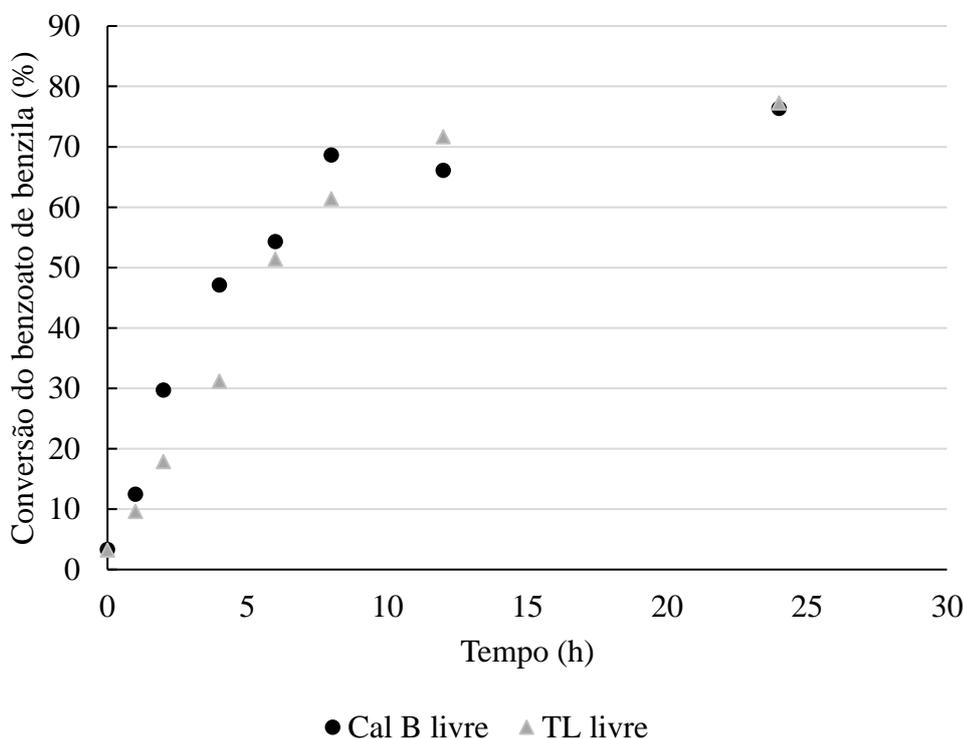
No entanto, o gasto energético que a diferença de temperatura de 10 ou 20 °C representa para a indústria é significativo e foi um fator levado em consideração para a escolha da temperatura para as próximas etapas deste trabalho. Com o intuito de promover a viabilização do processo de esterificação enzimática do benzoato de benzila, analisando o sistema operacional como um todo, optou-se, portanto pela temperatura de 50 °C para prosseguir os experimentos.

4.4 Análise da cinética de conversão utilizando enzima livre como catalisador

Apesar das enzimas livres apresentarem uma série de desvantagens em relação às enzimas imobilizadas, como o fato de que não permitem o seu reciclo e reutilização, o estudo das mesmas é válido para a análise da viabilidade do processo como um todo, como o baixo custo quando comparadas às enzimas imobilizadas. Além disso, muitas vezes as moléculas de substratos e produtos são muito grandes para sua livre passagem pelos poros da estrutura da enzima imobilizada, e isto acaba por dificultar a eficiência do processo. Como a molécula do benzoato de benzila possui dois anéis aromáticos, conforme ilustrada na Figura 3, foi levantada a hipótese de que talvez seu tamanho fosse um fator que poderia desacelerar a reação, justificando-se assim a realização de experimentos também com enzimas livres.

Nesta etapa do trabalho, foram testadas as lipases na forma livre descritas no item 3.1.1. São elas a *Candida antarctica* fração B (Cal B livre) e *Thermomyces lanuginosus* (TL livre), as quais equivalem às formas livres da Novozym 435® e da Lipozyme TL IM, respectivamente. A quantidade de enzima livre utilizada (Cal B livre e TL livre) foi baseada com referência à quantidade de enzimas imobilizadas no suporte polimérico poroso da Novozym 435® e Lipozyme TL IM (SIMAS, 2008; CHEN, MILLER e GROSS, 2007). Os parâmetros de processo fixados foram a temperatura a 50 °C, razão molar a 1:9 (anidrido benzoico: álcool benzílico) e 10% de biocatalisador. A Figura 10 ilustra a cinética de reação destas duas enzimas livres, realizada durante o período de 24 h.

Figura 10: Cinética de conversão do benzoato de benzila utilizando a Cal B e a TL livres como catalisadores (10 % de catalisador), a 50°C, e razão molar 1:9 (anidrido benzoico: álcool benzílico).



Observa-se que as duas formas de enzimas livres apresentaram desempenho semelhante durante a reação de esterificação enzimática do benzoato de benzila. Inclusive ao final do processo ambas alcançaram aproximadamente o mesmo valor de conversão, ~77%. Comparando esses resultados com os obtidos para as enzimas imobilizadas equivalentes, sob as mesmas condições de processo, demonstrados no item 4.2, é possível perceber que a conversão do produto na reação catalisada pela enzima imobilizada Lipozyme TL IM (77%) e a enzima livre (TL livre) foi similar. Já a conversão promovida pela Novozym 435®, descrita

no item 4.2, foi de 60% e houve, portanto, um aumento da conversão quando a enzima na forma livre foi utilizada (~ 77%). Esses resultados sugerem a presença de uma possível restrição difusional dos substratos e/ou produto nos poros do suporte polimérico da enzima Novozym 435®, o que é eliminado quando a enzima livre é utilizada.

Ambas as enzimas livres se mostraram catalisadores eficientes para o sistema, e poderiam ser utilizadas para síntese do éster benzoato de benzila em um futuro aumento de escala. No entanto, mais investigações foram realizadas utilizando as enzimas imobilizadas devido a possibilidade e facilidade de recuperação e reuso do catalisador.

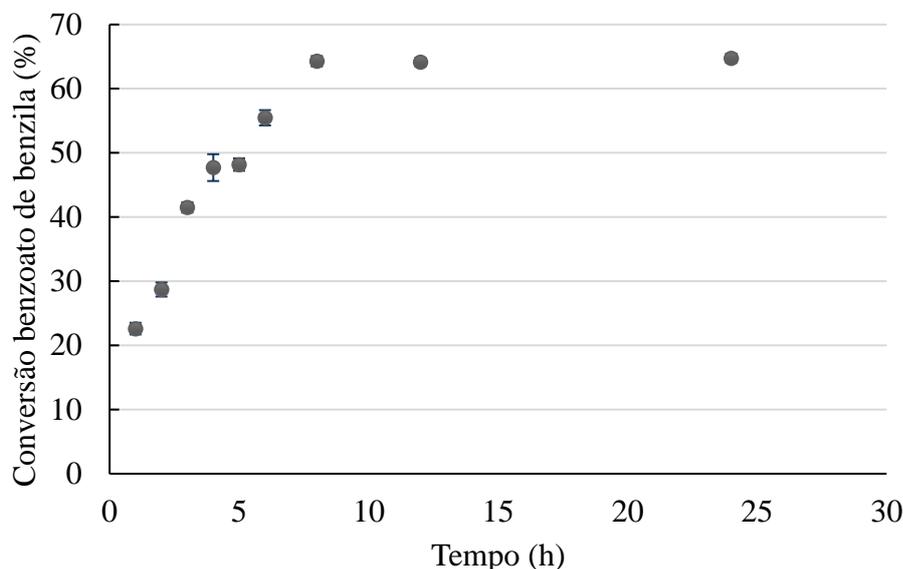
4.5 Efeito da reação em modo batelada alimentada com enzima imobilizada como catalisador na conversão do produto

O processo em modo de operação de batelada representa algumas vantagens em relação ao processo em batelada alimentada, pois exige menos custos de implementação, automação e manutenção, no entanto, para alguns casos, o rendimento do bioprocessamento apresenta-se constantemente superior quando empregado o modo de batelada alimentada (CRUZ et al, 2015; MORCELLI, 2015). Com o intuito de avaliar a viabilidade do processo por meio de outro sistema, foi realizada nesta etapa do presente trabalho a reação de esterificação em modo batelada alimentada, na qual o anidrido foi adicionado em 6 adições nas 6 h iniciais de reação, de forma a caracterizar o processo como tal. Os parâmetros de reação fixados foram a temperatura de 50 °C, quantidade de biocatalisador (Lipozyme TL IM) de 10 % e razão molar de 1:18 (anidrido benzoico: álcool benzílico). A Figura 11 ilustra os resultados obtidos nesta etapa do trabalho.

Através da Figura 11 é possível observar que a conversão máxima (~ 65 %) foi atingida no tempo de 8 h de reação, e após este ponto a conversão manteve-se praticamente constante, até o término das 24 h de processo. Com o experimento realizado sob as mesmas condições de processo, mas em modo batelada, demonstrado no item 4.2, na Figura 8 (razão molar 1:18, Lipozyme TL IM) foi possível alcançar uma conversão de ~61 % ao final das 24 h de reação, e, portanto neste caso, a eficiência do modo batelada alimentada mostrou-se ligeiramente superior ao modo batelada devido ao reduzido tempo de conversão máxima (8 h), porém em proporções de conversão global consideradas relativamente baixas (diferença de ~4 %). Levando-se em conta que o modo batelada alimentada acarreta mais custos ao processo, visto que demanda mais etapas operacionais, de supervisão e controle, esta baixa diferença na eficiência de conversão acaba por não justificar a implementação do modo batelada alimentada

para esta reação sob as condições estabelecidas, uma vez que a viabilidade do processo deve ser analisada como um todo, de várias vertentes.

Figura 11: Valores de conversão do benzoato de benzila na reação de esterificação enzimática em modo batelada alimentada, a 50 °C, 10 % de catalisador (Lipozyme TL IM), e razão molar 1:18 (anidrido benzoico: álcool benzílico).

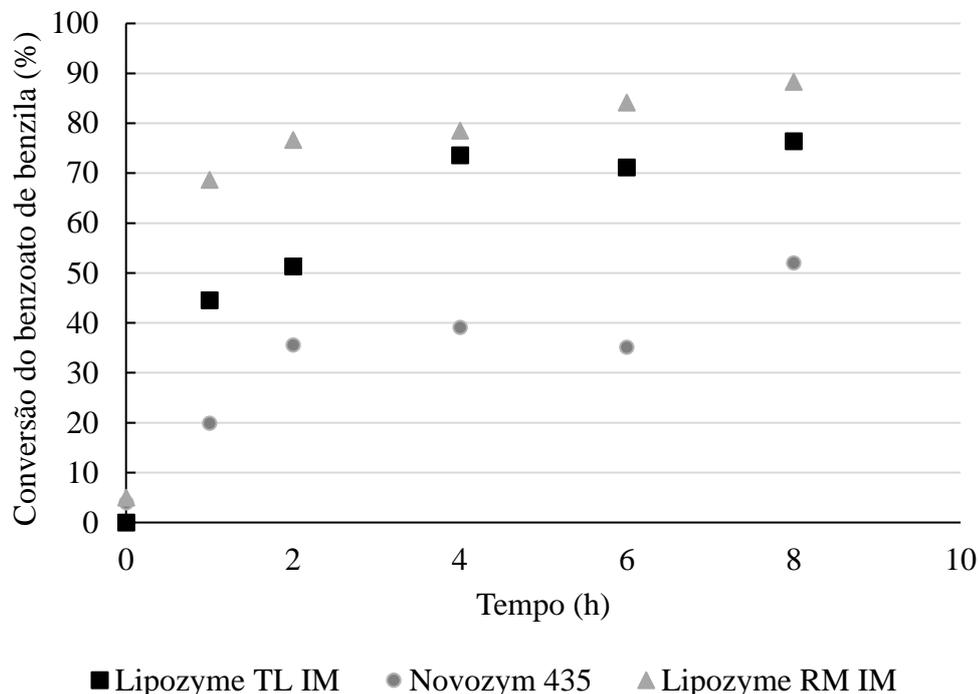


4.6 Efeito do uso do ultrassom na síntese enzimática do benzoato de benzila

Por caracterizar uma tecnologia verde não convencional que por muitas vezes apresenta vantagens em relação aos métodos comuns como a agitação mecânica, como menor tempo de processamento, o ultrassom foi também empregado no presente trabalho, com o intuito de comparar sua eficiência na reação de esterificação do benzoato de benzila com as demais metodologias testadas previamente. Nesta etapa foram testadas novamente as três enzimas imobilizadas do item 3.1.1, na temperatura de 50 °C, razão molar de 1:9 (anidrido benzoico), com 10 % de biocatalisador no sistema e 8 h de reação.

A Figura 12 deixa claro o desempenho das três enzimas, evidenciando um comportamento diferente do encontrado quando o método convencional foi utilizado devido a uma maior eficácia da enzima Lipozyme RM IM no processo, alcançando 88 % de conversão do benzoato de benzila em 8 h, enquanto a Lipozyme TL IM, que apresentou o melhor desempenho nos experimentos anteriores em agitação convencional, agora atingiu 7 % de conversão em 8 horas. A Novozym 435® apresentou o menor desempenho com apenas 52 % de conversão do benzoato de benzila ao final do processo.

Figura 12: Cinética de conversão do benzoato de benzila em banho de ultrassom, a 50°C, 10% de enzima, na razão molar de 1:9 (anidrido benzoico:álcool benzílico), utilizando três diferentes catalisadores (enzimas imobilizadas).



É importante ressaltar que a taxa inicial de reação foi acelerada com o uso do ultrassom visto que ~80% de conversão foi alcançada em apenas 4 h de reação quando a Lipozyme RM IM foi usada como catalisador. Esse é um comportamento recorrente com o uso do ultrassom, Balen (2016) por exemplo, obteve 66,4 % na síntese enzimática do éster ascorbil oleato em apenas 3 horas de reação, empregando a temperatura de 70 °C, razão molar de 1:9 (ácido ascórbico: ácido oleico), 5 % do biocatalisador Novozym 435® e solvente terc-butanol.

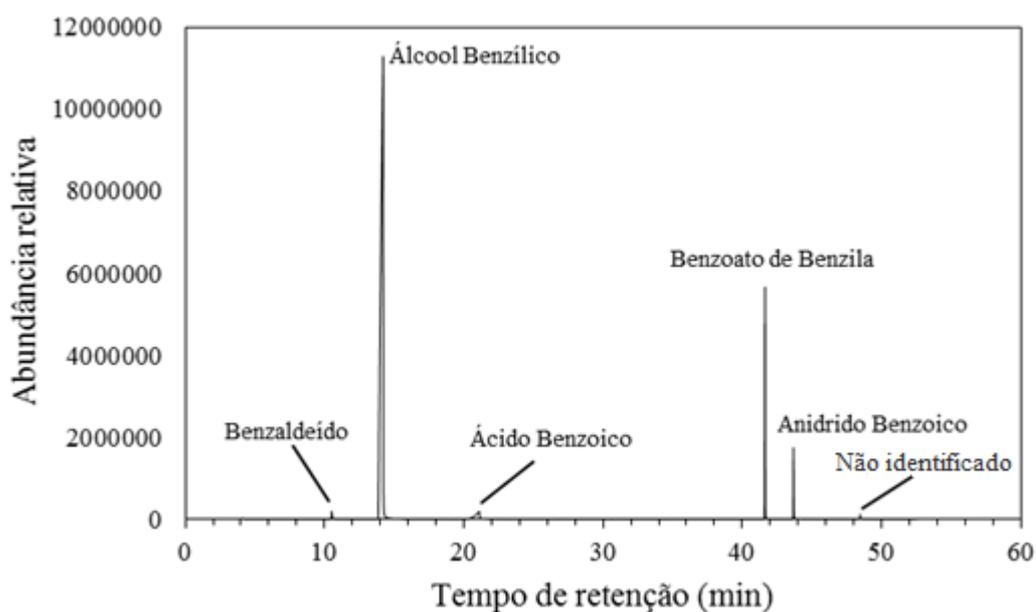
No entanto, ao final do tempo de reação de 8 h tanto a enzima Lipozyme RM IM quanto a enzima Lipozyme TL IM não puderam ser separadas do meio reacional, pois cavitação do ultrassom desarranjou o suporte polimérico. Apenas a enzima Novozym 435® resistiu ao processo, no entanto as baixas conversões inviabilizam o uso desse biocatalisador. Esses resultados inviabilizam o uso do ultrassom na esterificação do benzoato de benzila mediada por lipases.

4.7 Identificação dos produtos da reação

Conforme o procedimento descrito no item 3.2.7, os produtos obtidos na reação de esterificação enzimática do benzoato de benzila a partir do anidrido benzoico como acil doador e do álcool benzílico como acil receptor, com o biocatalisador Lipozyme TL IM, puderam ser

identificados e encontram-se descritos conforme demonstra a Figura 13. Além do benzoato de benzila e do ácido benzoico (produtos da reação, conforme ilustrado na figura 5), foi identificado também um pico referente ao benzaldeído, o qual pode ser gerado por uma reação secundária provinda da oxidação do álcool benzílico (PARREIRA, 2010). No entanto, as pequenas quantidades de benzaldeído e ácido benzoico em relação ao produto (benzoato de benzila), viabilizam a síntese éster utilizando o anidrido benzoico e álcool benzílico como substratos e a enzima Lipozyme TL IM como catalisador.

Figura 13 - Cromatograma obtido a partir da análise de CG acoplado com espectrometria de massas do meio reacional ao final de 12 h de esterificação entre anidrido benzoico e álcool benzílico (1:9) utilizando a Lipozyme TL IM como biocatalisador (10%).



Fonte: Autor (2018).

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi estudado o processo de síntese do benzoato de benzila via esterificação enzimática, através do emprego de diferentes lipases imobilizadas, diferentes metodologias e diversificação de parâmetros experimentais. As conversões do éster próximo a 80% utilizando um sistema livre de solvente orgânico com conversão máxima em até 24 h mostram pela primeira vez a possibilidade de síntese do benzoato de benzila mediada por enzimas com sucesso.

O sistema formado pelo acil doador anidrido benzoico foi mais eficiente na esterificação do que o formado pelo ácido benzoico, uma vez que este demonstrou-se insolúvel na maioria dos solventes, bem como no próprio acil doador álcool benzílico, impossibilitando o experimento com excesso de álcool e ausência de solvente. Dentre os solventes testados para a realização do experimento, os mais eficientes foram o terc-butanol e o 2-propanol, porém as maiores conversões foram alcançadas na ausência de solventes e excesso de álcool benzílico. Nesta etapa, a conversão máxima chegou a ~77 % quando a Lipozyme TL IM foi utilizada num sistema de razão molar anidrido benzóico:álcool benzílico (1:9), possibilitando a síntese do éster em um sistema livre de solventes orgânicos.

Dentre as razões molares testadas para o sistema anidrido benzoico: álcool benzílico, a razão molar de 1:9, na ausência de solvente, mostrou ser mais eficiente para todas as lipases empregadas no trabalho. Na análise do efeito da temperatura sob o sistema, a variação na temperatura não alterou a conversão global do éster, no entanto, com um aumento na temperatura houve um aumento na taxa inicial da reação. Portanto, levando em consideração os gastos energéticos, optou-se por utilizar uma temperatura 50 °C para o processo, utilizando a enzima Lipozyme TL IM como catalisador.

Os experimentos com as enzimas livres revelaram que houve pouca diferença no desempenho da enzima na forma livre *Thermomyces lanuginosus* (TL livre) e na forma imobilizada Lipozyme TL IM, porém a enzima livre *Candida antarctica* B (Cal B livre) demonstrou-se consideravelmente mais eficiente do que a imobilizada Novozym 435®, provavelmente devido à problemas difusionais relacionados ao substratos e produto pelos poros da enzima.

A conversão alcançada pelo modo batelada alimentada foi similar aos valores encontrados para a batelada, porém os custos operacionais provenientes desta metodologia, não justificam sua implementação. Outra metodologia empregada foi o ultrassom, o qual mostrou-se uma tecnologia eficaz, alcançando elevadas conversões via esterificação enzimática do

benzoato de benzila, com ela foi alcançado o maior valor de conversão do trabalho em pauta, ~88% de conversão com a lipase Lipozyme RM IM em 8 horas de reação, no entanto, a enzima não resistiu à cavitação do ultrassom, o que torna inviável seu emprego no processo. Por fim, conclui-se que a síntese do benzoato de benzila via esterificação enzimática utilizando a enzima Lipozyme TL IM como catalisador e um excesso de álcool benzílico é uma alternativa promissora para a produção deste composto.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

A partir dos resultados obtidos no desenvolvimento do trabalho, foi possível delinear algumas sugestões para a realização de trabalhos futuros:

- a) Explorar outras razões molares de substratos (acil doador: acil receptor) entre 1:3 e 1:18, principalmente em proporções nas quais o sistema não necessite de solvente;
- b) Trabalhar a purificação dos produtos da reação;
- c) Realizar o experimento em banho de ultrassom utilizando outras temperaturas (além de 50 °C);
- d) Avaliar a eficiência de conversão empregando proporções menores do que 10 % de biocatalisador na reação.
- e) Estudar a possibilidade de reuso da enzima livre;

REFERÊNCIAS

AITKEN, M. D. Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. **The chemical engineering journal**, v. 52, n. 2, p. B49-B58, 1993.

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.

ARAGÃO, V. C. et al. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. 2009.

BACHEWAR, N. P. et al. Comparison of safety, efficacy, and cost effectiveness of benzyl benzoate, permethrin, and ivermectin in patients of scabies. **Indian journal of pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 9, 2009.

BADGUJAR, K. C.; PAI, P. A.; BHANAGE, B. M. Enhanced biocatalytic activity of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase under sonicated condition. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 39, n. 2, p. 211-221, 2016.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. The combine use of ultrasound and lipase immobilized on co-polymer matrix for efficient biocatalytic application studies. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 255-264, 2015.

BADGUJAR, K. C.; SASAKI, T.; BHANAGE, B. M.. Synthesis of lipase nano-bio-conjugates as an efficient biocatalyst: characterization and activity–stability studies with potential biocatalytic applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 68, p. 55238-55251, 2015.

BALEN, M. et al. Novozym® 435-catalyzed production of ascorbyl oleate in organic solvent ultrasound-assisted system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 514-520, 2015.

BALEN, M. **SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ASCORBIL OLEATO UTILIZANDO TECNOLOGIAS ALTERNATIVAS**. 2016. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016

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

AKACHA, Najla Ben; GARGOURI, Mohamed. 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.

BICAS, J. L. et al. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 07-18, 2010.

CHEN, B.; MILLER, M.E.; GROSS, R.A. Effects of Porous Polystyrene Resin Parameters on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Distribution, and Polyester Synthesis Activity. **Langmuir**, v. 23, p. 6467-6474, 2007.

CHIARADIA, V.; SOARES, N. S.; OLIVEIRA D.; ARAÚJO, P.,H.; SAYER, C. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on magnetic poly (urea-urethane) nanoparticles. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 180, n. 3, p. 558-575, 2016.

CRUZ, M. L. et al. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA RESISTÊNCIA AO ETANOL DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* Y904. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2260-2265, 2015.

DHAKE, K. P. et al. Investigation of steapsin lipase for kinetic resolution of secondary alcohols and synthesis of valuable acetates in non-aqueous reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 15-23, 2012.

DUMESIC, J. A.; HUBER, George W.; BOUDART, Michel. Principles of heterogeneous catalysis. **Handbook of Heterogeneous Catalysis: Online**, 2008.

EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, José 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, n. 1-2, p. 36-40, 2010.

FERRAZ, L. I. R. et al. Application of home-made lipase in the production of geranyl propionate by esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 44-48, 2015.

FERSHT, A. **Enzyme structure and mechanism**. 2nd ed. Londres: WH Freeman, 1985.

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

GAO, W. et al. A novel esterase from a marine mud metagenomic library for biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 41, 2016.

GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, 2011.

GARLAPATI, V. K. et al. Modeling, simulation, and kinetic studies of solvent-free biosynthesis of benzyl acetate. **Journal of Chemistry**, v. 2013, 2013.

GRAEBIN, N. G. et al. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene–divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis. **Biotechnology progress**, v. 28, n. 2, p. 406-412, 2012.

GRYGLEWICZ, S.; JADOWNICKA, E.; CZERNIAK, Agnieszka. Lipase catalysed synthesis of aliphatic, terpene and aromatic esters by alcoholysis in solvent-free medium. **Biotechnology letters**, v. 22, n. 17, p. 1379-1382, 2000.

GUPTA, R. et al. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in lipid research**, v. 57, p. 40-54, 2015.

HAIGH, K. F. et al. Comparison of Novozyme 435 and Purolite D5081 as heterogeneous catalysts for the pretreatment of used cooking oil for biodiesel production. **Fuel**, v. 111, p. 186-193, 2013.

HENGGE, U. R. et al. Scabies: a ubiquitous neglected skin disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 6, n. 12, p. 769-779, 2006.

HEUKELBACH, J.; OLIVEIRA, F. A. S.; FELDMEIERS, Hermann. Ecoparasitoses and public health in Brazil: challenges for control. **Cadernos de saude publica**, v. 19, n. 5, p. 1535-1540, 2003.

HIELSCHER, T. **Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions**. Dans European Nano Systems Workshop - ENS, ParisFrance, 2005.

JOHNSON, W. et al. Safety Assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and its Salts, and Benzyl Benzoate. **International journal of toxicology**, v. 36, n. 3_suppl, p. 5S-30S, 2017.

KRISTENSEN, J. B.; XU, X.; MU, H. Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: screening of commercially available lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 5, p. 329-334, 2005.

LERIN, L. A. et al. Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in ultrasound-assisted system: process optimization and kinetic evaluation. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 5, p. 988-996, 2011.

MACEDO, G. A. et al. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Food Science and Technology (Campinas)**, 1997.

MAJUMDER, A. B. et al. Lipase catalyzed synthesis of benzyl acetate in solvent-free medium using vinyl acetate as acyl donor. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, n. 15, p. 4041-4044, 2006.

MANAN, F. M. A. et al. Enzymatic esterification of eugenol and benzoic acid by a novel chitosan-chitin nanowhiskers supported *Rhizomucor miehei* lipase: Process optimization and kinetic assessments. **Enzyme and microbial technology**, v. 108, p. 42-52, 2018.

MANAN, F. M. A. et al. Statistical modelling of eugenol benzoate synthesis using *Rhizomucor miehei* lipase reinforced nanobioconjugates. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 249-262, 2016.

MARTINS, A. B. et al. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 18-25, 2014.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MCCARTHY, J. S. et al. Scabies: more than just an irritation. **Postgraduate medical journal**, v. 80, n. 945, p. 382-387, 2004.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, Raquel LC. Covalent attachment of lipases on glyoxyl-agarose beads: application in fruit flavor and biodiesel synthesis. **International journal of biological macromolecules**, v. 70, p. 78-85, 2014.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p.213-234, jan. 2011.

MORCELLI, A. V.. Avaliação da influência da utilização do modo de operação de batelada alimentada na produção de metabólitos por *Klebsiella pneumoniae* utilizando glicerol residual da indústria do biodiesel como substrato. 2015.

NARWAL, S. K.; SAUN, N. K.; DOGRA, P.; GUPTA, R. Green synthesis of isoamyl acetate via silica immobilized novel thermophilic lipase from *Bacillus aerius*. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 69–73, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Protein metabolism. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York: WH Freeman and Company, 2004.

NOGALES, J. M. R.; ROURA, E.; CONTRERAS, E. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 63-68, 2005.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource technology**, v. 100, n. 21, p. 5146-5154, 2009.

PARREIRA, L. A. Oxidação aeróbica de olefinas alil aromáticas catalisada por paládio e do álcool benzílico catalisada por nanopartículas de ouro. 2010.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V.. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 52, n. 1, p. 207-219, 2009.

SÁ, A. G. A.; MENESES, A. C.; ARAÚJO, P. H. H.; OLIVEIRA D. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science & Technology**, p. 95-105, 2017.

SÁ, A. G. A. et al. Biocatalysis of aromatic benzyl-propionate ester by different immobilized lipases. **Bioprocess and biosystems engineering**, p. 1-7, 2018.

SALAH, Riadh Ben et al. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368-372, 2007.

SANTOS, J. C.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem Catalysis**, v. 7, p. 2413-2432, 2015.

SANTOS, P. et al. Synthesis of eugenyl acetate by enzymatic reactions in supercritical carbon dioxide. **Biochemical engineering journal**, v. 114, p. 1-9, 2016.

SHARMA, Gajanand et al. Benzyl benzoate-loaded microemulsion for topical applications: enhanced dermatokinetic profile and better delivery promises. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 5, p. 1221-1231, 2016.

SHIKI, P. S. **LIPOZYME RM IM E NOVOZYM 435 COMO BIOCATALISADORES NA SÍNTESE DE BENZOATO DE BENZILA**. 2018. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

SILVA, M. J. A. et al. Lipozyme TL IM as catalyst for the synthesis of eugenyl acetate in solvent-free acetylation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 3, p. 782-795, 2015.

SILVA, M. J. A. et al. Lipozyme TL IM as catalyst for the synthesis of eugenyl acetate in solvent-free acetylation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 3, p. 782-795, 2015.

SIMAS, A.S.L. **Produção de Biodiesel a partir de óleos vegetais virgens e usados, comparando transesterificação básica e enzimática**. 146 f. Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, para obtenção do Grau de Mestre em Bioenergia. Lisboa, 2008.

SMITH, J.E. **Biotechnology**. 3rd ed. Cambridge University Press: 1996.

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

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

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. Immobilized enzymes: methods and applications. **Biocatalysis-from discovery to application**., Berlin, Springer, v. 200, p. 95-126, 1999.

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

VILLENEUVE, Pierre et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

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

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

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 438-450, 1998.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M.. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 438-450, 1998.

