



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

**AVALIAÇÃO DE SISTEMAS REACIONAIS E AMPLIAÇÃO DE
ESCALA PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE CINAMATO DE
GERANILA E SUAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS**

RAISSA DE SOUZA

**FLORIANÓPOLIS - SC
2016**

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

RAISSA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE SISTEMAS REACIONAIS E AMPLIAÇÃO DE
ESCALA PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE CINAMATO DE
GERANILA E SUAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-graduação de
Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau
de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof. Dr^a. Débora de
Oliveira

Florianópolis
2016

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

Souza, Raissa de

Avaliação de sistemas reacionais e ampliação de escala para a síntese enzimática de cinamato de geranila e suas propriedades antimicrobianas/ Raissa de Souza; orientadora, Débora de Oliveira – Florianópolis, SC; 2016.

95 pg.

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

Inclui referências

1.Engenharia Química. 2.Biotecnologia. 3.Reações Enzimáticas. I. Oliveira, Débora. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Raissa de Souza

AVALIAÇÃO DE SISTEMAS REACIONAIS E AMPLIAÇÃO DE ESCALA PARA A SÍNTESE ENZIMÁTICA DE CINAMATO DE GERANILA E SUAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 01 de julho de 2016.

Prof^a. Dr^a. Débora de Oliveira
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Cintia Soares
Coordenadora do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marco Di Luccio
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Lindomar Lerin
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à minha família, em especial à minha irmã Krishna (*in memorium*).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me guiar e estar ao meu lado nesta caminhada.

A minha família por todo apoio, amor e dedicação. Vocês são o bem mais precioso que Deus me deu.

A minha orientadora Débora de Oliveira por toda atenção comigo e com esta dissertação.

Ao professor Ricardo A. F. Machado por todo auxílio prestado.

A empresa Quimisa S/A por ter me compreendido e apoiado e também a empresa Novozymes Brazil pela gentil contribuição com as enzimas utilizadas neste trabalho.

Aos colegas Micheli Zanetti, Deivid Metzker, Mara Cristina Picoli Zenevitz, Viviane Chiaradia e André Polloni pelo auxílio prestado na realização de algumas atividades, meu eterno agradecimento.

Ao laboratório de controle de processos (LCP) pelo espaço e equipamentos cedidos.

A Capes e ao Cnpq pela contribuição durante este período.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram nesta caminhada, foi uma conquista muito importante para mim.

RESUMO

Os ésteres derivados de ácido cinâmico são cada vez mais utilizados na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e também aos seus aromas. Neste trabalho foi produzido um éster derivado de ácido cinâmico, o cinamato de geranila, empregando-se uma reação de transesterificação, utilizando solvente orgânico como meio reacional e temperatura de 60°C, catalisado por uma lipase em três processos reacionais distintos: um utilizando agitação mecânica e banho de ultrassom, outro apenas com agitação mecânica e outro com apenas banho de ultrassom. As reações foram conduzidas durante seis horas e a conversão de éster de geraniol foi determinada por cromatografia gasosa. A confirmação da molécula do composto obtido foi determinada por ressonância magnética nuclear (RMN). Na análise preliminar dos processos, o sistema utilizando apenas ultrassom apresentou uma baixa conversão se comparado com os demais, não sendo utilizado nos experimentos seguintes. Um estudo cinético foi realizado ao longo das seis horas de reação e a conversão obtida foi de aproximadamente 99% nos demais processos (agitação mecânica e agitação mecânica combinada com ultrassom). Isso possibilita concluir que apenas a agitação mecânica é suficiente para que sejam alcançados rendimentos elevados nas condições reacionais estudadas. Posteriormente, a mesma somente com agitação mecânica foi empregada numa ampliação de escala, com volume cinquenta vezes superior ao utilizado anteriormente, que resultou em uma conversão de aproximadamente 89%, evidenciando que este sistema é eficiente para a produção de cinamato de geranila em maiores escalas e a custos reduzidos, se comparado com os processos que empregam ultrassom ou irradiação com microondas. O produto obtido da reação escolhida foi submetido a testes de atividade antimicrobiana com as bactérias *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, demonstrando resultados muito satisfatórios, comprovando que o cinamato de geranila pode ser considerado ativo contra estas bactérias.

Palavras-chave: Ácido cinâmico, cinamato de geranila, transesterificação, lipase, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Derivatives of cinnamic acid have wide applications in food, pharmaceutical and cosmetic industry, due to their antioxidant, antimicrobial, flavor and fragrance properties. This work investigated the geranyl cinnamate production by transesterification of ethyl cinnamate and geraniol, in organic media and temperature of 60 °C, catalyzed by the commercial immobilized lipase Novozym 435. This reaction was conducted in three different conditions bath ultrasound and mechanical stirring, only mechanical stirring and only bath ultrasound. The reactions were carried out for six hours, the conversion was determined by gas chromatography and the geranyl cinnamate characterization was confirmed by H-nuclear magnetic resonance spectroscopy (H-NMR). The first analysis, a very low conversion with the system with just bath ultrasound are obtained, because of this, they are not used for the kinetic. Under kinetic reaction of six hours a conversion of 99% was obtained in both reaction systems, bath ultrasound with mechanical stirring and just mechanical stirring. These results showed that mechanical stirring is an efficient method for achieving high conversion rates. Furthermore, this method was raised fifty times at scale-up procedure and result a conversion of 89%, showing a very good result for geranyl cinnamate production without ultrasound or microwave and saving energy. The antimicrobial activity of the geranyl cinnamate was tested on bacteria *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* the results were considered satisfactory, proving high antimicrobial activity against these bacterias.

Keywords: Cinnamic acid, geranyl cinnamate, transesterification, lipase, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Reação de transesterificação para obtenção do cinamato de geranila	30
Figura 2.2	Reação de esterificação para obtenção de cinamato de etila	31
Figura 2.3	Estrutura química do geraniol.....	32
Figura 2.4	Algumas reações catalisadas por lipases.....	34
Figura 2.5	Enzima catalisando síntese de ésteres por transesterificação.....	37
Figura 2.6	Equipamentos ultrassônicos: (1) Banho; (2) Reator; (3) Sonda.....	40
Figura 2.7	Ação de óleos essenciais na célula bacteriana.....	46
Figura 3.1	Esquema do sistema reacional operando apenas com agitação mecânica.....	51
Figura 3.2	Esquema do sistema reacional operando com agitação mecânica e banho de ultrassom.....	51
Figura 4.1	Sistema para reações com agitação mecânica e banho de ultrassom	56
Figura 4.2	Evolução da conversão de 1 mmol de geraniol e 0,5 mmol de cinamato de etila catalisado por 4,0 mg.cm ⁻³ de Novozym 435 em cinamato de geranila em função do tempo.....	59
Figura 4.3	Ajuste linear aos dados experimentais apresentados no Anexo II para sistema utilizando agitação mecânica	61
Figura 4.4	Ajuste linear aos dados experimentais apresentados no Anexo II para sistema utilizando agitação mecânica e ultrassom	61
Figura 4.5	Sistema com agitação mecânica para reação de ampliação de escala, com volume interno de 2500 mL.....	63
Figura 4.6	Espectro de RMN de ¹ H do cinamato de geranila em DMSO-d ₆	65
Figura 4.7	Espectro de RMN do geraniol	66
Figura 4.8	Espectro de RMN do cinamato de etila	66
Figura 4.9	Espectro de RMN do DMSO	67
Figura 4.10	Espectro de RMN do n-heptano	67
Figura 4.11	Análise de hidrogênio alinhados com a estrutura do cinamato de geranila	68
Figura 4.12	Análise da atividade antimicrobiana do cinamato	

	de geranila frente à bactéria <i>Staphylococcus epidermidis</i>	69
Figura 4.13	Análise da atividade antimicrobiana do cinamato de geranila frente à bactéria <i>Escherichia coli</i>	70
Figura 4.14	Análise da atividade antimicrobiana do cinamato de geranila frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	70
Figura 4.15	Análise da atividade antimicrobiana do cinamato de geranila frente à bactéria <i>Bacillus cereus</i>	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Consumo energético e emissão de carbono de diferentes processos de extração.....	40
Tabela 2.2	Atividade antimicrobiana dos compostos geraniol, ácido cinâmico e cinamato de geranila frente às bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	45
Tabela 4.1	Valores obtidos pelo método de titulação para o cálculo da atividade enzimática da Novozym 435...	55
Tabela 4.2	Resultados obtidos em diferentes sistemas reacionais para 6 horas de reação	57
Tabela 4.3	Característica dos sistemas reacionais disponíveis..	63
Tabela 4.4	Resultados dos deslocamentos de ^1H	65
Tabela 4.5	Resultado da sensibilidade das bactérias avaliadas ao cinamato de geranila	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRL	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
DMSO	Dimetil sulfoxido
FAME	Éster Metílico de Ácido Graxo
FID	Detector de Ionização de Chama
MO	Microondas
p.a.	Para análise
PCA	Ágar Padrão para Contagem
PCL	Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>
PID	Controlador Proporcional Integral Derivativo
PLE	Estearase de fígado suíno
PPL	Lipase pancreática Porcina
PUU	Poli(uréia-uretano)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SDBS	Spectral Database for Organic Compounds
THF	Tetrahydrofurano
TMS	Tetrametilsilano
U	Unidade Internacional de atividade enzimática
US	Ultrassom

LISTA DE SÍMBOLOS

[S]	Concentração de substrato
[S] ₀	Concentração inicial de substrato
D	Diâmetro
K _m	Constante de Michaelis-Menten
L	Altura
log P	Coefficiente de partição de um solvente para o padrão octanol/água de um sistema bifásico
N	Frequência de agitação
R	Radical livre
R ²	Coefficiente de determinação
Re	Número de Reynolds
t	Tempo reacional
V _m	Velocidade máxima da reação
X	Conversão de substrato
δ	Parâmetro de solubilidade de Hildebrand
ρ	Massa específica
v	Velocidade de reação
μ	Viscosidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	OBJETIVOS	27
1.1.1	Objetivo Geral	27
1.1.2	Objetivos Específicos.....	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1	CINAMATO DE GERANILA	29
2.2	DERIVADOS DE ÁCIDO CINÂMICO E CINAMATO DE ETILA	30
2.3	GERANIOL	31
2.4	SISTEMAS ENZIMÁTICOS	33
2.4.1	Enzima	33
2.4.2	Lipase	34
2.4.3	Atividade enzimática	35
2.4.4	Reações enzimáticas	36
2.4.4.1	Solventes orgânicos empregados em reações enzimáticas.	37
2.5	SISTEMAS REACIONAIS	39
2.5.1	Ultrassom	39
2.5.2	Agitação mecânica	41
2.6	AMPLIAÇÃO DE ESCALA	43
2.7	APLICAÇÕES DO CINAMATO DE GERANILA	44
2.7.1	Atividade antimicrobiana	44
2.8	CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE.....	46
3	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1	MATERIAIS	49
3.1.1	Enzima	49
3.1.2	Reagentes	49
3.2	MÉTODOS	49
3.2.1	Método para análise da atividade enzimática de esterificação	49
3.2.2	Métodos reacionais para obtenção do cinamato de geranila	50
3.2.3	Separação do produto cinamato de geranila	52
3.2.4	Determinação da conversão em éster.....	52
3.2.5	Caracterização do cinamato de geranila	53
3.2.6	Determinação de atividade antimicrobiana do cinamato de geranila por difusão em ágar	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	55
4.2	ENSAIOS PRELIMINARES DOS SISTEMAS	

	REAÇIONAIS	56
4.3	AGITAÇÃO MECÂNICA VERSUS AGITAÇÃO MECÂNICA COM ULTRASSOM	57
4.4	<i>SCALE-UP</i> DO SISTEMA REACIONAL COM AGITAÇÃO MECÂNICA	62
4.5	AValiação DA ESTRUTURA DO PRODUTO POR ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	64
4.6	ANÁLISE ANTIMICROBIANA DO CINAMATO DE GERANILA	68
5	CONCLUSÕES	75
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
7	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

A obtenção de ésteres derivados de ácido cinâmico, por apresentarem propriedades antioxidantes e antimicrobianas, além de serem aromas utilizados na indústria alimentícia e de cosméticos, tem despertado interesse tanto da comunidade científica como industrial. O cinamato de geranila, éster abordado neste estudo, apesar de pouco conhecido na literatura, aponta indícios de apresentar tais propriedades.

Reações de esterificação e transesterificação, meios de obtenção desses ésteres, práticas comuns na indústria, estão sendo cada vez mais estudadas em processos biotecnológicos, utilizando rotas enzimáticas (DOSSAT, COMBES e MARTY, 1999). Tais reações catalisadas por enzimas apresentam benefícios, comparados aos métodos tradicionais de catálise, como aumento da eficiência com alta seletividade, menor impacto ambiental e a possibilidade de emprego de elevadas temperaturas e pressões (YU et al. 2010). Em sinergia com essas reações estão sendo abordadas as tecnologias limpas e química verde nos quais se tem investigado recentemente a utilização de microondas e ultrassom, métodos convenientes, seguros e rápidos e que podem contribuir com o aumento da velocidade de reações catalisadas enzimaticamente (JACOTET-NAVARRO et al. 2015).

Alguns estudos estão disponíveis na literatura abordando a utilização do ultrassom como forma de melhorar o desempenho de processos enzimáticos. A título ilustrativo, Lerin et al. (2014) realizou uma revisão de trabalhos com reações enzimáticas utilizando lipases assistidas por sistemas de ultrassom. Outro estudo realizado neste sentido foi o de Balen et al. (2015) que produziram oleato ascórbico em meio a solvente orgânico, catalisado por Novozym 435 em sinergia com um sistema de ultrassom.

Zanetti et al. (2016) estudaram a esterificação do geraniol e ácido cinâmico, numa relação 3:1, em cinamato de geranila e obtiveram uma conversão de 75% de produto a temperatura de 70°C utilizando 15 wt% de enzima *C. antarctica* imobilizada (NS 88011). Os autores também analisaram a atividade antimicrobiana do produto para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e concluíram que o produto é ativo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

O presente trabalho é baseado no estudo de Shinde e Yadav (2014), que analisaram a sinergia entre uma transesterificação enzimática catalisada por Novozym 435 e irradiação por microondas na obtenção de cinamato de geranila. Diferente do que já foi estudado, este trabalho, tem como objetivo a exploração de sistemas alternativos de obtenção

deste produto empregando ultrassom e a agitação mecânica, utilizando catálise enzimática, e analisar a eficiência desses processos. Além disso, o sistema considerado mais eficiente nas condições experimentais empregada foi submetido à ampliação de escala para validação do processo.

Finalmente, tendo em vista de seu potencial para futuras aplicações em alimentos e indústrias químicas, foi avaliado a sua atividade antimicrobiana frente a quatro bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Por uma questão de facilidade de apresentação, o presente documento foi estruturado em capítulos, sendo que no segundo capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica detalhando a importância de cada item abordado. No terceiro capítulo serão apresentados os materiais e métodos que foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho. No quarto capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos. No quinto capítulo serão apresentadas as conclusões obtidas bem como as sugestões para trabalhos futuros.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar diferentes sistemas de obtenção e ampliação de escala na síntese enzimática de cinamato de geranila e suas propriedades antimicrobianas.

1.1.2 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo proposto acima, os seguintes objetivos específicos foram estudados:

1) Produção enzimática de cinamato de geranila pelos sistemas:

- *Agitação mecânica em banho de ultrassom;*
- *Banho de ultrassom;*
- *Agitação mecânica.*

2) Avaliação da produção enzimática de cinamato de geranila em escala piloto;

3) Avaliação de atividade antibacteriana do éster obtido frente às bactérias:

- *Staphylococcus epidermidis;*
- *Escherichia coli;*
- *Staphylococcus aureus;*
- *Bacillus cereus.*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No presente capítulo será apresentada uma revisão do estado da arte sobre os temas relacionados à transesterificação enzimática de cinamato de etila e geraniol para obtenção de cinamato de geranila.

2.1 CINAMATO DE GERANILA

O cinamato de geranila é um éster que pode ser obtido por uma esterificação entre geraniol e ácido cinâmico ou uma transesterificação do geraniol com o cinamato de etila.

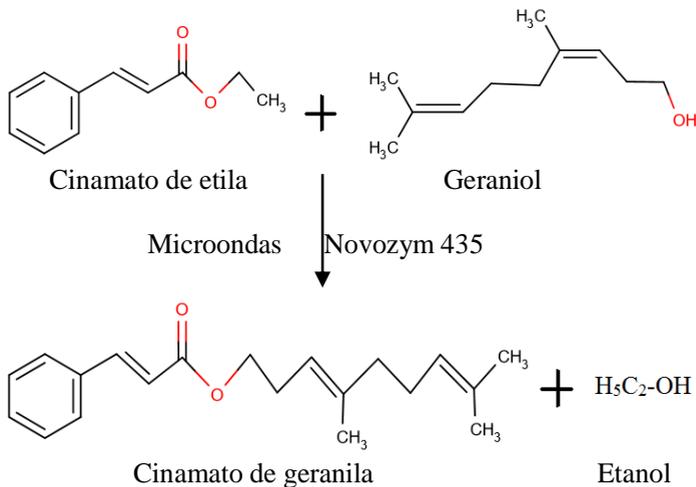
Sua aplicação ainda é pouco conhecida, sendo registrado em patente como ingrediente para perfume, conforme patente US20030036489 A1 (THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, 2003) e investigado em poucos artigos, como o de Shinde e Yadav (2014) e Zanetti et al. (2016).

Por se tratar de um composto fenólico derivado de ácido cinâmico, estudos estão sendo direcionados para investigação de suas propriedades, entre elas atividade antioxidante e antimicrobiana do éster cinamato de geranila.

Zanetti et al. (2016) obtiveram o éster cinamato de geranila por uma esterificação enzimática entre geraniol e ácido cinâmico, utilizando como catalisador a lipase imobilizada de *C. antarctica*, NS 88011. Os autores também investigaram as propriedades deste éster e concluíram que frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* o produto tem uma boa atividade antibacteriana, porém na análise de atividade antioxidante o composto não apresentou um resultado significativo.

Shinde e Yadav (2014) pesquisaram a sinergia entre a irradiação de microondas e a catálise enzimática para obtenção do cinamato de geranila pela transesterificação entre o cinamato de etila e geraniol, conforme apresentado na Figura 2.1. Os pesquisadores utilizaram a ferramenta do planejamento de experimentos de Taguchi para determinar as condições ótimas para esta reação. O presente trabalho utilizou a pesquisa de Shinde e Yadav como base para os estudos realizados.

Figura 2.1: Reação de transesterificação para obtenção de cinamato de geranila.



2.2 DERIVADOS DE ÁCIDO CINÂMICO E CINAMATO DE ETILA

Os compostos fenólicos são muito estudados por apresentarem atividades farmacológicas, inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos, além de participarem de processos responsáveis por conferir cor, adstringência e aroma em vários alimentos (SOARES, 2002).

Esses compostos são largamente distribuídos na natureza, geralmente encontrados em todo o reino vegetal. Estes fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: os flavonóides e derivados e os ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (SOARES, 2002).

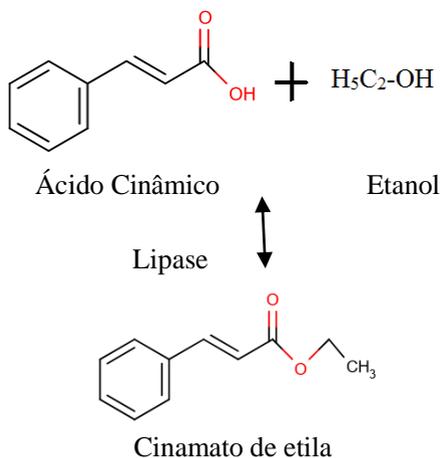
O ácido cinâmico, também conhecido como ácido 3-fenil-2-propenóico, é encontrado em estoraque, óleo de canela e folha de coca. Este ácido apresenta baixa toxicidade e um grande espectro de atividade biológica contra diversos microrganismos (ZANETTI et al. 2016) e tem ganhado importância pelas suas variadas aplicações como aromas, fragrâncias e antioxidantes, este último dependente da característica estrutural do composto (YADAV e SHINDE, 2012a; SHARMA, CHAUHAN e KANWAR, 2011). Devido as suas propriedades polares, o ácido cinâmico apresenta baixa hidrofobicidade, dificultando a aplicabilidade industrial (SHARMA, CHAUHAN e KANWAR, 2011).

O cinamato de etila é um dos ésteres derivados de ácido cinâmico, com aprovação como aroma no *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (WANG et al. 2016). Este produto também tem aplicações em cosméticos, fragrâncias finas, shampoos, sabonetes e também em outras áreas como em produtos para cuidados para a casa (BATHIA et al. 2007). Alguns estudos estão sendo desenvolvidos para a aplicação deste produto em fármacos, como no trabalho desenvolvido por Zhang et al. (2015) que exploraram a atividade acaricida do cinamato de etila contra *Psoroptes cuniculi* e comprovaram sua eficácia contra tal ácaro.

Sharma, Chauhan e Kanwar (2011) estudaram as melhores condições para a esterificação de ácido cinâmico e etanol obtendo cinamato de etila, conforme ilustrado na Figura 2.2. A conversão máxima foi alcançada a uma temperatura de 65°C utilizando lipase pancreática porcina (PPL) como catalisador e 27 horas de reação.

Wang et al. (2016) otimizaram a produção de cinamato de etila utilizando a Lipozyme TLIM como catalisador e alcançaram uma conversão de 99% em 24 horas de reação.

Figura 2.2: Reação de esterificação para obtenção de cinamato de etila.



2.3 GERANIOL

O geraniol, Figura 2.3, é um álcool monoterpênico acíclico de origem natural. A nomenclatura “geraniol” é referente a uma mistura de

isômeros cis-trans, devidamente nomeado geraniol (trans) e nerol (cis) (CHEN e VILJOEN, 2010).

O geraniol tem um aspecto amarelo claro, odor de rosas e gosto cítrico frutado. É insolúvel em água, porém solúvel em muitos solventes orgânicos, e é encontrado em flores de diversas espécies e está presente no tecido vegetal de várias ervas (CHEN e VILJOEN, 2010).

É um produto constituinte de diversos óleos essenciais, como os de rosas e citronela. Encontra-se também presente em baixas concentrações em gerânio e limão (PAROUL et al., 2010).

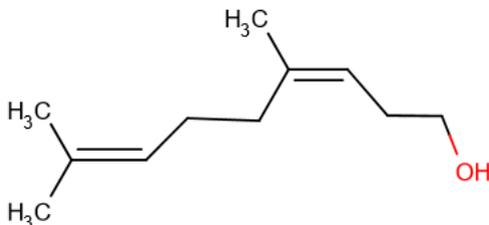
Este álcool monoterpênico é muito utilizado como fragrância e na composição de desodorantes, cosméticos, produtos de cuidados com a casa.

Além disso, o geraniol apresenta propriedades bioquímicas e farmacológicas como apresentado no estudo de Chen e Viljoen (2010) que concluíram o efeito de repelência contra mosquito, inseticida para controle de pestes com baixa toxicidade para mamíferos e degradabilidade. As diversas propriedades biológicas do geraniol incluem as suas atividades antimicrobianas, antioxidante e anti-inflamatória.

Zanetti et al. (2015) analisaram a atividade antimicrobiana do geraniol frente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes*, o qual para as três primeiras bactérias descritas obtiveram um resultado de muito ativo e para a última bactéria de ativo e concluíram que o composto tem uma boa atividade antimicrobiana para o espectro de bactérias estudadas.

Tiwari e Kakkar (2009) estudaram a atividade antioxidante do geraniol e os seus resultados apontam o geraniol como um composto de atividade antioxidante significativa e indicam um potencial farmacológico em doenças de infecção pulmonar, onde esse estresse oxidativo é um ponto crítico.

Figura 2.3: Estrutura química do geraniol.



2.4 SISTEMAS ENZIMÁTICOS

Métodos biocatalíticos geralmente são preferíveis quando comparados com métodos químicos por serem ambientalmente corretos, com economia de energia e recursos por atuarem em condições de reações mais suaves, além de serem altamente específicas reduzindo a obtenção de subprodutos indesejáveis. (KRAJEWSKA, 2004; SHARMA, CHAUHAN e KANWAR, 2011).

2.4.1 Enzima

Enzimas são biomoléculas que atuam como catalisadores, aumentando a velocidade de reações químicas sem alterar o equilíbrio e sem serem consumidos. Com exceção de um pequeno grupo de RNA catalítico, todas as enzimas são de natureza proteica, sendo constituídas por longas cadeias de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas (LEHNINGER, NELSON e COX, 2008).

Apresentam um alto grau de especificidade que permite a seleção das reações que poderão ocorrer em um organismo. Essa especificidade está relacionada com o sítio ativo da enzima, uma cavidade com forma definida, aberta na superfície globular da enzima, constituída por grupos R de aminoácidos que são o quarto substituinte do carbono. Este grupo é formado por uma cadeia específica para cada aminoácido (TORRES, 2001).

Devido sua quimiosseletividade, as enzimas, atuam num único grupo funcional, preservando outras funcionalizações da molécula. Sua estrutura tridimensional consegue distinguir grupos funcionais iguais em diferentes regiões da mesma molécula-substrato, característica oriunda da sua regiosseletividade. A enantiosseletividade as classifica como um catalisador quiral, produzindo compostos opticamente ativos (KRAJEWSKA, 2004).

A atuação das enzimas como catalisadores biológicos está sujeita às mesmas leis termodinâmicas e cinéticas dos catalisadores químicos, isto é, alteram a velocidade da reação, sem influenciar na composição e nem na quantidade do produto final da reação.

É importante ressaltar que a estrutura da enzima é afetada por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura proteica, destes, notadamente o pH e a temperatura (TORRES, 2001). A perda da estrutura que propicia a função da proteína é denominada de desnaturação proteica que é um processo irreversível.

2.4.2 Lipase

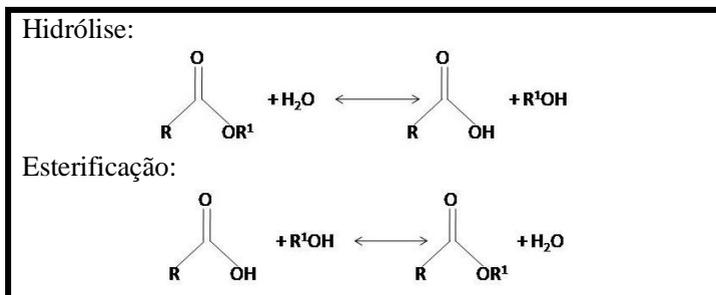
Lipases são definidas como enzimas que hidrolisam triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono. Elas são produzidas por praticamente todos os organismos vivos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias (OLIVEIRA, 2007). As principais fontes de obtenção desta enzima são as plantas (sementes oleaginosas e grãos), os animais (pancreática, hepática e gástrica) e alguns microrganismos (leveduras, fungos e bactérias) (TREICHEL et al., 2010).

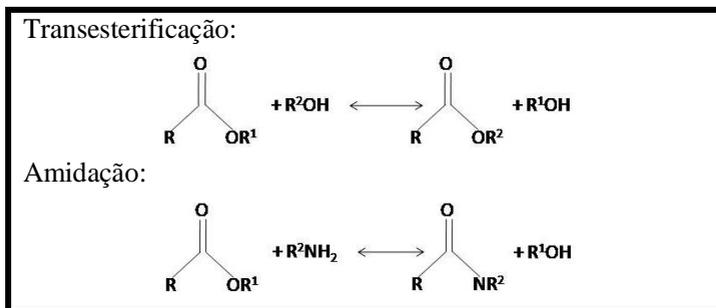
As enzimas hidrolíticas atuam na interface orgânico-aquosa, e não necessitam de cofatores para sua atividade. Apresentam grande importância na biocatálise atual, devido à imensa capacidade de catalisar diversas reações, além de serem estáveis tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico (TREICHEL et al., 2010).

Entre as enzimas aplicadas em síntese orgânica, as lipases são utilizadas com maior frequência. Pois apresentam características versáteis como disponibilidade comercial, baixo custo, estereoseletividade e a possibilidade de utilizar em uma ampla faixa de pH e temperaturas entre 20° a 70°C (CRESPO et al., 2005). Segundo Theil (1995), lipases são muito fáceis de manusear e estáveis a solventes orgânicos.

Lipases são usadas como catalisadores em solventes orgânicos em várias reações como por exemplo esterificação, transesterificação, amidação, epoxidação, hidrólises, tio-esterificação e trans-esterificação (YADAV e SHINDE, 2012a), essas reações estão ilustradas na Figura 2.3. É importante levar em consideração que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para cada classe de reação (PAQUES; MACEDO, 2005).

Figura 2.4: Algumas reações catalisadas por lipases.





A lipase é muito utilizada para sintetizar éster de cinamato de etila por condições melhoradas em sistemas de solventes orgânicos livres de água (SHARMA, CHAUHAN e KANWAR, 2011). Sharma, Chauhan e Kanwar (2011) sintetizaram cinamato de etila empregando uma esterificação de álcool etílico com ácido cinâmico utilizando uma enzima imobilizada, lipase pancreática porcine (PPL). Em seu estudo, os pesquisadores variaram a concentração de lipase entre 5 e 30 mg.mL⁻¹, utilizando DMSO como solvente a temperatura de 55°C e concluíram que o acréscimo da concentração de enzima não é proporcional a conversão. No caso, a concentração ótima foi de 10 mg.mL⁻¹.

Yadav e Shinde (2012a) estudaram a sinergia entre microondas e lipase em meio orgânico de uma transesterificação de etil (2E)-3-fenilprop-2-enoato e 4,8-dimetilnon-7-en-1-ol. Neste estudo foi analisado qual a melhor lipase para tal reação. As enzimas avaliadas a uma concentração de 4 kg.m⁻³ foram Novozym 435, Lipozyme RMIM, Lipozyme TLIM e Lipase AYS Amano o meio utilizado foi solvente orgânico, n-hexano, a uma temperatura de 60 °C. Verificou-se que a Novozym 435 obteve uma conversão superior comparada às outras enzimas avaliadas nas condições descritas, esta lipase é termoestável e muito utilizada na síntese de ésteres e amidas.

A temperatura tem um papel importante na catálise enzimática, pois cada enzima possui uma faixa ótima de trabalho, e no caso da Novozym 435, esta é situada na faixa de 40-70°C (PAROUL et al., 2010).

2.4.3 Atividade enzimática

Quando se trata de soluções enzimáticas, o que vale não é a massa da enzima e sim sua atividade catalítica, pois as enzimas podem estar inativadas ou desnaturadas, ou seja, perderam a sua conformação

inicial e sua atividade catalítica, porém, manterem a massa. Torres (2001) definiu como a atividade de uma enzima é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa.

A velocidade da reação é expressa em Unidades Internacionais. Uma Unidade Internacional (U) é a quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto em condições ótimas (pH, temperatura e concentração de enzima), especificadas para cada caso (TORRES, 2001).

Com relação à determinação da atividade enzimática da lipase, não é uma tarefa simples, os métodos em geral baseiam-se na quantificação dos ácidos graxos liberados por hidrólise enzimática de um triacilglicerol ou de um substrato artificial (OLIVEIRA, 2007).

Segundo Oliveira (2007), vários métodos têm sido desenvolvidos para acompanhar a atividade lipolítica em reações de hidrólise, sendo que os mais empregados são baseados em titulometria e espectrofotometria.

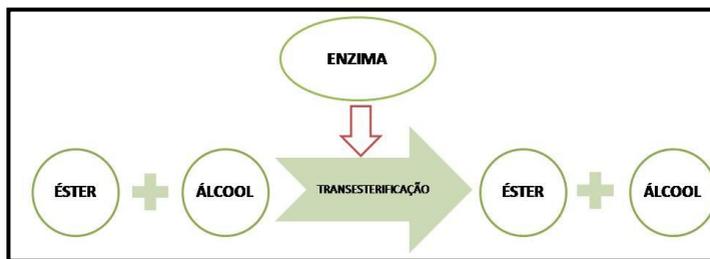
O método titulométrico, embora seja pouco preciso, por ser mais simples e econômico, é o método oficial para a determinação da atividade lipolítica. Baseia-se na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima com um volume de NaOH ou KOH. O volume de base utilizado, em função do tempo de reação, está relacionado com a quantidade de ácidos graxos liberados e conseqüentemente com a atividade enzimática (OLIVEIRA, 2007).

2.4.4 Reações enzimáticas

Reações de esterificação e transesterificação são práticas comuns na indústria utilizando ácidos como catalisadores em alta pressão e temperatura (100 °C a 300 °C). Essas reações químicas geralmente oferecem baixa seletividade resultando em produtos indesejáveis e de baixo rendimento (DOSSAT, COMBES e MARTY, 1999), o que motivou o desenvolvimento de novos métodos, como os processos enzimáticos, resultando no acréscimo da eficiência e seletividade com menor impacto ambiental.

A reação de transesterificação, também conhecida como alcoólise, consiste na reação entre um éster e um álcool, com formação de outro éster e outro álcool, conforme ilustrado na Figura 2.4.

Figura 2.5: Enzima catalisando síntese de ésteres por transesterificação.



Um exemplo da tendência de reações enzimáticas é apresentado no estudo de Yu et al. (2010) que abordam a produção de biodiesel por método enzimático apresentando as vantagens citadas comparado ao método tradicional, além de reduzir o consumo de energia.

2.4.4.1 Solventes orgânicos empregados em reações enzimáticas

Solventes orgânicos utilizados em reações de transesterificação são comuns, uma vez que contribuem para a não desnaturação da enzima, podendo levar a maiores rendimentos e favorecendo a reutilização da mesma quando imobilizada (SILVA, 2011). Além dessas vantagens a catálise enzimática em meio orgânico possibilita utilizar substratos pouco solúveis em água e pode deslocar o equilíbrio termodinâmico das reações que não ocorreriam em meio aquoso (CRUZ JÚNIOR, 2007).

São crescentes os estudos voltados para o uso das enzimas associadas a solventes orgânicos empregando tecnologias como ultrassom e microondas para obterem um aumento na taxa da reação com mínima presença de água (GUPTA e ROY, 2004) (KWIATKOWSKA et al., 2011).

Um estudo realizado neste sentido foi de Yu et al. (2010) que investigaram o efeito de diversos solventes orgânicos com variações dos valores de log P (coeficiente de partição de um solvente para o padrão octanol/água de um sistema bifásico), constantes dielétricas, parâmetros de solubilidade e outros parâmetros para uma transesterificação enzimática de óleo de soja. Os autores concluíram que a atividade enzimática é melhorada adicionando solventes com grupo hidroxila, pois eles solubilizam tanto o metanol quanto o glicerol. E para a seleção do solvente mais apropriado para uma reação enzimática concluíram que

é necessário analisar todos os parâmetros como viscosidade, constante dielétrica e $\log P$.

A correlação entre polaridade e atividade enzimática está relacionada com a capacidade dos solventes orgânicos manterem a camada de água necessária para estabilizar a enzima (LAANE et al., 2009).

Laane et al. (2009) estudaram um método de otimização em processos biocatalíticos com solvente orgânico e concluíram que a elevada atividade biocatalítica pode ser obtida com solventes com $\log P > 4$ que mantêm a camada de água essencial. Os autores concluíram que altas taxas de atividade enzimática podem ser obtidas quando a polaridade do solvente orgânico é baixa ($\delta < \sim 8$) e sua massa molar é > 150 .

Yadav e Shinde (2012a) estudaram a influência de diversos solventes orgânicos numa transesterificação catalisada por lipase entre etil (2E)-3-fenilprop-2-enoato e 4,8-dimetilnon-7-en-1-ol. Os solventes empregados na reação foram n-heptano, n-hexano, tolueno, tetraidrofurano (THF) e 1,4-dioxano. Os autores observaram que com o aumento da faixa de hidrofobicidade do solvente de -1,1 até 4, houve também um aumento na atividade enzimática, sendo para tais reações, os solventes hidrofóbicos são mais preferíveis que solventes hidrofílicos desde que haja uma camada de água essencial para envolver a enzima, que é necessária para a atividade enzimática. Yadav e Shinde (2012a) concluíram que o n-heptano alcançou a máxima conversão comparado aos outros solventes avaliados.

Em resumo, os solventes orgânicos apresentam algumas vantagens para a transesterificação enzimática, segundo Monot (1994):

- Aumento da disponibilidade de substratos pouco solúveis em água;
- Deslocamento do equilíbrio das reações;
- Diminuição do número de reações indesejáveis;
- Simplicidade dos procedimentos de recuperação do produto e do biocatalisador;
- Controle de estereoseletividade das reações enzimáticas;
- Redução de eventuais inibições por substratos e produtos;
- Aumento da estabilidade da enzima.

2.5 SISTEMAS REACIONAIS

O emprego de processos enzimáticos tem sido motivado pela busca de tecnologias limpas. Porém, no ponto de vista econômico este processo apresenta alto custo e baixo rendimento comparado aos processos químicos, sendo necessário encontrar um sistema que viabilize as enzimas como catalisadores industriais (LERIN et al., 2014).

2.5.1 Ultrassom

O uso de ultrassom como intensificador de desempenho de bioprocessos tem sido muito investigado. Este método aumenta a taxa de reação e possibilita, geralmente, um elevado rendimento (KWIATKOWSKA et al., 2011; XIAO et al., 2011).

O mecanismo do ultrassom é físico, conhecido como cavitação que consiste em criar, aumentar e implodir as cavidades de vapor e gases (MARTINES, DAVOLOS e JÚNIOR, 2000). Este mecanismo aumenta o transporte de massa através da interface líquido/sólido e reduz o espessamento da barreira de difusão promovendo uma troca de material pela interface devido a transmissão das ondas pelo líquido e o efeito de cavitação, apresentando maior impacto em sistemas heterogêneos (KWIATKOWSKA et al., 2011).

Os equipamentos de ultrassom, geralmente utilizados nas pesquisas são: sonda de ultrassom (aproximadamente 20 kHz); banho de ultrassom (aproximadamente 40 kHz) e transdutor ultrassônico acoplado a um reator vitrificado (entre 300 a 1100 kHz), demonstrados na Figura 2.5. Porém, no caso de processos enzimáticos, onde a alta frequência do ultrassom pode causar uma diminuição na atividade enzimática, os equipamentos mais utilizados são a sonda e o banho de ultrassom por serem considerados de baixa frequência, menor que 100 kHz (KWIATKOWSKA et al., 2011).

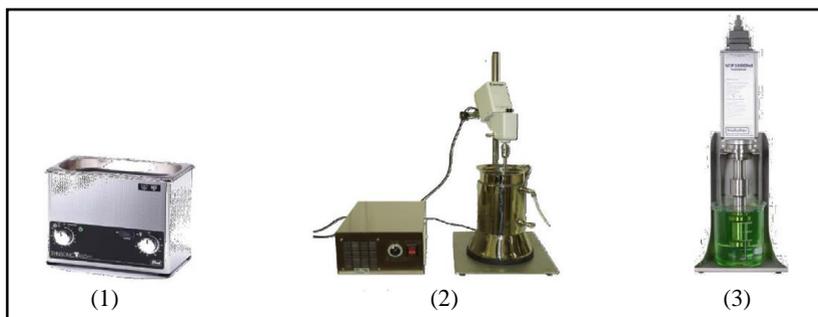
Jacotet-Navarro et al. (2015) analisaram o consumo de energia e a emissão de carbono para alguns processos de extração, demonstrados na Tabela 2.1. Relacionando o consumo de energia e a emissão de carbono os processos com ultrassom aplicados durante 30 minutos apresentam os menores valores em ambos os casos, sendo o banho de ultrassom o processo mais econômico.

Tabela 2.1: Consumo energético e emissão de carbono de diferentes processos de extração.

Processo de extração	Condições experimentais (temperatura – tempo de extração)	Consumo energético (kWh/kg extraídos)	Emissão de carbono (kg CO ₂ /kg extraído)
Banho de US	40 °C – 30 min	15	12
Reator de US	40 °C – 30 min	39	31
Sonda de US	40 °C – 30 min	23	19
Refluxo por MO	78 °C – 30 min	85	68
MO sob pressão de vapor	125 °C – 30 min 150 °C – 30 min	171 157	137 125

Adaptado: Jacotet-Navarro et al. (2015). US: Ultrassom; MO: Microondas.

Figura 2.6: Equipamentos ultrassônicos: (1) Banho; (2) reator; (3) sonda.



Babicz et al. (2010) estudaram a produção de diacetil glicerol partindo da hidrólise parcial do óleo de soja catalisado por lipase comparando dois processos, um utilizando agitação mecânica e outro utilizando banho de ultrassom. Os autores concluíram um aumento de conversão de produto com a utilização do ultrassom nas condições investigadas.

Levando em conta a importância industrial do produto estudado Balen et al. (2015) investigaram a esterificação enzimática assistida por banho de ultrassom do ascorbil oleato, partindo dos reagentes ácido ascórbico e ácido oleico em meio a solvente orgânico, catalisado pela lipase comercial Novozym 435. Os autores alcançaram conversões satisfatórias de ascorbil oleato utilizando terc-butanol como solvente e banho de ultrassom sem agitação mecânica.

Trentin et al. (2013) também avaliaram o efeito da irradiação por banho de ultrassom numa esterificação de ácido graxo, obtido de óleo de soja, em éster metílico de ácido graxo (FAME) e éster etílico de ácido graxo (FAEE) utilizando como catalisador a enzima comercial Novozym 435. Neste estudo os resultados utilizando ultrassom para os sem o uso foram similares, não apresentando vantagens do uso desta tecnologia nas condições estudadas. Os autores apontam duas possibilidades para tal resultado, como a alta concentração de etanol na alimentação que pode ter influenciado na transferência de massa e a não formação de glicerol.

Ribeiro, Passaroto e Brenelli (2001) estudaram a hidrólise enzimática do 3-hidroxi-3-fenilpropanoato com as enzimas esterase de fígado suíno (PLE), lipase de *Candida rugosa* (CRL) e lipase de *Pseudomonas cepacia* (PCL) comparando a reação em banho de ultrassom com o uso de agitação magnética. Os resultados observados mostraram que com todas as enzimas houve uma redução do tempo de reação utilizando o banho de ultrassom, PCL reduziu de 43 para 24 horas, PLE de 40 minutos para 30 minutos e CRL de 7 dias para 27 horas. Eles concluíram que o uso de banho de ultrassom pode reduzir o tempo das reações enzimáticas de hidrólise sem alterar a enantioseletividade da reação e a atividade enzimática.

Rokhina, Lens e Virkutyte (2009) em seu estudo sobre o estado da arte da utilização de ultrassom em baixa frequência em processos enzimáticos apontam alguns parâmetros, como frequência, intensidade, ciclo de trabalho e duração da irradiação, como possíveis causadores de defeitos das células biotecnológicas. Em enzimas, ao contrário de uma desnaturação por temperatura, o ultrassom não destrói o sítio ativo, porém em alta potência pode desativar algumas enzimas como tripsina e protease alcalina (ROKHINA; LENS; VIRKUTYTE, 2009).

Diversos estudos estão sendo desenvolvidos utilizando o ultrassom como uma alternativa de “tecnologia verde” e potencializador de processos enzimáticos.

2.5.2 Agitação mecânica

Influência da velocidade de agitação está relacionada com a resistência a transferência de massa externa. Yadav e Lathi (2006) estudaram a influência da velocidade de agitação na esterificação de ácido láurico com 1,2-propanodiol em meio com solvente orgânico. A faixa de velocidade estudada foi de 250-1000 rpm em 30°C. Os autores concluíram que a taxa da reação aumenta com o aumento da velocidade

e que teve um aumento significativo entre 300-500 rpm, definindo em 500 rpm a melhor velocidade de agitação para as condições determinadas.

O estudo de Yadav e Lathi (2006) consistia de três fases, fase líquida orgânica, lipase imobilizada sólida e um filme aquoso envolvendo a fase sólida. Os poros do catalisador sólido são preenchidos com a fase aquosa, os reagentes têm que difundir a partir da fase orgânica para a superfície externa da partícula coberta por uma fina camada aquosa, e dali para o interior dos poros do catalisador. Limitações de transferência de massa externa e difusão interna podem ser minimizadas conduzindo a reação numa velocidade de agitação ótima e baixa carga de enzima com ótimo tamanho de partícula (YADAV e PAWAR, 2012b).

Shinde e Yadav (2014) elaboraram estudos experimentais para indicar qual a influência da variação de alguns parâmetros estudados para o aumento de produtividade na transesterificação enzimática de obtenção do cinamato de geranila. Através do modelo de Taguchi L16, os efeitos dos parâmetros que afetam a reação enzimática são: velocidade de agitação > quantidade de enzima > temperatura > razão molar, reiterando a importância da velocidade de agitação nesta reação.

Halim e Kamaruddin (2008) estudaram o efeito da agitação mecânica numa transesterificação enzimática de óleo de palma oriundo de resíduos de cozinha em terc-butanol. Os autores avaliaram o efeito entre 140 rpm até 220 rpm e encontraram a maior conversão com 200 rpm, este resultado pode estar relacionado com uma possível inativação da enzima por causa da espuma formada nesta rotação ou mesmo uma ruptura da estrutura da enzima. Os autores também observaram que com a alta rotação as enzimas ficaram presas na parede do reator e reduzindo sua interação com o sistema.

Coggon, Vasudevan e Sanchez (2007) investigaram a influencia de alguns fatores na transesterificação enzimática do óleo de oliva com metanol utilizando o software JMP IN 5.1 e concluíram que temperatura, agitação e massa de catalisador são os fatores mais importantes. Também descobriram que o efeito da agitação está relacionado com a quantidade de catalisador e com a quantidade de metanol e os melhores resultados foram alcançados num sistema com agitação mecânica e sem a presença de solvente.

2.6 AMPLIAÇÃO DE ESCALA

Aumento de escala em bioprocessos é fundamental para o desenvolvimento da indústria biotecnológica. O desafio é produzir grandes quantidades com equivalente produtividade e qualidade do produto (XING et al. 2009). As três principais escalas para desenvolvimento em bioprocessos são laboratório, planta piloto e produção industrial (JUNKER, 2004).

A ampliação de escala de bioprocessos enfrenta abordagens experimentais, utilizando regras empíricas para manter constante alguns dos principais parâmetros do processo. Os mais populares são consumo volumétrico de energia, coeficiente volumétrico de transferência de massa, tipo de impelidor e velocidade, número de Reynolds e tempo de agitação (MONSALVE-BRAVO et al., 2015).

Porém, processos biotecnológicos exigem qualidade e engenharia específica para cada produto, nestes casos um desenvolvimento estatístico é essencial para investigar as relações complexas, como a composição do meio e as condições de processo (BAREITHER et al., 2013).

O ajuste em escala laboratorial minimiza o consumo de tempo e dinheiro em estudos de ampliação de escala e é uma importante ferramenta, pode ser realizado através de um desenho da caracterização do processo. O uso de um reator automatizado em escala laboratorial elimina algumas interferências comuns como *set-up* do reator, esterilização e limpeza (BAREITHER et al., 2013).

Segundo estudos de Marks (2003), velocidade de agitação apresenta uma restrição muito importante para bioreatores de células de cultura, pois podem sofrer com massa de transferência e homogeneidade insuficientes devido à baixa agitação.

Considerando fatores importantes num bioprocessos como tempo de agitação, transferência de oxigênio e remoção de dióxido de carbono, Xing et al. (2009) estudaram a ampliação de escala de um processo de cultura de células animais. Os autores avaliaram as características de processo como transferência de oxigênio, tempo de agitação e taxa de remoção de dióxido de carbono e todas, comparado à escala laboratorial, diminuíram quando ampliado para 5000 L.

Coggon, Vasudevan e Sanchez (2007) também realizaram uma ampliação de escala em seu estudo onde trabalhavam com um reator de 40 mL e ampliaram para um reator de 2 L, os resultados obtidos sugeriram que a ampliação de escala pode ser realizada, nas condições determinadas, sem grandes perdas de conversão.

Outro estudo realizado neste sentido foi de Filly et al. (2014) que avaliaram a extração livre de solvente em microondas do óleo essencial de alecrim em escala laboratorial e ampliaram para uma escala piloto, num reator de 150 L. Os concluíram que este método de extração tem potencial aplicabilidade na indústria.

Segundo Monsalve-Bravo et al. (2015) diversos estudos de ampliação de escala em processos biotecnológicos estão sendo realizados com o intuito de entender as condições de operação e definir os parâmetros de processo. Porém, ainda não existe nenhum acordo para resolver tal problema, evidenciando a necessidade de continuar os desenvolvimentos para a indústria biotecnológica.

2.7 APLICAÇÕES DO CINAMATO DE GERANILA

Conforme mencionado no item 2.1, os derivados de ácido cinâmico são estudados por suas conhecidas aplicações como antioxidantes, atividades antibacterianas, antivirais e antifúngicas.

Os antioxidantes são substâncias que podem retardar ou inibir os processos de oxidação (SILVA, 2014). A atividade antioxidante é uma característica de grande importância na indústria, principalmente na alimentícia, pela necessidade de preservação dos alimentos, aumentando o tempo de estocagem e diminuindo as perdas nutricionais.

Zanetti et al. (2016) avaliaram a atividade antioxidante do cinamato de geranila e na maior concentração avaliada de $15000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ obtiveram um resultado de 8,49%, um valor baixo para substâncias caracterizadas como antioxidantes.

Outra propriedade investigada desses compostos é a ação biocida dos agentes antimicrobianos, que podem ser definidos como substâncias ativas que contêm uma ou mais substâncias destinadas a destruir, inibir o crescimento, prevenir a ação destrutiva e exercer um efeito controlador em microrganismos patogênicos por tratamentos químicos ou biológicos, sendo que os biológicos podem ser considerados ecologicamente corretos (SILVA, 2014).

2.7.1 Atividade antimicrobiana

As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais são conhecidas há séculos, porém sua comprovação científica é recente e diversos estudos são publicados continuamente investigando novos compostos e novas formas de obtenção desses compostos.

A atividade antimicrobiana é avaliada por determinação de uma pequena quantidade de uma dada substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo. Foram desenvolvidos diversos métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica. Os principais são método de difusão em ágar, método de macrodiluição e método de microdiluição (OSTROSKY et al., 2008).

Cosentino et al. (1999) estudaram a composição química e as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de *Thymus*. Os autores confirmaram que as atividades antimicrobianas dos óleos essenciais de *Thymus* estão diretamente relacionadas com o alto teor de compostos fenólicos. Este estudo reforça o interesse na investigação da atividade antimicrobiana do cinamato de geranila.

Zanetti et al. (2016) avaliou a atividade antimicrobiana do cinamato de geranila, comparando com os seus reagentes ácido cinâmico e geraniol, frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 2.2, onde o cinamato de geranila apresentou uma ótima atividade antimicrobiana para as bactérias avaliadas. Os autores também observaram que o halo de inibição do cinamato de geranila, para ambas bactérias, apresentaram um resultado intermediário. Essa combinação demonstra um efeito sinérgico entre os reagentes.

Tabela 2.2: Atividade antimicrobiana dos compostos geraniol, ácido cinâmico e cinamato de geranila frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

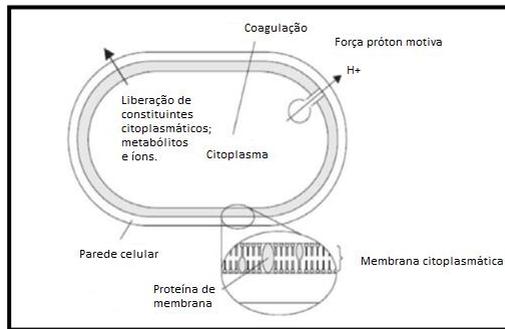
Microrganismo	Geraniol	Ácido cinâmico	Cinamato de Geranila
	Halo de Inibição (mm)		
<i>E. coli</i>	25,5 ± 0,05	11,0 ± 0,06	20,2 ± 0,41
<i>S. aureus</i>	35,3 ± 0,08	16,5 ± 0,10	22,8 ± 0,40

Pesquisar novos agentes antimicrobianos se faz cada vez mais necessário devido ao surgimento de microrganismos resistentes, relacionado ao uso indiscriminado de antimicrobianos, e de infecções oportunistas fatais. Estes agentes são de grande importância para as indústrias, principalmente as farmacêuticas.

Os mecanismos de atuação dos óleos essenciais nos microrganismos não estão totalmente esclarecidos. Santos Júnior (2011) estudou a atuação dos óleos essenciais sobre biofilme de *Staphylococcus aureus* e sugeriu que o mecanismo de atuação entre os óleos e as

bactérias está relacionado com a modificação da permeabilidade da membrana citoplasmática, danos a vários sistemas enzimáticos, interrupção da força próton motriz, do fluxo de elétrons, do transporte ativo e da coagulação dos conteúdos celulares. Estes fatores influenciam as características funcionais da membrana, pois a permeabilização da membrana citoplasmática está associada à dissipação da força próton motiva, do pH interno, do potencial elétrico e à perda de metabólitos e íons, como potássio e fosfato, causando danos estruturais à parede citoplasmática.

Figura 2.7: Ação dos óleos essenciais na célula bacteriana.



Fonte: Adaptado de Santos Júnior (2011).

Estas pesquisas voltadas em buscar agentes antimicrobianos podem contribuir significativamente para o desenvolvimento no campo da saúde, com a finalidade de encontrar substâncias mais eficazes e menos tóxicas contra o surgimento de microrganismos patogênicos (OSTROSKY et al., 2008). A aplicação direta de óleos essenciais na defesa contra patógenos ou bactérias na indústria alimentícia pode gerar algumas desvantagens, pois adicionados em altas quantidades podem modificar sabor, textura e aroma dos alimentos, motivando buscar compostos e modificá-los para potencializar suas propriedades biotecnológicas (SILVA, 2014).

2.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Neste capítulo foi apresentada uma revisão bibliográfica do estado da arte em que se insere o presente trabalho, onde foram consideradas as contribuições disponíveis na literatura para o desenvolvimento desta dissertação. Considerações relevantes para a

produção do produto que se deseja obter e suas propriedades, bem como os seus sistemas de produção foram apresentados, os quais podem vir a ser exploradas pelas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos.

Conclui-se que as reações de transesterificação enzimática para obter este composto e os meios que podem ser utilizados como ultrassom e agitação mecânica ainda estão em desenvolvimento e existem diversas lacunas a serem exploradas. No presente trabalho, são avaliados diferentes sistemas de obtenção do cinamato de geranila por síntese enzimática e ampliação de escala, bem como suas propriedades antimicrobianas com o propósito de oferecer uma contribuição ao desenvolvimento do estado da arte.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo serão apresentadas as metodologias e materiais empregados para a realização dos experimentos e caracterização dos produtos obtidos.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Enzima

A enzima comercial Novozym 435 (Novozymes) foi utilizada como catalisador das reações de transesterificação e foi gentilmente cedida pela Novozymes Brasil.

Novozym 435 é uma lipase obtida da *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa e utilizada para síntese de ésteres. Sua atividade máxima ocorre a aproximadamente 60 °C e é de 10000 PLU/g (atividade expressa em μmol de n-propil laurato produzido por grama de catalisador).

3.1.2 Reagentes

Os insumos empregados para a realização das reações foram n-heptano (fornecido pela empresa Vetec em qualidade *p.a.*), geraniol e cinamato de etila (ambos fornecidos pela empresa Sigma-Aldrich em qualidade *p.a.*).

Os insumos utilizados na determinação da atividade enzimática foram o ácido láurico (fornecido pela empresa Sigma-Aldrich em qualidade *p.a.*), álcool n-propílico, acetona (ambos fornecidos pela empresa Vetec em qualidade *p.a.*) e hidróxido de sódio (Quimex em qualidade *p.a.*) com molaridade de 0,01 mol.L⁻¹.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Método para análise da atividade enzimática de esterificação

Para análise da atividade enzimática o procedimento adotado foi adaptado de Oliveira et al. (2006). A atividade foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na esterificação entre ácido láurico e álcool n-propílico. A reação consistiu em misturar 3 g de ácido láurico com 0,9 g de álcool n-propílico em banho encamisado a 60 °C, até completa dissolução do ácido. Em seguida retirou-se três alíquotas de 150 μL e

adicionou-se em três erlenmeyers com 20 mL de uma solução de acetona:etanol (1:1) (triplicata do branco). Titulou-se até pH 11 com NaOH 0,01 mol.L⁻¹. Após a retirada da alíquota, adicionou-se a enzima ao reator encamisado. Deixando com agitação magnética (450 rpm) por 40 minutos. Preparou-se mais três erlenmeyers com acetona:etanol. Retirou-se mais três alíquotas que foram adicionadas aos frascos com acetona:etanol e titulado até pH 11.

Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizada a Equação 3.1.

$$Atividade \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{v_0 - v_{40}}{t * m_a} * M * 10^3 \quad (3.1)$$

Sendo:

M = molaridade da solução de NaOH;

v₀= volume de NaOH (mL) na titulação das amostras de tempo 0;

v₄₀= volume de NaOH (mL) na titulação das amostras após 40 minutos de reação;

m_a = massa de derivado enzimático utilizado na reação;

t = tempo de reação (40 minutos);

U = 1 μmol de ácido/minuto.

3.2.2 Métodos reacionais para obtenção de cinamato de geranila

Para as reações de síntese enzimática de cinamato de geranila foram empregados um reator de vidro de borosilicato, encamisado, com volume interno de 100 mL (Dist Ltda). As reações foram conduzidas a 60 °C e o controle da temperatura foi realizado com um banho termocriostático com controlador PID e recirculação externa de água (Microquímica Ltda).

Quando as reações foram conduzidas sob agitação mecânica (300 rpm) foi empregado um agitador mecânico (Modelo 713-T, Fisaton Equipamentos Científicos) com um impelidor tipo âncora. Para o monitoramento da agitação foi utilizado um tacômetro digital (modelo TD2004-C, Takotron), conforme esquematizado na Figura 3.1.

Numa segunda etapa, as reações foram realizadas com agitação por ultrassom e agitação mecânica. Para tanto foi empregado um banho com controle de temperatura e potência ultrassônica de 165 W (Ultronique, Q 5.9/37A). Para melhor compreensão, um esquema do sistema reacional é mostrado na Figura 3.2.

Figura 3.1: Esquema do sistema reacional operando apenas com agitação mecânica. R = Sensor do tacômetro digital; M = Agitador mecânico; RB = Reator batelada; TC = Controlador de temperatura; B = Banho temcriostático.

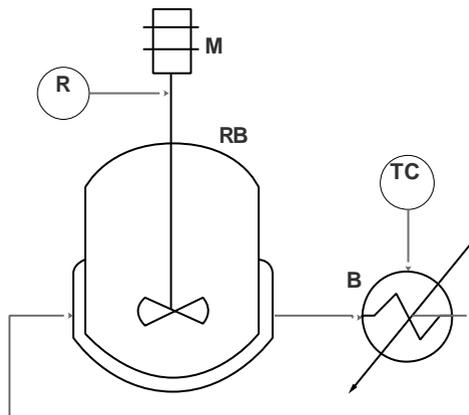
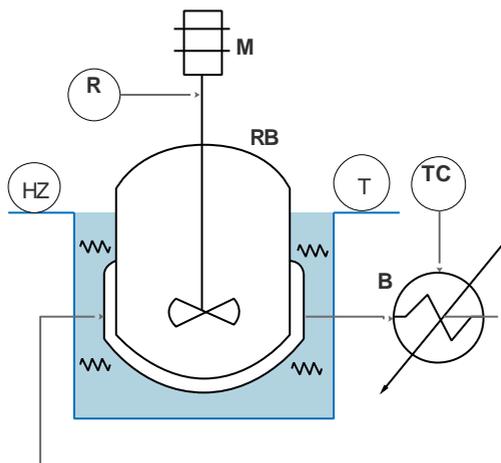


Figura 3.2: Esquema do sistema reacional operando com agitação mecânica e banho de ultrassom. R = Sensor do tacômetro digital; M = Agitador mecânico; RB = Reator batelada; TC = Controlador de temperatura; B = Banho temcriostático; HZ = Controlador de potência do banho de ultrassom; T = Indicador de temperatura do banho de ultrassom.



Em ambos os sistemas reacionais foram empregados 1 mmol de geraniol, 0,5 mmol de cinamato de etila e $4,0 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ da enzima Novozym 435 em relação ao volume reacional, os quais foram

alimentados aos reatores previamente carregados com n-heptano (15 mL) aquecido a 60 °C. Os volumes reacionais foram definidos em experimentos prévios tendo como base o trabalho de Shinde e Yadav (2014), onde os valores foram calculados para um volume total de 50 mL. Em todos os casos a agitação mecânica foi mantida em 300 rpm ao longo de toda a reação em que a mesma foi empregada, com tempo de batelada de 6 h.

Para a reação de *scale-up* as condições utilizadas foram as mesmas apresentadas para o sistema com agitação mecânica, porém o volume do reator utilizado foi de 2500 mL, utilizando um volume de reação de 2000 mL. As quantidades empregadas dos reagentes foram adaptadas as diferenças de escalas, sendo 133,33 mmol de geraniol, 66,67 mmol de cinamato de etila e 8000 mg.cm⁻³ da enzima Novozym 435.

3.2.3 Separação do produto cinamato de geranila

Após a reação a solução foi filtrada utilizando um funil de Büchner com um papel filtro qualitativo (marca Whatman, 110 mm de diâmetro, Alemanha).

Para a evaporação do solvente foi utilizado um rotaevaporador (Modelo Rotavapor R-3, Buchi, Suíça), à temperatura de 55 °C em pressão reduzida (200 mmHg), até que a massa permanecesse constante.

3.2.4 Determinação da conversão em éster

As análises de conversão em éster foram realizadas num cromatógrafo gasoso, marca Shimadzu modelo 2010 com injetor automático e detector de ionização de chama (FID). A coluna capilar empregada foi Rtx-WAX 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm (Restek, n° de série: 1208976). A programação de temperatura da coluna empregada foi de: 90 °C por 1 min, seguido por uma rampa de aquecimento de até 150 °C por 1 min e posteriormente com uma rampa de 5 °C min⁻¹ até 250 °C permanecendo por 2 min. A temperatura do detector e injetor foi mantida em 250 °C, sendo que a pressão do gás de arraste (nitrogênio) foi de 80 kPa. O volume injetado foi de 1 µL da amostra diluída em n-heptano, sendo as análises realizadas em triplicata.

A conversão de geraniol em cinamato de geranila foi calculada utilizando a Equação 3.2:

$$\text{Convers\~{a}o (\%)} = \frac{A_n}{A_p} \cdot 100 \quad (3.2)$$

A_n = \u00e1rea do pico;

A_p = \u00e1rea do padr\u00e3o interno.

3.2.5 Caracteriza\u00e7\u00e3o do cinamato de geranila

O produto obtido foi caracterizado por resson\u00e2ncia magn\u00e9tica nuclear (RMN, Bruker AC-200F, operando a 200 MHz para hidrog\u00eanio). As an\u00e1lises foram realizadas utilizando 37 mg do cinamato de geranila purificado em solvente deuterado dimetilsulf\u00f3xido (DMSO-d₆), (CIL – Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA). Para calibra\u00e7\u00e3o dos espectros foi utilizado como refer\u00eancia interna o TMS (Tetrametilsilano) 0,01% v/v (δ 0,00) para os espectros de hidrog\u00eanio. Os deslocamentos foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento (J) foram calculadas em Hertz (Hz). O software utilizado foi o ACD-Spec Manager. Os espectros dos insumos foram obtidos do banco de dados Spectral Database for Organic Compounds SDBS.

3.2.6 Determina\u00e7\u00e3o de atividade antimicrobiana do cinamato de geranila por difus\u00e3o em \u00e1gar

A atividade antimicrobiana das amostras do \u00e9ster cinamato de geranila foi avaliada utilizando resultados de testes de difus\u00e3o com po\u00e7os no meio s\u00f3lido (\u00e1gar), empregando o m\u00e9todo do teste de susceptibilidade para agentes antimicrobianos descritos pelo padr\u00e3o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

Com o aux\u00edlio de um “swab” de algod\u00e3o esterilizado, a suspens\u00e3o de bact\u00e9rias de diferentes microrganismos (10^4 CFU.mL⁻¹) foram inoculadas na superf\u00edcie da \u00c1gar Padr\u00e3o para Contagem (PCA) (Kasvi). Ap\u00f3s, aproximadamente, 5 minutos, fez-se orif\u00edcios cil\u00edndricos de 5 mm de di\u00e2metro, os quais posteriormente foram preenchidos com cinamato de geranila. As placas foram incubadas em estufa bacteriol\u00f3gica (Quimis, modelo Q316M4, Brasil) mantida a uma temperatura de 35 ± 1 \u00b0C. Ap\u00f3s 18 horas, os di\u00e2metros das zonas de inibi\u00e7\u00e3o foram medidos utilizando uma r\u00e9gua milim\u00e9trica calibrada. Todos os testes de difus\u00e3o em \u00e1gar foram realizados em triplicata para cada microrganismo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O propósito deste trabalho foi comparar o método convencional com agitação mecânica com um método com ultrassom para obtenção do éster cinamato de geranila. Foi realizada a ampliação de escala para validação do método escolhido e finalizado com a aplicação do composto em atividade antimicrobiana.

4.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foi analisada a atividade enzimática da Novozym 435 no início dos trabalhos experimentais. A Tabela 4.1 apresenta os dados experimentais e valores obtidos para a realização do cálculo.

Tabela 4.1: Valores obtidos pelo método de titulação para o cálculo da atividade enzimática da Novozym 435.

REAGENTE	QUANTIDADE
Novozym 435	0,1955 g
Ácido láurico	3,0012 g
Álcool n-propílico	0,9109 g
V ₀₋₁	43,1000 mL
V ₀₋₂	50,0000 mL
V ₀₋₃	43,5000 mL
V ₄₀₋₁	14,3500 mL
V ₄₀₋₂	15,8000 mL
V ₄₀₋₃	14,3000 mL

Utilizando a metodologia descrita no item 3.2.1 e os valores apresentados na Tabela 4.1 a atividade calculada para a enzima Novozym 435 foi de $37,34 \pm 5,56$ U/g.

Chiaradia (2015) no seu estudo de imobilização da lipase B de *Candida antarctica* em nanopartículas super para-magnéticas de poli(ureia-uretano), PUU, obteve uma atividade para a enzima livre de 18,7 U/g utilizando a metodologia de Oliveira et al. (2006). Utilizando a mesma metodologia Zanatta e Dalla Rosa (2014) também determinaram a atividade enzimática da Novozym 435, armazenada em geladeira à 4°C e obtiveram um resultado de 47,9 U/g.

O fornecedor Novozymes utiliza uma metodologia interna e de matriz microbiológica única para determinação da atividade e informa em sua literatura, vide Anexo 1, um valor de 10000 PLU/g.

4.2 ENSAIOS PRELIMINARES DOS SISTEMAS REACIONAIS

Os estudos preliminares para obtenção do cinamato de geranila foram conduzidos em três diferentes sistemas reacionais: só o uso do banho de ultrassom, só o uso da agitação mecânica e a utilização da agitação mecânica combinada com o banho de ultrassom, a Figura 4.1 representa o dispositivo reacional montado para a realização dos testes. As reações foram realizadas durante 6 horas, numa temperatura de 60 °C e a conversão foi determinada utilizando a metodologia apresentada no item 3.2.2. Os resultados das reações são apresentados na Tabela 4.2.

Figura 4.1: Sistema para reações com agitação mecânica e banho de ultrassom.



Tabela 4.2: Resultados obtidos em diferentes sistemas reacionais para 6 horas de reação.

Sistema reacional	Agitação (rpm)	Conversão (%)	Desvio padrão
Banho de ultrassom com agitação mecânica	300	98,3	0,9
		99,2	
		100,0	
Banho de ultrassom	-	61,4	4,5
		58,5	
		52,5	
Agitação mecânica	300	99,4	0,8
		98,0	
		98,0	

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 4.2, conclui-se que os sistemas de agitação mecânica e banho de ultrassom combinado com agitação mecânica apresentaram resultados similares de conversão.

O sistema no qual foi utilizado apenas o banho de ultrassom resultou em menor conversão e por este motivo não foi utilizado nos experimentos posteriores. Uma justificativa para tal resultado está relacionada com a precipitação da enzima imobilizada, por não haver agitação turbulenta o suficiente para mantê-las em suspensão, prejudicando a interação entre enzima/substrato.

Shinde e Yadav (2014) também analisaram a influência de alguns parâmetros na produtividade da transesterificação enzimática e a velocidade de agitação se mostrou como sendo o de maior significância.

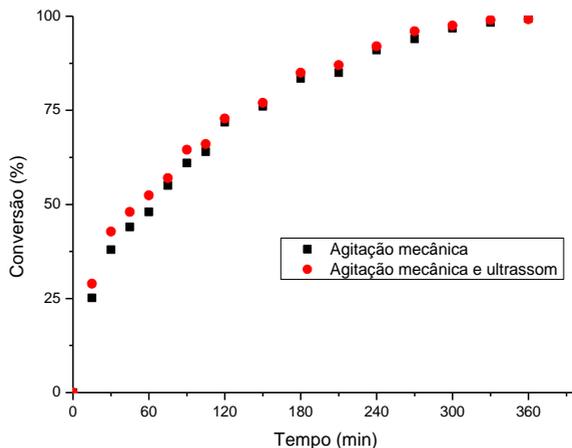
4.3 AGITAÇÃO MECÂNICA VERSUS AGITAÇÃO MECÂNICA COM ULTRASSOM

Os resultados obtidos na cinética de uma transesterificação enzimática realizada durante 6 horas num reator encamisado são apresentados no Anexo II, e analisados graficamente na Figura 4.2. Não se observa influência do ultrassom durante toda a reação. Tal resultado possivelmente foi obtido pelo fato da potência do banho de ultrassom ser geralmente baixa, a fim de se evitar danos cavitacionais na parede do tanque e também pelo elevado volume de líquido processado

(O'DONNELL et al., 2010). Considerando-se os custos adicionais envolvidos quando se opera com um reator irradiado com ultrassom e os periféricos necessários, conclui-se que não existem vantagens significativas no emprego de tal sistema. Ou seja, apenas a agitação mecânica convencional é suficiente para a obtenção de conversões elevadas de cinamato de geranila nas condições estudadas. Para possibilitar futuros estudos adicionais, foi ajustado um modelo matemático para descrever a cinética da reação.

Para a modelagem matemática do processo foi seguido o mesmo procedimento adotado por Magalhães (2010) que aplicou a equação de Michaelis-Menten, porém não obteve um bom ajuste. O autor desenvolveu um modelo cinético para a obtenção de biodiesel a partir da transesterificação de diversos óleos vegetais. O procedimento está descrito em Fogler (2005) e trata-se de um balanço de massa aplicado a um reator batelada no qual não ocorrem mudanças de fase nem alterações significativas nas propriedades físico-químicas das substâncias envolvidas. A Equação 4.1 é o balanço diferencial de massa para o consumo de geraniol, partindo-se da consideração que todo geraniol consumido é empregado na produção de cinamato de geranila. A Equação 4.2 é a forma integrada da Equação 4.1, que se encontra resolvida na forma da Equação 4.3. Substituindo [S] na Equação 4.4 e rearranjando na Equação 4.5.

Figura 4.2: Evolução da conversão de 1 mmol de geraniol e 0,5 mmol de cinamato de etila catalisado com $4,0 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ de Novozym 435 em cinamato de geraniol em função do tempo. A reação ocorreu durante 6 horas, 60°C e 300 rpm.



$$-\frac{d[S]}{dt} = (v) = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (4.1)$$

$$t = \int_S^{S_0} \frac{d[S]}{(-r)} = \int_S^{S_0} \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} d[S] \quad (4.2)$$

$$t = \frac{K_m}{V_m} \ln \left(\frac{[S]_0}{[S]} \right) + \frac{[S]_0 - [S]}{V_m} \quad (4.3)$$

Como a reação ocorre a volume constante, a concentração de substrato pode ser obtida como sendo $[S] = [S]_0 (1-X)$, onde $[S]$ é a concentração de substrato e X a conversão. Substituindo na Equação 4.3 obtém-se a Equação 4.4:

$$t = \frac{K_m}{V_m} \ln \left(\frac{1}{1-X} \right) + \frac{[S]_0 \cdot X}{V_m} \quad (4.4)$$

A qual pode ser reescrita na forma:

$$\frac{1}{t} \ln \left(\frac{1}{1-X} \right) = \frac{V_m}{K_m} - \frac{[S]_o}{K_m} \cdot \frac{X}{t} \quad (4.5)$$

Onde V_m é a velocidade máxima da reação e K_m a constante da cinética da reação. O parâmetro K_m também é dito como sendo a constante de Michaelis-Menten quando tal modelo é aplicado em situações que a concentração inicial de substrato é variada num conjunto de experimentos.

O modelo cinético apresentado foi aplicado por Magalhães (2010) e nos casos estudados pelo autor, os valores determinados para K_m e V_m não foram apropriados, pois resultaram em constantes negativas. Entretanto, no presente trabalho, tal modelo se mostrou apropriado, como pode ser visto a seguir.

A partir dos dados experimentais obtidos da conversão de cinamato de geranila em função do tempo, para os instantes iniciais de reação, foram determinadas as constantes da Equação 4.5 utilizando-se o método de estimação linear de parâmetros empregando-se o ajuste da linha de tendência do Microsoft Excel. Tais ajustes foram realizados tanto para o sistema com agitação mecânica, quanto para o com agitação mecânica mais ultrassom, e os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4.

Figura 4.3: Ajuste linear aos dados experimentais apresentados no Anexo II para sistema utilizando agitação mecânica.

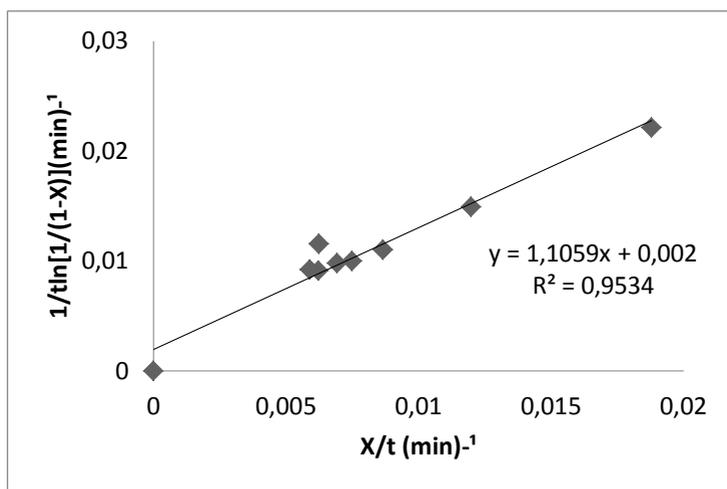
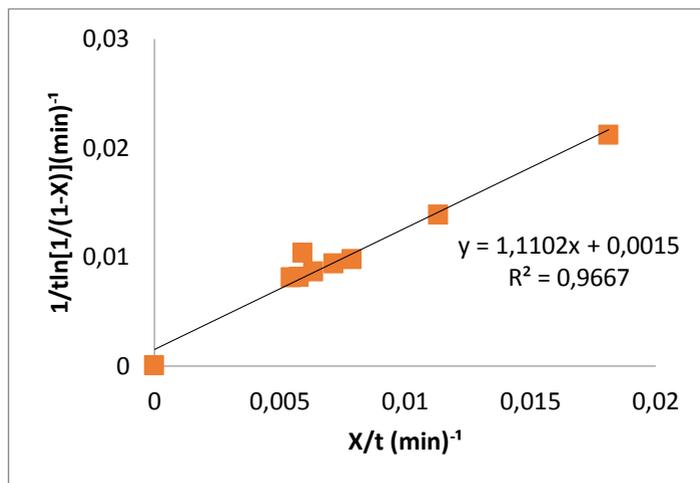


Figura 4.4: Ajuste linear aos dados experimentais apresentados no Anexo II para sistema utilizando agitação mecânica e ultrassom.



Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir dos ajustes lineares para os sistemas operando com apenas agitação mecânica e operando sob agitação mecânica e ultrassom foram de 0,967 e 0,953, respectivamente. Ou seja, ambos os resultados possuem valores da variância superiores a 95%, caracterizando um ajuste satisfatório.

A partir do ajuste da Equação 4.5 foram estimados os valores das constantes K_m e V_m , os quais são, respectivamente, 1,106 mmol.cm^{-3} e 0,002 $\text{mmol.cm}^{-3}\text{min}^{-1}$ para o sistema com agitação mecânica e ultrassom e 1.110 mmol.cm^{-3} e 0,0015 $\text{mmol.cm}^{-3}\text{min}^{-1}$ para o sistema utilizando apenas agitação mecânica.

Analisando os valores obtidos, é possível concluir que a eficiência do sistema reacional conduzido sob agitação mecânica e ultrassom comparado com o sistema conduzido apenas sob agitação mecânica não apresentam diferenças significativas. Segundo Remonatto et al. (2015), a agitação mecânica é muito importante para promover a miscibilidade entre substratos e prevenir a decantação da enzima no reator.

Inúmeros trabalhos disponíveis na literatura técnico-científica ressaltam que o emprego de ultrassom incrementa o contato entre a enzima e substrato, elevando a eficiência da reação (LERIN et al., 2014; BALEN et al., 2015; REMONATTO et al., 2015). No caso estudado no presente trabalho, o emprego de ultrassom não apresentou uma eficiência relevante. Tal fato pode ter ocorrido devido as limitações de transferência de massa que podem estar relacionadas ao tipo de suporte empregado para a imobilização das enzimas, o qual não foi caracterizado, pois todos os insumos foram utilizados como recebido. Outros autores também relataram que a irradiação por ultrassom não apresentou vantagens de processo como, por exemplo, o de Trentin et al. (2013).

Convém destacar, também, que a produção de cinamato de geranila é um tema relativamente novo e com pouca literatura disponível, o que possibilita que sejam realizados novos estudos sob diferentes condições experimentais daquelas aqui exploradas.

4.4 *SCALE-UP* DO SISTEMA REACIONAL COM AGITAÇÃO MECÂNICA

Com o intuito de analisar o aumento de escala, foi realizado um *scale-up* da reação de transesterificação com agitação mecânica, conforme ilustrado na Figura 4.3.

Inicialmente foi realizada a determinação do número de Reynolds dos sistemas reacionais considerando-se os reatores disponíveis, conforme Tabela 4.4.

Figura 4.5: Sistema com agitação mecânica para reação de ampliação de escala, com volume interno de 2500 mL.



Tabela 4.3: Características dos sistemas reacionais disponíveis.

CARACTERÍSTICA	SISTEMA REACIONAL 1	SISTEMA REACIONAL 2
Capacidade do reator	100 mL	2500 mL
Volume reacional	50 mL	2000 mL
Diâmetro do impelidor	3 cm	8 cm
Relação altura (L)/diâmetro (D) do reator	2,22	2,5
Diâmetro do reator	5,4 cm	32 cm

O quociente altura do volume reacional (L) pelo diâmetro (D) é um dos parâmetros a ser considerado numa ampliação de escala e deve ser mantido constante. No caso estudado, o segundo sistema reacional possui um quociente L/D aproximadamente 10% superior ao primeiro. Entretanto, tal fato não invalida o estudo já que não ocorrem variações

significativas de viscosidade e de massa específica ao longo da reação nem mudança de fase.

Em todos os cálculos realizados, considerou-se apenas o solvente por ser este o componente de maior volume e também a temperatura ambiente (25 °C). As propriedades físicas do n-heptano são: Massa específica, $\rho = 0,68 \text{ g.cm}^{-3}$; Viscosidade, $\mu = 3,86 \times 10^{-3} \text{ g.(cm.s)}^{-1}$.

O cálculo do número de Reynolds (Re) para tanques agitados é expresso pela Equação 4.6, onde N (rpm) representa a frequência de agitação:

$$Re = \frac{\rho ND^2}{\mu} \quad (4.6)$$

Substituindo-se os valores da Tabela 4.4 e as propriedades físicas no n-heptano na Equação 4.6, obtém-se:

Para o sistema reacional 1: $Re_1 = 4,76 \times 10^3$

Para o sistema reacional 2: $Re_2 = 2,82 \times 10^4$

A relação (Re_2/Re_1) é de 5,93, ou seja, mantendo-se as condições de agitação garante-se que o segundo sistema reacional, embora de maior volume, ainda opere em condições turbulentas.

A conversão obtida para esta reação, após 6 horas, numa temperatura de 60°C foi de 88,85% \pm 0,01, confirmando a eficácia do processo. Esta comprovação está baseada numa pesquisa de mercado, onde apenas dois fabricantes foram encontrados um nos Estados Unidos da América e outro na China. Em ambos os casos o máximo de pureza oferecido foi de 98% com um valor de USD 418,67/grama de produto.

4.5 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA DO PRODUTO POR ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A obtenção de cinamato de geranila através de uma transesterificação entre cinamato de etila e geraniol foi confirmada pela espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN), utilizando o produto purificado para a análise. Na Figura 4.6 é mostrado o espectro de RMN de ^1H do cinamato de geranila em DMSO- d_6 com alguns picos relevantes em δ/ppm : 7,35 – 7,60 (H, aromático); 7,61 – 7,75 vicinal ao anel vinílico com constante de acoplamento de $J = 16 \text{ Hz}$ e 6,59-6,67 correspondente ao hidrogênio vinílico em posição trans) com constante

de acoplamento de aproximadamente 16 Hz; 4,15 (correspondente a O-CH₂); 1,26 (aos grupos 2CH₃); 1,56 (correspondente a metila CH₃) e 1,70-2,03 (correspondente à duas metilas CH₂).

A Tabela 4.4 apresenta os deslocamentos obtidos na análise que foram utilizados para confirmar a estrutura do cinamato de geranila é mostrada na Figura 4.6. Na Figura 4.7 é possível observar o espectro de RMN do geraniol enquanto na Figura 4.8 encontra-se o espectro do cinamato de etila. Na Figura 4.9 é apresentado o espectro do DMSO. E, finalmente, na Figura 4.10 é mostrado o espectro de RMN do n-heptano.

Tabela 4.4: Resultados dos deslocamentos de ¹H.

H's correspondentes	Deslocamento (ppm)
A	7,704
B	7,53
C	7,45
D	7,37
E	6,471
F	5,97
G	1,705
K	4,715
J	2,05
O	2,08 – 2,13
L	5,086
M	1,678
N	1,600

Figura 4.6: Espectro de RMN de ¹H do cinamato de geranila em DMSO-d₆.

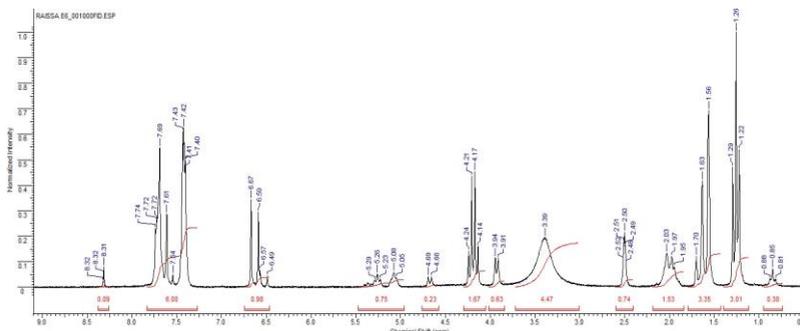
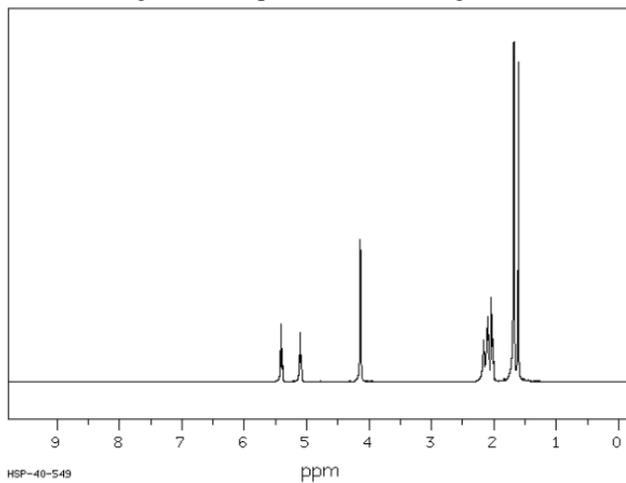
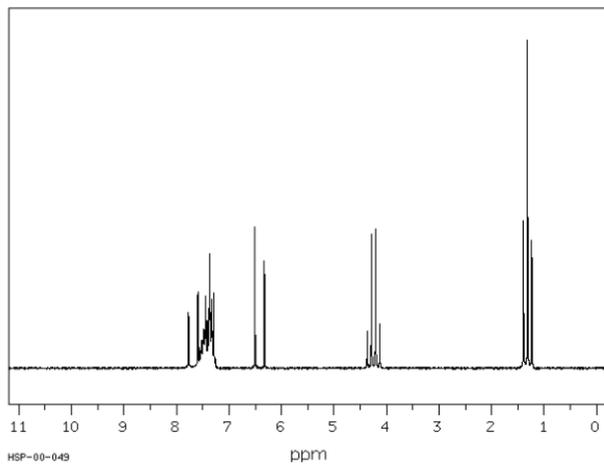


Figura 4.7: Espectro de RMN do geraniol.



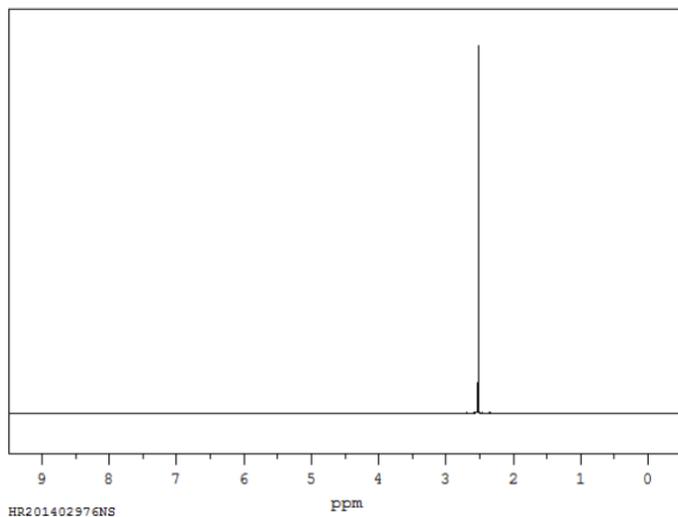
Fonte: SDBS.

Figura 4.8: Espectro de RMN do cinamato de etila.



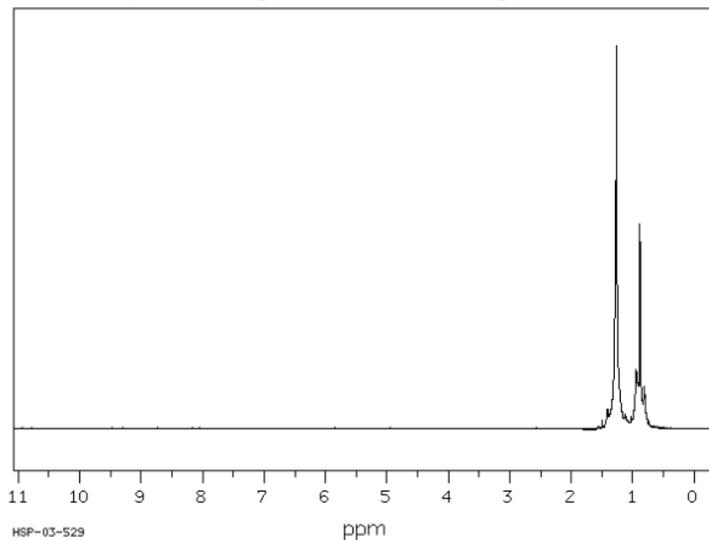
Fonte: SDBS.

Figura 4.9: Espectro de RMN do DMSO.



Fonte: SDBS.

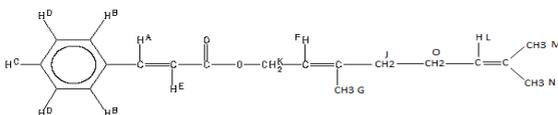
Figura 4.10: Espectro de RMN do n-heptano.



Fonte: SDBS.

Analisando-se os espectros acima, juntamente com os deslocamentos apresentados e as constantes de acoplamento, conclui-se que a estrutura obtida é a mesma encontrada por Zanetti et al. (2016), conforme a Figura 4.11.

Figura 4.11: Análise de hidrogênios alinhados com a estrutura do cinamato de geranila.



Também é possível concluir que o DMSO empregado contém traços de H₂O, mas que isso não prejudica a interpretação dos espectros.

Convém destacar que a rota de síntese empregada por Zanetti et al. (2016) contemplou a esterificação do ácido cinâmico para a obtenção do cinamato de geranila, chegando ao mesmo resultado que no presente trabalho onde foi empregado o etil cinamato. Ou seja, os autores utilizaram um sistema diferente e empregaram reagentes com custos superiores do que aqueles aqui empregados.

4.6 ANÁLISE ANTIMICROBIANA DO CINAMATO DE GERANILA

Neste item são apresentados os resultados obtidos dos testes de atividades antimicrobianas realizados com o éster cinamato de geranila, purificado, obtido de uma transesterificação catalisada pela lipase Novozym 435 e com o auxílio de apenas agitação mecânica. A atividade antimicrobiana foi realizada em triplicata com duas placas comparativas e as bactérias avaliadas foram: *Staphylococcus epidermidis*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

Baseado no método de Ponce et al. (2003) a sensibilidade do éster é classificada pelo diâmetro de inibição dos halos como: pouco sensível para diâmetros menores de 8 mm; sensível para diâmetros de 9-14 mm; muito sensível para diâmetros de 15-19 mm e extremamente sensível para diâmetros maiores que 20 mm. Este teste de sensibilidade é uma técnica de difusão em placas muito comum, pois sua execução é fácil e requer pequenas quantidades de amostra. Os resultados obtidos da sensibilidade das bactérias ao cinamato de geranila são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.5: Resultado da sensibilidade das bactérias avaliadas ao cinamato de geranila.

Bactéria	Halo de inibição (mm)	Sensibilidade	Figura
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$19,5 \pm 0,57$	Extremamente sensível	4.12
<i>Staphylococcus aureus</i>	$21,5 \pm 0,50$	Extremamente sensível	4.13
<i>Escherichia coli</i>	$15,3 \pm 0,57$	Muito sensível	4.14
<i>Bacillus cereus</i>	$12,3 \pm 0,57$	Sensível	4.15

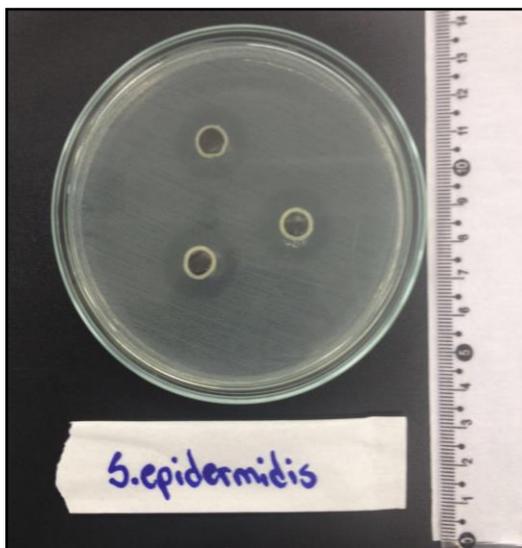
Figura 4.12: Análise da atividade antimicrobiana da bactéria *Staphylococcus epidermidis*.

Figura 4.13: Análise da atividade antimicrobiana da bactéria *Escherichia coli*.

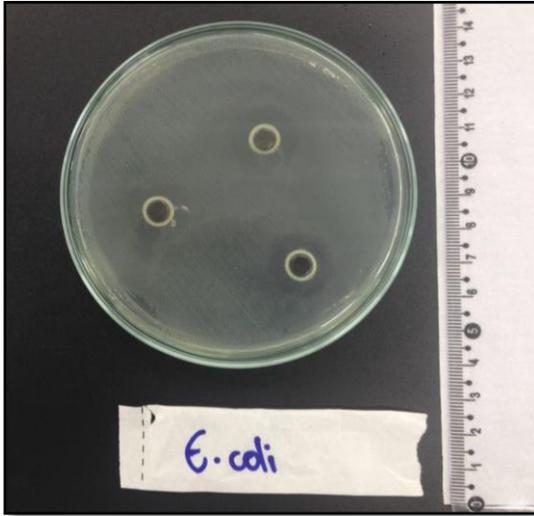


Figura 4.14: Análise da atividade antimicrobiana da bactéria *Staphylococcus aureus*.

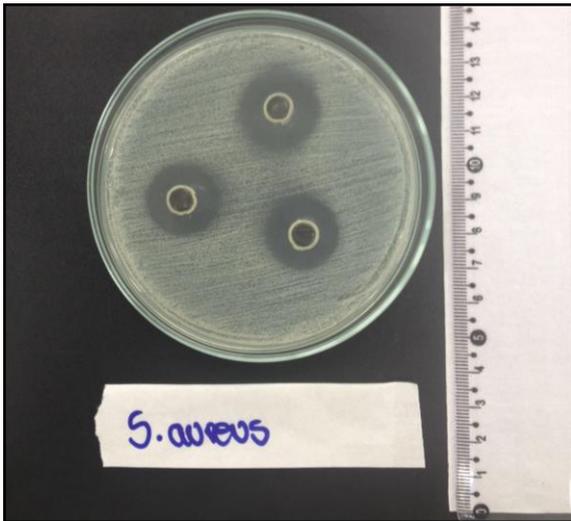


Figura 4.15: Análise da atividade antimicrobiana da bactéria *Bacillus cereus*.



Avaliando os resultados obtidos conclui-se que as bactérias do gênero *Staphylococcus* apresentaram maior sensibilidade à presença do cinamato de geranila comparado às outras bactérias.

Silva et al. (2015) analisaram a atividade do acetato de eugenila pelo mesmo método utilizado no presente trabalho. Os autores obtiveram um halo de inibição de 17,67 mm para *Staphylococcus epidermidis* e 15,67 mm para *Staphylococcus aureus*, ou seja, ambas apresentaram uma inibição inferior, na presença do referido composto, se comparado ao cinamato de geranila. Uma possível justificativa para este resultado pode estar relacionada com uma maior interação do cinamato de geranila com a membrana citoplasmática das bactérias, promovendo alterações estruturais.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família das *Micrococcaceae*, são cocos gram-positivos, anaeróbias facultativas e quimiorganotróficas com metabolismo fermentativo e respiratório. Este gênero é composto por 35 espécies sendo a de maior importância a *Staphylococcus aureus*, denominada como coagulase positiva e o segundo em importância o *Staphylococcus epidermidis*, também reconhecida como coagulase negativa (SCN) (HOLT et al., 1994).

Os *Staphylococcus* têm ganhado importância a partir da década de oitenta por serem reconhecidos como potenciais agentes causadores de doenças (KLOOS e BENNERMAN, 1994). Segundo Silva et al. (2010), a transmissão desta bactéria por portadores infectados aumenta o fator de risco para infecções hospitalares.

Uma possível aplicação para o cinamato de geranila está relacionada com o combate de infecções hospitalares, através de produtos de limpeza do ambiente e instrumentais. Segundo Silva et al. (2010), cerca de 50 a 87% das infecções hospitalares, tem o *Staphylococcus* como agente responsável, e desses casos 16 a 43% os pacientes evoluem para óbito em função do amplo espectro de resistências desses microrganismos aos antimicrobianos.

Outra bactéria testada foi a *Escherichia coli* que é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa pertencente à família Enterobacteracea. Ela é encontrada na microbiota intestinal de seres humanos e animais de sangue quente e podem causar infecções intestinais e infecções extra-intestinais (PASSOS et al., 2014). Com os resultados apresentados na Tabela 4.6, a *E. coli* é muito sensível ao cinamato de geranila, apresentando um bom efeito inibitório. Comparando os resultados obtidos com o estudo de Silva et al. (2015) os autores obtiveram um halo de inibição de 12,33 mm para *E. coli*, apresentando um efeito inferior de inibição comparado ao obtido com cinamato de geranila de 15,3 mm.

Zanetti et al. (2016) também estudaram o efeito antibacteriano do cinamato de geranila frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli* e compararam com os seus reagentes geraniol e ácido cinâmico onde obtiveram os halos de inibição para *S. aureus* de 35,3 mm, geraniol, 16,5 mm, ácido cinâmico, e 22,8 mm para cinamato de geranila. Para *E. coli* os valores foram de 25,5 mm, geraniol, 11,0 mm, ácido cinâmico, e 20,2 mm para cinamato de geranila. Os autores pontuaram o efeito sinérgico entre os reagentes no resultado obtido. Entretanto, a rota cinética empregada no presente trabalho bem como os procedimentos são diferentes daqueles utilizados por Zanetti et al. (2016), o que dificulta a comparação dos resultados.

A bactéria que apresentou menor sensibilidade ao cinamato de geranila, porém com resultado considerável, foi o *Bacillus cereus*. Esta é uma bactéria gram-positiva, esporulada, pertencente ao gênero *Bacillus* e uma das mais resistentes ao calor (VIDAL-MARTINS; ROSSI JUNIOR; REZENDE-LAGO, 2005). O *Bacillus cereus* é uma das mais importantes na indústria de alimentos, por sua capacidade de produzir toxinas e causar toxinfecção alimentar. É encontrada com frequência em

produtos lácteos e são responsáveis por grandes perdas econômicas, devido ao seu potencial de deterioração, e causar riscos para a saúde pública (VIDAL-MARTINS; ROSSI JUNIOR; REZENDE-LAGO, 2005).

O mecanismo de atuação do cinamato de geranila sobre as várias bactérias analisadas é difícil de ser determinado. Porém, segundo pesquisas realizadas por Piccoli et al. (2014), levam a atribuir que os compostos fenólicos interagem com vários componentes celulares e afetam diferentes processos metabólicos e fisiológicos, modificando a permeabilidade da membrana citoplasmática. Esta modificação provoca ruptura do fluxo de elétrons, perturbação do transporte ativo, inibição de atividade de enzimas e coagulação do conteúdo citoplasmático.

Diversos estudos indicam que os óleos essenciais que contêm compostos fenólicos como majoritários em sua composição, apresentam maiores atividades antimicrobianas, principalmente em bactérias gram-positivas (PICCOLI et al., 2014). Isto explica a maior inibição do cinamato de geranila para as bactérias do gênero *Staphylococcus*. Para o *Bacillus cereus*, que também é uma bactéria gram-positiva, o resultado foi um pouco inferior ao das *Staphylococcus*, podendo estar relacionado com as diferentes características entre elas. É importante destacar que por se tratar de testes com microrganismos, pode haver variações de resultados atribuídos a alguns fatores, entre eles o microrganismo e a cepa utilizada no teste.

Comparando os resultados obtidos com o cinamato de geranila ao estudo de Silva et al. (2015) que utilizou acetato de eugenila, pode-se afirmar que o cinamato de geranila apresenta maior atividade antimicrobiana as bactérias discutidas. Porém comparado aos seus reagentes o produto apresenta um desempenho intermediário.

Com base nos resultados apresentados neste item, pode-se concluir que o cinamato de geranila é efetivo no combate de diversas bactérias e por se tratar de um produto pouco conhecido faz-se necessário explorar mais aplicações.

5 CONCLUSÕES

A implementação comercial de reações enzimáticas em processos requer otimizações de condições de reação para reduzir custos de produção. Com tal objetivo, no presente trabalho foram analisados três diferentes sistemas de produção do cinamato de geranila por transesterificação enzimática em regime de batelada, estes sistemas são: banho de ultrassom, agitação mecânica e agitação mecânica combinada com banho de ultrassom.

Na primeira etapa foi determinado qual o sistema mais eficaz e tanto a agitação mecânica quanto o ultrassom resultaram em conversões elevadas.

Na segunda etapa foi avaliada a cinética desses dois sistemas para validar a real necessidade de utilizar o ultrassom e após seis horas de reação os dois sistemas apresentaram resultados similares, não justificando a utilização de mais um equipamento e dispêndio adicional de energia para obter este produto nas condições estudadas.

A fim de validar este processo para uma possível utilização industrial, foi realizada uma ampliação de 50 vezes maior que o sistema reacional empregado inicialmente em laboratório e o rendimento foi de aproximadamente 90%.

A importância do cinamato de geranila também foi explorada e sua eficácia como um agente antibacteriano foi comprovada nas principais bactérias patógenas tanto no meio hospitalar quanto em alimentos.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ao final do estudo para avaliação dos sistemas de obtenção do cinamato de geranila por reação enzimática, propõem-se como sugestões para trabalhos futuros:

- 1) Realizar experimentos, em diferentes condições, para se avaliar a cinética e ampliar a faixa de validação do modelo matemático do processo;
- 2) Explorar as aplicações do cinamato de geranila;
- 3) Estudar o mecanismo de atuação do cinamato de geranila na presença de bactérias;
- 4) Avaliar a toxicidade do cinamato de geranila para aplicações farmacêuticas e hospitalares.

7 REFERÊNCIAS

BABICZ, Ivelize et al. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S.I.], v. 17, n. 1, p.4-6, jan. 2010. Elsevier BV.

BALEN, Manuela et al. Novozym® 435-catalyzed production of ascorbyl oleate in organic solvent ultrasound-assisted system. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.I.], v. 4, n. 4, p.514-520, out. 2015. Elsevier BV.

BAREITHER, Rachel et al. Automated disposable small scale reactor for high throughput bioprocess development: A proof of concept study. **Biotechnology Bioengineering**, [S.I.], v. 110, n. 12, p.3126-3138, 1 jul. 2013. Wiley-Blackwell.

BHATIA, S. P. et al. Fragrance material review on ethyl cinnamate. **Food And Chemical Toxicology**, [S.I.], v. 45, n. 1, p.90-94, jan. 2007. Elsevier BV.

CHEN, W. e VILJOEN, A. M. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal Of Botany**, [S.I.], v. 76, n. 4, p.643-651, out. 2010. Elsevier BV.

CHIARADIA, Viviane. **SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE POLI (UREIA-URETANO) E APLICAÇÃO COMO SUPORTE NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE *Candida antarctica***. 2015. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

COGGON, Robert; VASUDEVAN, Palligarnai T.; SANCHEZ, Fernando. Enzymatic transesterification of olive oil and its precursors. **Biocatalysis And Biotransformation**, [S.I.], v. 25, n. 2-4, p.135-143, jan. 2007. Informa UK Limited.

COSENTINO, S. et al. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian thymus* essential oils. **Letters In Applied Microbiology**. [S.I.], p. 130-135.22 jun. 1999.

CRESPO, Janaina da Silva et al. The use of lipases immobilized on poly(ethylene oxide) for the preparation of alkyl esters. **Process Biochemistry**, [S.I.], v. 40, n. 1, p.401-409, jan. 2005. Elsevier BV.

CRUZ JÚNIOR, Américo. **IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B EM QUITOSANA PARA OBTENÇÃO DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA**. 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

DOSSAT, Valérie; COMBES, Didier; MARTY, Alain. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. **Enzyme And Microbial Technology**, Toulouse, p.194-200, fev. 1999.

FILLY, Aurore et al. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: From laboratory to pilot and industrial scale. **Food Chemistry**, [S.I.], v. 150, p.193-198, maio 2014. Elsevier BV.

FOGLER, H. Scott. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. 4. ed. Upper Saddle River: Pearson Education (US), 2005. 1120 p.

GUPTA, Munishwar N. e ROY, Ipsita. Enzymes in organic media. **European Journal Of Biochemistry**, [S.I.], v. 271, n. 13, p.2575-2583, 26 maio 2004. Wiley-Blackwell.

HALIM, Siti F. A. e KAMARUDDIN, Azlina H. Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. **Process Biochemistry**, [S.I.], v. 43, n. 12, p.1436-1439, dez. 2008. Elsevier BV.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

JACOTET-NAVARRO, M. et al. Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnosic and ursolic acids

from rosemary. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S.I.], v. 27, p.102-109, nov. 2015. Elsevier BV.

JUNKER, Beth Helene. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [S.I.], v. 97, n. 6, p.347-364, mar. 2004.

KLOOS, Wesley E. e BENNERMAN, Tamy L. Update on clinical significance of coagulase negative *Staphylococci*. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.I.], v. 7, n. 1, p.117-140, jan. 1994.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126–139, 2004.

KWIATKOWSKA, Barbara et al. Stimulation of bioprocesses by ultrasound. **Biotechnology Advances**, [S.I.], v. 29, n. 6, p.768-780, nov. 2011. Elsevier BV.

LAANE, Colja et al. Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. **Biotechnology Bioengineering**, [S.I.], v. 102, n. 1, p.1-8, 1 jan. 2009. Wiley-Blackwell.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. W. H. Freeman, 2008.

LERIN, Lindomar A. et al. A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. **Bioprocess Biosystem Engineering**, [S.I.], v. 37, n. 12, p.2381-2394, 7 jun. 2014. Springer Science + Business Media.

MAGALHÃES, Shayane Pereira. **Estudo de modelos cinéticos para a reação de transesterificação enzimática de óleos vegetais**. 2010. 134 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MARKS, David M. Equipment design considerations for large scale cell culture. **Cytotechnology**, [S.I.], v. 42, p.21-33, fev. 2003.

MARTINES, Marco Antonio Utrera; DAVOLOS, Marian Rosaly; JAFELICCI JÚNIOR, Miguel. O EFEITO DO ULTRA-SOM EM REAÇÕES QUÍMICAS. **Química Nova**, [S.I.], v. 23, n. 2, p.251-256, mar. 2000.

MONOT, F. **La catalyse enzymatique in milieu organique**. Revue de L' institute Français du Pétrole, v. 49, n.2, p.187-208, 1994.

MONSALVE-BRAVO, Gloria Milena et al. Model-based scale-up methodology for aerobic fed-batch bioprocesses: application to polyhydroxybutyrate (PHB) production. **Bioprocess Biosystem Engineering**, [S.I.], v. 38, n. 6, p.1179-1190, 30 jan. 2015. Springer Science + Business Media.

O'DONNELL, C. P. et al. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends In Food Science & Technology**, [S.I.], v. 21, n. 7, p.358-367, jul. 2010. Elsevier BV.

OLIVEIRA, D. et al. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, [S.I.], v. 38, n. 3, p.373-382, out. 2006. Elsevier BV.

OLIVEIRA, Marcos Antonio de. **Resolução enzimática de álcoois secundários**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 2, n. 18, p.301-307, abr. 2008.

PAQUES, Fernanda Wiermann; MACEDO, Gabriela Alves. LIPASES DE LÁTEX VEGETAIS: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES INDUSTRIAIS. **Química Nova**, Campinas, v. 29, n. 1, p.93-99, 10 ago. 2005.

PAROUL, Natália et al. Erratum to: Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification. **Bioprocess Biosystem Engineering**, [S.I.], v. 34, n. 3, p.331-337, 30 dez. 2010. Springer Science + Business Media.

PASSOS, T. M. et al. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO OZÔNIO NA ELIMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ESGOTO. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA – CBEB**, Uberlândia. Artigo. Uberlândia: Sbeb, 2014. p. 724 - 727.

PICCOLI, Roberta H. et al. Action of sanitizers on *Staphylococcus aureus* biofilm on stainless steel and polypropylene surfaces. **African Journal of Microbiology Research**, [S.I.], v. 8, n. 36, p.3347-3353, set. 2014. Academic Journals.

PONCE, A. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **Lwt - Food Science And Technology**, [S.I.], v. 36, n. 7, p.679-684, nov. 2003. Elsevier BV.

REMONATTO, Daniela et al. Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean and canola oils in a free organic solvent system assisted by ultrasound. **Applied Biochemistry Biotechnology**, [S.I.], v. 176, n. 3, p.850-862, 15 abr. 2015. Springer Science + Business Media.

RIBEIRO, Carlos Magno R.; PASSAROTO, Elisa N.; BRENELLI, Eugênia C. S. Ultrasound in enzymatic resolution of ethyl 3-hydroxy-3-phenylpropanoate. **Tetrahedron Letters**, Rio de Janeiro, v. 42, p.6477-6479, jul. 2001.

ROKHINA, Ekaterina V.; LENS, Piet; VIRKUTYTE, Jurate. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends In Biotechnology**, [S.I.], v. 27, n. 5, p.298-306, maio 2009. Elsevier BV.

SANTOS JÚNIOR, Alexandre Cristiano. **Atuação de óleos essenciais sobre biofilme de *Staphylococcus aureus* em superfície de aço inoxidável e polipropileno**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SPECTRAL DATA BASE FOR ORGANIC COMPOUNDS – SDBS. Disponível em: < <http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb>>.

SHARMA, Chander K.; CHAUHAN, Ghanshyam S.; KANWAR, Shamsher S. Synthesis of medically important ethyl cinnamate ester by porcine pancreatic lipase immobilized on poly(AAc-co-HPMA-cl-EGDMA) hydrogel. **Journal of Applied Polymer Science**, [S.I.], v. 121, n. 5, p.2674-2679, 29 mar. 2011. Wiley-Blackwell.

SHINDE, Somnath D. e YADAV, Ganapati D. Insight into microwave-assisted lipase catalyzed synthesis of geranyl cinnamate: Optimization and kinetic modeling. **Applied Biochemistry Biotechnology**, [S.I.], v. 175, n. 4, p.2035-2049, 29 nov. 2014. Springer Science + Business Media.

SILVA, V. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 4, p.452-455, maio 2010.

SILVA, Anny Caroline Soares da. **Estudo Cinético da Transesterificação de triacilgliceróis utilizando catalise enzimática**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SILVA, María José Arbulú. **Lipozyme TL IM como catalisador na síntese de acetato de eugenila via acetilação do óleo essencial de**

cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) em sistema livre de solvente. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

SILVA, María José A. et al. Lipozyme TL IM as catalyst for the synthesis of eugenyl acetate in solvent-free acetylation. **Applied Biochemistry Biotechnology**, [S.I.], v. 176, n. 3, p.782-795, 15 abr. 2015. Springer Science + Business Media.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, [S.I.], v. 15, n. 1, p.71-81, jan. 2002. UNIFESP (SciELO).

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (Estados Unidos da América). Zaiyou Liu; Toan Trinh; Kristin Finley. **Consumable composition comprising perfumed particles and article containing the same.** US nº US20030036489 A1, 02 maio 2002, 20 fev. 2003. 2003.

THEIL, Fritz. Lipase-supported synthesis of biologically active compounds. **American Chemical Society**, Berlin, v. 06, n. 95, p.2203-2227, 26 abr. 1995.

TIWARI, M. e KAKKAR, P.. Plant derived antioxidants – Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. **Toxicology In Vitro**, [S.I.], v. 23, n. 2, p.295-301, mar. 2009. Elsevier BV.

TORRES, Bayardo B. Elementos de enzimologia. In: BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos.** São Paulo: Edgard Blucher, 2001. Cap. 5. p. 151-176.

TREICHEL, Helen et al. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technol**, [S.I.], v. 3, n. 2, p.182-196, 25 mar. 2009. Springer Science + Business Media.

TRENTIN, Claudia M. et al. Continuous lipase-catalyzed esterification of soybean fatty acids under ultrasound irradiation. **Bioprocess Biosystem Engineering**, [S.I.], v. 37, n. 5, p.841-847, 28 set. 2013. Springer Science + Business Media.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JUNIOR, O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Jaboticabal, v. 57, n. 3, p.396-400, jun. 2005.

WANG, Yun et al. High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. **Food Chemistry**, [S.I.], v. 190, p.629-633, jan. 2016. Elsevier BV.

XIAO, Yongmei et al. Ultrasound-promoted enzymatic synthesis of troxerutin esters in nonaqueous solvents. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S.I.], v. 18, n. 1, p.303-309, jan. 2011. Elsevier BV.

XING, Zizhuo et al. Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors. **Biotechnology Bioengineering**, [S.I.], v. 103, n. 4, p.733-746, 1 jul. 2009. Wiley-Blackwell.

YADAV, Ganapati D. e LATHI, Piyush S. Intensification of enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate from 1,2-propanediol and lauric acid under microwave irradiation: Kinetics of forward and reverse reactions. **Enzyme And Microbial Technology**, [S.I.], v. 38, n. 6, p.814-820, abr. 2006. Elsevier BV.

YADAV, Ganapati D. e SHINDE, Somnath D. Synergism of Microwave Irradiation and Immobilized Lipase Catalysis in Synthesis of 4,8-dimethylnon-7-en-1yl (2E)-3- phenylpro-2-enolate. **International Review Of Chemical Engineering**, [S.I.], v. 4, n. 6, p.589-596, nov. 2012a.

YADAV, Ganapati D. e PAWAR, Sandip V. Insight into microwave irradiation and enzyme catalysis in enantioselective resolution of dl-(±)-

3-phenyllactic acid. **Applied Microbiology Biotechnology**, [S.I.], v. 96, n. 1, p.69-79, 5 jun. 2012b. Springer Science + Business Media.

YU, Dahai et al. Microwave-assisted fatty acid methyl ester production from soybean oil by Novozym 435. **Green Chemistry**, [S.I.], v. 12, n. 5, p.844-850, jan. 2010. Royal Society of Chemistry (RSC).

ZANATTA, Juliana da Silva e DALLA ROSA, Clarissa. PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL UTILIZANDO DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS COMO SUBSTRATOS EM SISTEMA DE ULTRASSOM. **Revista Eletrônica de Extensão da URI**, Erechim, v. 10, n. 18, p.205-217, maio 2014.

ZANNETI, Micheli et al. Microbiological characterization of pure geraniol and comparison with bactericidal activity of the cinnamic acid in gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Microbial Biochemical Technology**, [S.I.], v. 07, n. 04, p.186-193, 2015. OMICS Publishing Group.

ZANETTI, Micheli et al. Synthesis of geranyl cinnamate by lipase-catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S.I.], abr. 2016. Wiley-Blackwell.

ZHANG, Bingyu et al. Ethyl cinnamate derivatives as promising high-efficient acaricides against psoroptes cuniculi: Synthesis, bioactivity and structure–activity relationship. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, [S.I.], v. 63, n. 4, p.255-266, fev. 2015.

ANEXO I

Product Data Sheet



1 of 1

Valid from 2016-01-12

Novozym® 435

In this product the key enzyme activity is provided by
lipase that hydrolyzes ester bonds in glycerides

PRODUCT CHARACTERISTICS/PROPERTIES

Component name	Lipase
Activity	10000 PLU/g
Color	Off-white
Physical form	Immobilized Granulate
Approximate density (g/ml)	0.40

Color can vary from batch to batch. Color intensity is not an indication of enzyme activity.

PRODUCT SPECIFICATION

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Propyl laurate unit PLU	10000		/g
Loss on drying 105 C	-	3	%

The enzyme analytical method is available from the Customer Center or sales representative.

GM STATUS

This product is not a GMO.
Production organism: *Aspergillus niger*
The enzyme product is manufactured by fermentation of a microorganism that is not present in the final product. The production organism is improved by means of modern biotechnology.

STORAGE CONDITION

Recommended storage: 0-25 °C (32-77 °F)

Packaging must be kept intact, dry, and away from sunlight. Please follow the recommendations and use the product before the best before date to avoid the need for a higher dosage.

Best before: You will find the best before date in the certificate of analysis or on the product label.

The product gives optimal performance when stored as recommended and used prior to the best before date.

Novozymes guarantees delivery at least 6 months prior to the best-before date.

SAFETY AND HANDLING PRECAUTIONS

Enzymes are proteins. Inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes, and mucous membranes upon prolonged contact. See the MSDS or Safety Manual for further information regarding safe handling of the product and spills.

COMPLIANCE

Kosher certificate is available from the Customer Center or sales representative.

CERTIFICATIONS

Novozymes is a signatory to United Nations Global Compact, United Nations Convention on Biological Diversity and report on our sustainability performance through Global Reporting Initiative (GRI). See all our commitments under sustainability on www.novozymes.com.



PACKAGING

The product is available in different types of packaging. Please contact the sales representative for more information.

Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd
Denmark

Tel: +45 4446 0000
Fax: +45 4446 9999

For more information, or for more office addresses, visit www.novozymes.com

Laws, regulations and/or third party rights may prevent customers from importing, using, processing and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, this document does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.

© Novozymes A/S

ANEXO II

Tabela apresentando os experimentos realizados e conversão obtida ao longo das 6 horas (resultados obtidos em análises realizadas em triplicata).

Tempo (min)	Conversão (%)	
	Agitação mecânica + Ultrassom	Agitação mecânica
0	0,000	0,000
15	28,909	25,141
30	42,795	38,000
45	48,000	44,000
60	52,400	48,000
75	57,000	55,000
90	64,500	61,000
105	66,011	64,000
120	72,817	71,800
150	77,000	76,080
180	85,000	83,500
210	87,000	85,000
240	92,000	91,000
270	96,000	94,000
300	97,500	96,800
330	99,000	98,300
360	99,194	99,437