

# Processo enzimático para produção de acetato de isoamila livre de solvente orgânico

## RESUMO

**Nádia Ligianara Dewes Nyari**

[nadialigianara@hotmail.com](mailto:nadialigianara@hotmail.com)  
<http://orcid.org/0000-0003-0237-5116>

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Josiane B. da Silva**

[josisilva@hotmail.com](mailto:josisilva@hotmail.com)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Tainára Orlando**

[orlandi@hotmail.com](mailto:orlandi@hotmail.com)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Suelen P. Piazza**

[piazza12@hotmail.com](mailto:piazza12@hotmail.com)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Rogério L. Cansian**

[cansian@uricer.edu.br](mailto:cansian@uricer.edu.br)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Débora de Oliveira**

[deboraoliveira@hotmail.com](mailto:deboraoliveira@hotmail.com)

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

**Jamile Zeni**

[jamile.zeni@uricer.edu.br](mailto:jamile.zeni@uricer.edu.br)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Rogério M Dallago**

[dallago@uricer.edu.br](mailto:dallago@uricer.edu.br)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.

**Natália Paroul**

[nparoul@uricer.edu.br](mailto:nparoul@uricer.edu.br)

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil.

Nos últimos anos, a crescente demanda por produtos naturais na indústria de alimentos incentivou esforços notáveis no desenvolvimento de processos biotecnológicos para a produção de compostos aromatizantes. O presente estudo relata a maximização da produção de acetato de isoamila por esterificação de álcool isoamílico e ácido acético em um sistema isento de solventes usando duas lipases diferentes como catalisador. A lipase Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano – PU) foi comparada com a comercializada Novozym 435 e foi avaliada em termos de desempenho, rendimento e estabilidade operacional. Os efeitos nas taxas de reação mostraram valores maximizados diferentes, empregando esses dois catalisadores, no entanto as condições reacionais no que se refere a razão molar do substrato (ácido acético: álcool isoamílico), massa de catalisador e tempo de reação foram distintos. Embora Novozym 435 exibisse maior conversão inicial com relação a NZL-102-LYO-HQ, ambas formas lineares e apresentaram uma conversão superior a 90%. Para o catalisador Novozym 435 (razão molar 1:3 de ácido acético:álcool isoamílico e massa de catalisador 17% em peso) em 240 minutos e a Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano – PU) (razão molar 1:5 de ácido acético:álcool isoamílico e massa de catalisador 7% em peso) em 360 minutos de reação com 10 ciclos de reutilização. Sendo assim esses resultados são de grande valia para a produção industrial, sobretudo na síntese de ésteres de cadeia média, como acetato de isoamila em diferentes preparações enzimáticas, tornando uma fonte promissora comparado com estudo apresentados na literatura aberta.

**PALAVRAS-CHAVE:** esterificação; catalizador; enzima; reuso; aromas.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas com os avanços científicos e tecnológicos, os processos biotecnológicos tornaram-se primordiais, especialmente com o emprego da catálise enzimática na síntese de compostos em escala industrial através do processo de esterificação sem a utilização de solvente orgânico, levando ao estudo de novas fontes consideradas ambientalmente corretas (BORNSCHEUER *et al.*, 2013; SIONG *et al.*, 2014; NOVAK *et al.*, 2016).

Este cenário influencia diretamente a percepção dos consumidores, estando estes cada mais atentos quanto a procedência de seus produtos, especialmente quando assunto é sustentabilidade e saúde. Dentre os processos a biocatálise caracteriza por ser considerados “verdes”, gerando produtos classificados como sendo “semelhantes aos naturais” (SÁ *et al.*, 2017; JASPER, 2018; NYARI *et al.*, 2018a; SÁ *et al.*, 2018).

Contudo, dentre os processos catalíticos, o emprego de enzimas, especialmente as lipases em processos de esterificação, apresentam inúmeras vantagens o que as tornam muito interessantes, dentre elas podemos evidenciar o desempenho de sua função em condições amenas (a baixa pressão e temperatura) em meio aquoso (ORTIZ *et al.*, 2019), seletividade e especificidade (poupando etapas de proteção e desproteção) (SMITH, 1999; SCHMID *et al.*, 2001; WOODLEY, 2008; DHAKE, THAKARE & BHANAGE, 2013; REETZ, 2013; XIAO *et al.*, 2015; DE SOUZA *et al.*, 2017, entre outros) garantindo assim, a formação de produtos próximos aos apropriados.

Entretanto, o custo de produção ainda é um dos principais obstáculos para que a aplicação em escala industrial, no entanto, o processo de imobilização possibilita a diminuição do custo e possibilita a sua reutilização, tornando-os mais potentes e atraentes, além de melhorar a estabilidade térmica, a atividade em ambientes não aquosos, facilitar o manuseio e recuperação (NARWAL *et al.*, 2013; PALUDO *et al.*, 2014; KUPERKAR *et al.*, 2014; XIAO *et al.*, 2015; MORENO-PEREZ *et al.*, 2015; NURHAZWANI *et al.*, 2015; COROVIC *et al.*, 2017; FACIN *et al.*, 2019).

A lipase de *Candida antarctica* apresenta todas essas características e por ser um catalisador extremamente versátil para várias reações orgânicas, especialmente quando imobilizada em suporte de poliuretano (PU), o que possibilitou o seu emprego em várias aplicações específicas, de acordo com um estudo realizado por nosso grupo de trabalho de NYARI *et al.* (2016) (NYARI *et al.*, 2018a,b).

O que as torna ainda mais interessantes deve-se ao fato de possuir grande eficiência na síntese de ésteres aromáticos, sobretudo em reação de esterificação que consiste basicamente na condensação do ácido carboxílico livre (acil doador) e um álcool (acil receptor), resultando na formação de éster e água (JASPER, 2018).

Dentre os ésteres de ácidos graxos, os de baixo peso molecular representam uma importante classe dos ésteres aromáticos, que são aromas ou fragrâncias responsáveis por proporcionar odores de frutas e fragrâncias dos alimentos, bebidas, cosméticos e fármacos (MACEDO & PASTORE, 1997; DHAKE *et al.*, 2013; KHAN & RATHOD, 2015; BARÁNKOVÁ & DOHNAL, 2016; NOVAK *et al.*, 2016; DOS SANTOS *et al.*, 2017; KIRDI *et al.*, 2017; NYARI *et al.*, 2018a; PADILHA *et al.*, 2018). Segundo a International organization of the flavor Industry (IOFI, 2019), o mercado

é atraente e promissor, com uma produção em 2017 superior a 30 bilhões de dólares, conforme dados do Banco Nacional do Desenvolvimento (BNDES, 2017).

Dentre eles podemos evidenciar o éster de acetato de isoamila, aroma característico de banana, composto orgânico formado a partir de álcool isoamílico e ácido acético, líquido incolor que é apenas ligeiramente solúvel em água, mas muito solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a síntese de acetato de isoamila empregando dois catalizadores, a Lipase comercial Novozym 435 e a Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* imobilizada em poliuretano - PU), sendo avaliados os efeitos do tempo de reação, razão molar do ácido acético e álcool isoamílico e massa do catalisador em sistema livre de solvente orgânico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### MATERIAIS

A enzima lipase comercial utilizada neste estudo foi a Novozym 435 (*Candida antarctica* imobilizada em resina aniônica macroporosa) gentilmente doada pela Novozymes, Brasil (Araucária, PR, Brasil) e a Novozyme, NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano – PU) (Dinamarca). Peneiras moleculares de 4 Å (Sigma-Aldrich, EUA), e os solventes adquiridos como: ácido acético (pureza>99%, Vetec, Brasil), etanol (Merck, Brasil) e diclorometano (pureza>99%, Vetec, Brasil). Diisocianato de tolueno (TDI) e o poliéter-poliol foram gentilmente doados pela Manes Industria (Santa Catarina, Brasil).

### SÍNTESE DE ACETATO DE ISOAMILA

O estudo foi realizado de acordo com a metodologia empregada de Nyari et al. (2018a) para a síntese do éster de acetato de isoamila, em que as amostras foram fixadas em 5,0 g de substrato com uma razão molar do (ácido acético e álcool isoamílico nas proporções de 0,18:1 a 1:5,8), sendo estas livre de solvente orgânico, massa de catalisador de 3,0 a 17,0% (peso), massa de peneiras moleculares (2 g de substrato), temperatura de 30°C e acondicionados em frascos de Erlenmeyer a uma agitação mecânica de 160 rpm (agitador orbital Marconi, modelo MA420, potência de 600 W, Brasil). A reação foi submetida a um tempo de 240 minutos para o catalisador Novozym 435 e de 360 min para a Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano – PU) e transcorrido essa etapa o mesmo foi submetido ao um processo de filtração. Os produtos das reações foram mantidos sob refrigeração (8°C) para posterior análise por 48 horas. A otimização da síntese do acetato de isoamila foi realizada com base em ensaios experimentais realizados através de um Projeto Rotacional Composto Central (DCCR). O software Statistica 5.0 (Statsoft Inc.) foi utilizado para análise e otimização das conversões de reação (valor de  $p < 0,05$ ). Uma reação padrão foi conduzida nas mesmas condições, mas sem a presença de catalisador.

### ESTABILIDADE OPERACIONAL E REUTILIZAÇÃO DE CATALISADOR

O número de ciclos operacionais para a síntese de acetato de isoamila foi realizado de acordo com metodologia estuda de Nyari et al. (2018a), utilizando o

catalisador Novozym 435 e Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU). Foi avaliado para a amostra submetida às melhores condições experimentais (maior conversão de ácido acético) e obteve como resultado da análise da resposta do DCCR. A reutilização do catalisador e a estabilidade operacional durante a esterificação foram avaliadas sucessivamente até que a conversão do ácido acético fosse menor que 50% do seu valor inicial e as análises foram realizadas em triplicata.

### DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

As análises quantitativas do acetato de isoamila produzidas e o consumo de ácido acético e álcool isoamílico foram realizadas em cromatografia gasosa (Shimadzu, GC-2010, Japão) equipada com processador de dados e detector de ionização de chama (FID). Uma coluna capilar de sílica fundida (INOWAX, 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm).

Sendo empregada o seguinte programa de temperatura: 40 °C-180 °C (3 °C/min), 180 °C-230 °C (20 °C/min) e 230 °C (20 min), com temperaturas do injetor e do detector ajustadas em 250 °C e 275 °C, respectivamente. A injeção foi definida de modo de divisão com razão de 1:100, usando H<sub>2</sub> (56 kPa) como gás de arraste. A amostra foi diluída em n-hexano (1:10, v/v) e 0,4 mL foram injetados. A conversão da reação foi calculada com base na redução da área do reagente limitante com base na estequiometria da reação pelo estudo Nyari *et al.* (2018a). Conversão do ácido acético (C, %) foi calculado conforme a Equação 1.

$$C = [(\Sigma b - \Sigma a) / \Sigma b] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:  $\Sigma b$ : área do pico referente ao ácido no ensaio de controle (sem o catalisador 0 min);  $\Sigma a$ : área do pico referente ao ácido na amostra submetida à reação.

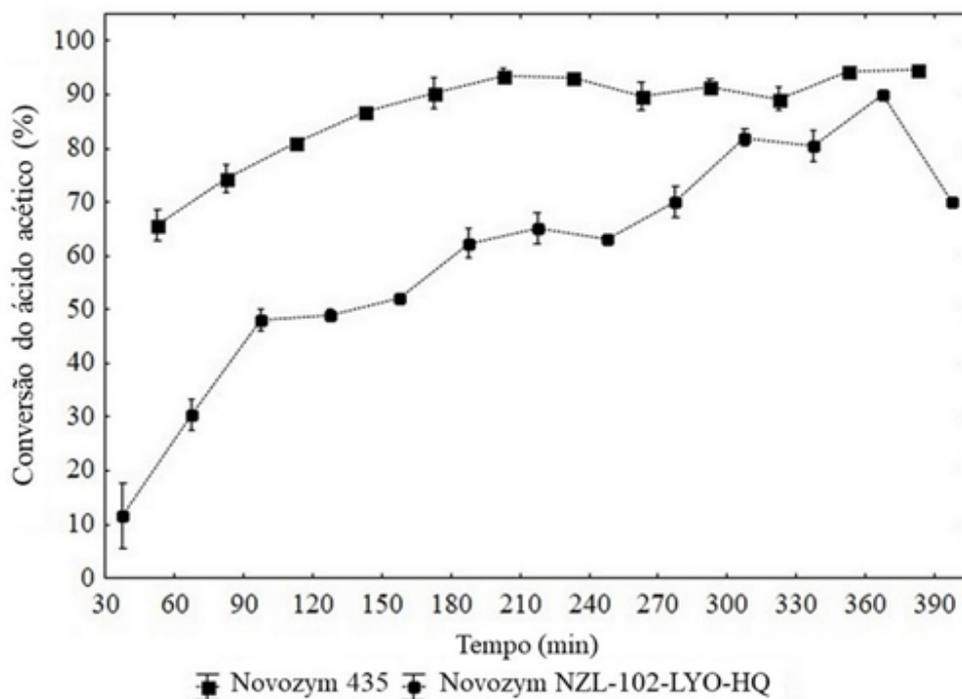
### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A conversão do acetato de isoamila durante o tempo transcorrido de reação empregando razão molar de ácido acético:álcool isoamílico e massa de catalisador usando a Novozym 435 e Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU) é apresentada na Figura 1.

As reações que ocorreram usando o catalisador Novozym 435 obteve uma conversão no ácido acético de 93% (razão molar 1:3 de ácido acético:álcool isoamílico e massa de catalisador 17% em peso) em 240 minutos (4 horas) de reação. A Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU) a conversão foi de 90% (razão molar 1:5 de ácido acético:álcool isoamílico e massa do catalisador 5% em peso) em 360 minutos (6 horas) de reação.

O comportamento exibido na Figura 1 está associado às velocidades de reação iniciais entre os dois catalisadores. Há uma conversão mais rápida no início da reação, onde a conversão posterior é mais lenta, mas crescente na maioria das

vezes. Além disso, ambos os ensaios mostram a mesma tendência, aumentando a conversão do precursor ácido (esterificação), além do éster, da água até uma determinada reação no tempo. Seguido pela redução (hidrólise), aumentando a concentração de água no sistema de reação, através do consumo de éster ligado diretamente às lipases (LI *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Cinética da conversão do ácido acético empregando o catalisador Novozym 435 (a) e Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano – PU) (b).

Entretanto, mudanças conformacionais positivas na estrutura da proteína podem ocorrer sem reduzir sua função. Portanto, essas mudanças intensificam as taxas de conversão (ZHAO *et al.*, 2016). Embora as taxas de conversão tenham sido mais rápidas, ambos os catalisadores permitiram aumentar a conversão do precursor ácido (esterificação) até um certo tempo e posteriormente, ocorreu uma redução nas taxas de conversão (hidrólise) (PALUDO *et al.*, 2015).

Portanto, com base nos achados apresentados na Figura 1, os tempos de reação foram definidos para as próximas etapas, ou seja, para a o catalisador Novozym 435 o tempo pré-estabelecido de reação de 240 minutos (4 horas) e para a Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU) de 360 minutos (6 horas) de reação.

### SÍNTESE DE ACETATO DE ISOAMILA

Foi realizado um CCRD completo para avaliar a influência da função da razão molar de substratos (ácido acético: álcool isoamílico) e da massa do catalisador (% em peso) empregando o catalisador Novozym 435 e a Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU).

Alguns parâmetros foram empregados como 5 g de substrato, 2 g em relação a massa de peneiras moleculares, temperatura de 30 °C, tempo de reação de 240 minutos (4 horas) para a Novozym 435 e de 360 min (6 horas) para a Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU) e agitação de 160 rpm em agitador orbital. As respostas dos ensaios estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Conversão do ácido acético em função da razão molar de substratos (ácido acético: álcool isoamílico, R) e da massa do catalisador (% em peso, M) em acetato de isoamila empregando o catalisador Novozym 435 e Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano – PU).

Ensaio	Razão molar (ácido acético:álcool isoamílico)	Massa de Catalisador (wt%)	Conversão de ácido acético (%, razão molar)	
			Novozym 435	Novozyme NZL-102-LYO-HQ
1	-1 (1:1)	-1 (5)	15,14 ± 1,9	58,99 ± 1,0
2	1 (1:5)	-1 (5)	78,77 ± 0,8	91,20 ± 0,7
3	-1 (1:1)	1(15)	67,27 ± 1,5	45,76 ± 1,8
4	1 (1:5)	1 (15)	93,11 ± 0,4	72,51 ± 1,4
5	-1,41 (0,18:1)	0 (10)	24,97 ± 0,7	20,01 ± 1,0
6	1,41 (1:5,8)	0 (10)	87,22 ± 1,6	82,56 ± 0,6
7	0 (1:3)	-1,41 (3)	18,33 ± 1,9	88,96 ± 1,0
8	0 (1:3)	1,41 (17)	93,39 ± 0,3	60,04 ± 1,8
9	0 (1:3)	0 (10)	72,64 ± 0,7	90,52 ± 1,5
10	0 (1:3)	0 (10)	72,90 ± 0,6	90,02 ± 1,5
11	0 (1:3)	0 (10)	78,70 ± 0,5	90,77 ± 1,3

A maior conversão do ácido acético foi de 93,3% empregando o catalisador Novozym 435 em 240 min de reação, sendo obtida no ensaio 8 (razão molar 1:3 de ácido acético:álcool isoamílico e 17% de massa do catalisador em peso), entretanto a conversão mais baixa do ácido acético foi de 15,1% no ensaio 1 (razão molar 1:1 de ácido acético:álcool isoamílico e 5% de massa de catalisador em peso), nos demais ensaios as conversões se mostraram superiores a 70% (ensaios 2, 4, 6, 8, 9, 10 e 11) a qual está especialmente relacionada ao aumento da massa do catalisador.

Para o catalisador Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU) em 360 min de reação a maximização da conversão do ácido acético foi de 91,2% obtida no ensaio 2 (razão molar 1:5 de ácido acético:álcool isoamílico e 5% de massa do catalisador em peso). Um ponto extremamente relevante que a conversão foi próxima a obtido usando a enzima Novozym 543 empregando 1/3 da quantidade de massa de enzima, sendo assim o rendimento foi superior.

A menor conversão de ácido acético foi de 20,0% obtida no ensaio 5 (razão molar 0,18:1 de ácido acético:álcool isoamílico e 10% de massa do catalisador em peso). As conversões foram superiores a 70% nos ensaios (2, 4, 6, 7, 9, 10 e 11), especialmente relacionados ao aumento da razão molar dos substratos e da massa de catalisador).

De acordo com Nyari *et al.* (2016), esse desempenho utilizando o catalisador Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU) envolve fatores como: qualquer enzima adicionada no processo de imobilização é aderida ao suporte, não há lixiviação causada pelo meio de reação e a interação do material de suporte com o centro ativo da enzima, levando a abertura da tampa hidrofóbica e a saída do local exposto, proporcionando aumento da atividade / conversão da reação de esterificação. Conforme apresentado no estudo apresentou uma conversão de 91% para a síntese de acetato de isoamila em relação ao catalisador da Novozym 435.

Além disso, a água desempenha um papel importante nas reações biocatalíticas, como proporciona um aumento na atividade enzimática sendo consequente no da água (aw) presente na reação, formando um sistema e hidrólise e beneficiando a mobilidade enzimática. Entretanto, esse aumento no teor de água também mantém o rendimento influenciado diretamente pelo emprego das peneiras moleculares (LOZANO *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013; PALUDO *et al.*, 2015)

A proporção de substratos é outro parâmetro crucial na reação de esterificação, visto que o sistema tende a seguir um caminho inverso, uma vez que a reação é reversível. Portanto, é aconselhável adicionar uma concentração um pouco mais alta de um dos substratos para alterar o equilíbrio no caminho durante cada etapa.

A razão molar ácido acético: álcool isoamílico contribuiu com as conversões de ácido acético, cuja redução (aumento da concentração molar de álcool isoamílico) favoreceu as conversões e a possibilidade de deterioração do biocatalisador. Dos vários experimentos realizados para a concentração de substrato (ácido para álcool), observou-se que, à medida que a concentração de álcool aumentava, aumentava – se também a taxa de conversão.

Segundo Martins *et al.* (2014) a razão molar dos substratos possui efeito positivo, dessa forma um dos parâmetros de conversão de ácido acético pode estar associado a dois fatores, o primeiro refere-se a alteração do equilíbrio químico e segundo à redução da acidez média. Azudin *et al.* (2013) descreve que esse impedimento favorece a solubilidade do produto e a transferência de massa no sistema de reação. Um modelo cinético enzimático baseado na equação de Michaelis-Menten modificada foi desenvolvido e ajustado à regressão não linear aos dados experimentais. Um efeito positivo da massa do catalisador aumenta o número de locais ativos presentes na reação, favorecendo a conversão.

De acordo com Colombo *et al.* (2015), é necessário um excesso no conteúdo do catalisador para manter a atividade enzimática durante o tempo de reação. A quantidade de massa de catalisador foi estudada na faixa de 3 a 17% em peso, possibilitando assim verificar o aumento da conversão de ácido acético, ocasionado pela disponibilidade de maior número de sítios ativos do catalisador.

Para a Novozym 435 esse efeito foi positivo, no entanto para Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU) teve efeito foi negativo, o que pode ser explicado devido a mistura se tornado ineficiente, limitando a transferência de massa, o contato efetivo e a difusão de substratos e o catalisador, causando uma diminuição na taxa de conversão (BANSODE *et al.*, 2017). A aglomeração de catalisador e a exposição ineficiente dos sítios ativos da

enzima excedente também são responsáveis por conversões mais baixas com maior massa de lipase (BALEN *et al.*, 2015).

No estudo realizado por Nyari *et al.* (2016) é explicado esse comportamento, no qual o catalisador Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU) quando submetido a um meio reacional pode provocar um aumento na estabilidade, sofrendo alterações que beneficiam sua integridade ou estrutura imobilizada. Quando o catalisador imobilizado, torna-se mais rígido é em decorrência das ligações provocadas pelo suporte, diminuindo assim a flexibilidade e mantendo forma do sítio ativo. O suporte de poliuretano possui grande estabilidade mecânica, o que contribuiu para apresentar uma enzima com maior estabilidade térmica ao meio de reação.

Embora muitos autores tenham usado lipases livres, o uso de lipases imobilizadas possui grande importância, especialmente em processos industriais, devido à sua maior termostabilidade e à sua fácil recuperação e reutilização, fato observado em nosso estudo. Outros autores comprovam o mesmo comportamento na síntese de acetato de isoamila, como Narwal *et al.* (2016) empregando a lipase termofílica imobilizada em sílica de *Bacillus aerius*; Padilha *et al.* (2018) utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em contas de alginato; Romero *et al.* (2005) usando três lipases imobilizadas comerciais diferentes EC 3.1.1.3 (Novozym 435 de *Candida antarctica*, Lipozyme RM-IM de *Rhizomucor miehei* e Lipozyme TL-IM de *Thermomyces lanuginosus*) em n-hexano, entre outras.

A síntese de ésteres aromáticos via catalise são considerados "semelhantes aos naturais" quando produzidos em sistema sem solvente orgânico, tornando-se assim ecologicamente correta. Economizando conseqüentemente energia e evitando a toxicidade indesejável da reação. Esses resultados enfatizam a relevância de nosso estudo, pois foram obtidas conversões mais altas no sistema livre de solventes orgânicos (AFSHAR *et al.*, 2015; KHAN E RATHOD, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2017).

Como a reação é realizada em um sistema livre de solvente, o excesso de ácido pode atuar como solvente polar para a mistura de reação. Mas quando o álcool excede a concentração ideal, a natureza polar pode retirar a água essencial necessária para a conformação ativa da lipase como biocatalisador (MADARÁSZ *et al.*, 2015).

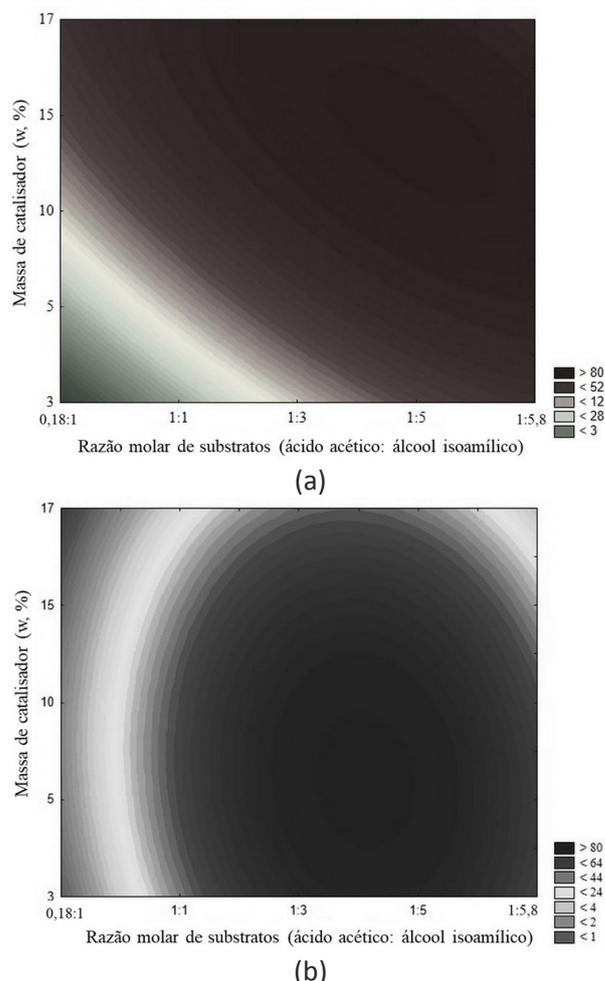
As Equações 2 e 3 indicam o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a conversão do ácido acético em função da razão molar de substratos (ácido acético: álcool isoamílico, R) e da massa do catalisador (% em peso, M) empregando o catalisador Novozym 435 e Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU).

$$\text{Conversão (\%)} = 74,71 + 22,22 \times R - 7,41 \times R^2 + 21,60 \times M - 7,54 \times M^2 - 9,44 \times R \times M \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{Conversão (\%)} = 90,41 + 18,82 \times R - 18,39 \times R^2 - 9,49 \times M - 6,71 \times M^2 - 2,11 \times R \times M \quad (\text{Equação 3})$$

Dentro dos parâmetros avaliados a faixa de valores empregando a Novozym 435 apresentou um coeficiente de correlação de 0,97 com  $F_{cal}(6,10) > F_{tab}(4,1)$ , permitindo assim a construção da curva de contorno apresentada na Figura 2a.

Para Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU) o coeficiente de correlação foi de 0,98 com  $F_{cal}(9,09) > F_{tab}(4,1)$  o que também possibilitou a construção da curva de contorno demonstrada na Figura 2b.



**Figura 2.** Curva de contorno da conversão do ácido acético em função da razão molar de substratos (ácido acético: álcool isoamílico, R) e da massa do catalisador (% em peso, M) em acetato de isoamila empregando o catalisador Novozym 435 (a) e Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano – PU) (b).

As maiores conversões excedendo 70% de ácido acético para a síntese de acetato de isoamila foram observadas empregando razão molar ácido acético: álcool isoamílico de 1:3-1:5,5 e massa catalítica de 10-16,5% em peso) para Novozym 435 em 240 min de reação. E utilizando razão molar ácido acético: álcool isoamílico de 1:3-1:5 e massa catalítica 4-10% de em peso) para Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizado em poliuretano - PU) em 360 min de reação.

Em relação à razão molar álcool:ácido a literatura enfatiza que o emprego de excesso de massa de catalisador e de álcool, podem proporcionar um aumento positivo no processo de conversão de ésteres (KHAN & RATHOD, 2015; YANG, *et al.*, 2015; NOVAK *et al.*, 2016; NYARI *et al.*, 2018a; PADILHA *et al.*, 2018).

Considerando a conversão de ésteres de ácidos acéticos alguns autores apresentaram valores semelhantes aos encontrados neste estudo empregando

outras lipases. Por exemplo, podemos evidenciar o trabalho de Graebin *et al.* (2012) usando a lipase B de *Candida antarctica* (MCI - CALB) imobilizada em contas de estireno – divinilbenzeno (MCI GEL CHP20P) em termos de desempenho comparação a Novozym 435 para esterificação de ácido acético, obtendo rendimento de cerca de 90% de conversão usando 10% de massa de catalizador em 120 minutos de reação

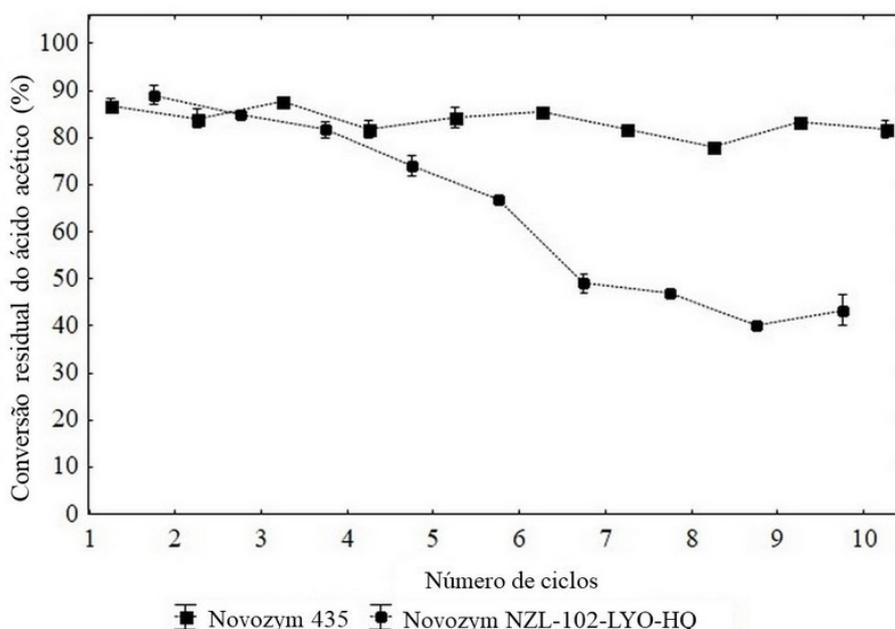
Kirdi *et al.* (2017) para a síntese de acetato de isoamila usando a lipase extracelular de *Aspergillus oryzae* imobilizada em alginato de cálcio, obteve conversão de 69% utilizando 2,39 g de massa de catalizador em 360 minutos de reação. No entanto o estudo de Kumari *et al.* (2009) utilizando a lipase *Rhizopus oryzae* na produção de 95% acetato de vinila com 16% de massa de catalizador em um sistema livre de solvente após 480 minutos de reação.

Na produção de acetato de isoamila com *Candida antarctica* lipase B o rendimento de conversão foi de 73% empregando 0,1 g de massa de catalizador após 300 minutos (WOLFSON *et al.*, 2010) e Padilha *et al.* (2018) utilizaram lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em contas de alginato após 24 horas oberam 38% de conversão.

Altas conversões de acetato de isoamila foram obtidas por esses autores, no entanto, o uso de solventes como agente doador de acil pode tornar o processo economicamente inviável e também produzir subprodutos de reação.

### ESTABILIDADE OPERACIONAL

A Figura 3 mostra a estabilidade operacional (número de ciclos de reutilização) para a síntese de acetato de isoamila empregando a Novozym 435 e Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano – PU).



**Figura 3.** Estabilidade operacional empregando a Novozym 435 (razão molar ácido acético:álcool isoamílico 1:3 e 17% de massa de catalisador) e a Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU ) (razão molar ácido acético:álcool isoamílico 1:5 e 5% de massa de catalisador massa do catalisador) para a síntese de acetato de isoamila.

A estabilidade operacional durante a esterificação foi expressa como um valor percentual (conversão residual) e é avaliada conforme a conversão do ácido acético, mostrando-se inferior a 50% no seu valor inicial. Para isso esta avaliação optou – se em avaliar as condições apresentadas no ensaio 8 (razão molar ácido acético: álcool isoamílico 1:3 e massa de catalisador de 17% em peso) usando Novozym. E para o catalisador Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU) as condições usadas foram apresentadas no ensaio 2 (razão molar ácido acético: álcool isoamílico 1:5 e massa de catalisador de 5% em peso).

Considerando o número de ciclos avaliados no estudo, dos 10 ciclos de reutilização ocorrido a utilizando a Novozym 435 manteve -se com conversão superior a 80%, entretanto a Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida antarctica* B imobilizada em poliuretano - PU) foi de 47% em relação a conversão inicial.

Em relação ao comportamento de conversão residual mostrado na Figura 3, a redução na conversão de ácido acético durante os ciclos de reutilização sequencial pode estar relacionada à perda de massa de catalisador que após a reutilização aguentou a lixiviação provocada pelo sistema, além do processo de desnaturação ocasionado pela reação (RATHOD, 2014a.b, NYARI *et al.*, 2016, BANSODE *et al.*, 2017; NYARI *et al.*, 2018; NYARI *et al.*, 2018b; SBARDELOTTO *et al.*, 2018).

Considerando o número de ciclos de reutilização alguns autores apresentaram valores inferiores aos encontrados neste estudo. Um exemplo podemos citar Ghamgui *et al.* (2006) estudaram os ciclos de reutilização de uma lipase de *Staphylococcus simulans* imobilizada em carbonato de sódio na produção de acetato de isoamila, onde após 10 ciclos foi observada uma redução de cerca de 50% na conversão e de 76% na atividade residual. Estudo realizado por Brígida *et al.* (2008) avaliaram o uso de resíduo de fibra de coco como suporte para imobilização de lipase de *Candida antarctica* tipo B (CALB) e Novozym 435 na síntese de butirato de butila, no qual após 3 e 10 ciclos de hidrólise, a atividade residual foi inferior a 50% e 70% respectivamente.

Abdulla e Ravindra (2013) usaram lipase de *Burkholderia cepacia*, reticulada com glutaraldeído, seguida por aprisionamento em uma matriz híbrida de polímeros naturais de alginato e k-carragenina na síntese de acetato de isoamila, na qual após 10 ciclos de uso a atividade residual foi 75,54% com relação a inicial. No estudo de Novak *et al.* (2016) síntese de acetato de isoamila em n-heptano usado para a *Candida antarctica* lipase B, conseguiram 5 ciclos de reutilização com 77% do rendimento em comparação a inicial e Nyari *et al* (2018 ) na síntese de acetato de isoamila em sistema isento de solvente usando a *Candida antarctica* Lipase B (CALB) como biocatalisador imobilizado em poliuretano foi estudada após 8 ciclos de reutilização com 70% de conversão em relação a inicial.

## CONCLUSÕES

Este estudo avaliou o efeito das variáveis de processo de síntese de acetato de isoamila empregando razão molar do substrato ácido acético: álcool isoamílico e massa catalítica em sistema sem solvente. A maximização da conversão para o catalisador Novozym 435 foi 93% submetida a um tempo de reação de 240 minutos e 10 ciclos de reutilização, entretanto a Novozyme NZL-102-LYO-HQ (*Candida*

*antarctica* B immobilizada em poliuretano - PU) o tempo reacional foi superior, com 360 minutos de reacionais e 90% de conversão e 10 ciclos reacionais.

Esses estudos sobre o efeito das variáveis operacionais no rendimento da conversão facilitam a otimização econômica, devido especialmente a um grande número de ciclos de reutilização. Sendo assim de grande valia para a produção industrial, sobretudo na síntese de ésteres de cadeia media, como acetato de isoamila em diferentes preparações enzimáticas, tornando uma fonte promissora comparado com estudo apresentados na literatura aberta.

## Enzymatic process for production of organic solvent free isoamyl acetate

### ABSTRACT

Over the past few years, the increasing demand for natural products in the food industry has encouraged remarkable efforts towards the development of biotechnological processes for the production of flavor compounds. The present study reports the maximization of isoamyl acetate production by esterification of isoamyl alcohol and acetic acid in a solvent-free system using two different lipases as catalyst. The lipase B from *Candida antarctica* (NZL-102-LYO-HQ) immobilized in situ on Polyurethane (PU) was compared with the commercial Novozym 435 (immobilized lipase) in terms of their performances as biocatalysts for the esterification of acetic acid and isoamyl alcohol in solvent-free system. The effects of experimental conditions on reaction rates differed for each biocatalyst, showing different optimal values for catalyst mass, substrate molar ratio (acetic acid and isoamyl alcohol in different proportions) and time reaction. Although Novozym 435 exhibited higher initial activity in compared time reaction than NZL-102-LYO-HQ to acid acetic conversion, the reaction course was much more linear using the new preparation, meaning that the NZL-102-LYO-HQ allows for higher productivities. Both preparations produced around 90% of conversions using the catalyst Novozym 435 (17 wt% catalyst mass and 1:3 molar ratio) in 240 minutes. However, the main advantage of the new biocatalyst (NZL-102-LYO-HQ) immobilized in situ on Polyurethane - PU) was the similar performance during the synthesis using 5 wt% catalyst mass and 1:5 molar ratio in 360 minutes of reaction whit 10 reuse cycles. NZL-102-LYO-HQ has shown to be a very promising biocatalyst for the esterification of small-molecule acids and alcohols in solvent free reactions.

**KEYWORDS:** esterification; enzymatic catalysis; reuse; flavors.

## REFERÊNCIAS

- ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Characterization of cross-linked lipase from *Burkholderia cepacia* in alginate and k-carrageenan hybrid matrix. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 4, p. 545-551, 2013.
- AFSHAR, S.; SADEHVAND, M.; AZAD, A.; DEKAMIN, M. G.; JALALI-HERAVI, M.; MOLLAHOSSEINI, A., ... & TADJARODI, A. Optimization of catalytic activity of sulfated titania for efficient synthesis of isoamyl acetate by response surface methodology. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, v. 146, n. 12, p. 1949-1957, 2015.
- ANSCHAU, A.; ARAGAO, V. C.; PORCIUNCULA, B. D. A.; KALIL, S. K.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 2148–2156, 2011.
- AZUDIN, N. Y.; MAD DON, M.; SHUKO, S. R. A. Production and kinetics of isoamyl acetate from acetic anhydride using *Candida antarctica* Lipase B in a solvent-free system. **Chemical Engineering**, v. 32, p. 1057-1062, 2013.
- BALEN, M., SILVEIRA, C., KRATZ, J. M., SIMÕES, C. M., VALÉRIO, A., NINOW, J. L., ... DE OLIVEIRA, D. Novozym® 435-catalyzed production of ascorbyl oleate in organic solvent ultrasound-assisted system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 514-520, 2015.
- BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted lipase catalysed synthesis of isoamyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1297-1303, 2014a.
- BANSODE, S. R. HARDIKAR, M. A., RATHOD, V. K. Evaluation of reaction parameters and kinetic modelling for Novozym 435 catalysed synthesis of isoamyl butyrate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1306-1314, 2017.
- BANSODE, S. R., RATHOD, V. K. Ultrasound assisted lipase catalysed synthesis of isoamyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1297-1303, 2014b.
- BARÁNKOVÁ, E. DOHNAL, V. Effect of additives on volatility of aroma compounds from dilute aqueous solutions. **Fluid Phase Equilibria**, v. 407, p. 217-223, 2016.
- BNDES – Banco Nacional do Desenvolvimento. 2014, Potencial de diversificação da indústria Brasileira. Relatório 4 – Aromas, sabores e fragrâncias. Disponível em <https://www.bndes.gov.br>. Acesso em: 10 de jun. 2019.

BORNSCHEUER, U. T., HUISMAN, G. W., KAZLAUSKAS, R. J., LUTZ S., MOORE, J. C. ROBINS K. Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**, v. 485, p. 186–195, 2013,

BRÍGIDA, A. I. S., PINHEIRO, A. D. T., FERREIRA, A. L. O. & GONÇALVES, L. R. B., Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by adsorption to green coconut fiber. **Appl Biochemistry Biotechnology**, v. 146, p. 173. 177, 2008.

COLOMBO, C., AUPIC, C., LEWIS, A. R. PINTO, B. M. In situ determination of fructose isomer concentrations in wine using <sup>13</sup>C quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 38, p. 8551-8559, 2015.

COROVIC, M., MIHAILOVIC, M., BANJANAC, K., CAREVIC, M., MILIVOJEVIC, A., MILOSAVIC, N. BEZBRADICA, D. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto Purolite (A (R)) MN102 and its application in solvent-free and organic media esterification. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 1, p. 23-34, 2017.

DE SOUZA, M. C. M., DOS SANTOS, K. P., FREIRE, R. M., BARRETO, A. C. H., FECHINE, P. B. A., GONÇALVES, L. R. B. Production of flavor esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic nanoparticles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 681-690, 2017.

DHAKE, K. P., DESHMUKH, K. M., WAGH, Y. S., SINGHAL, R. S. BHANAGE, B. M. Investigation of steapsin lipase for kinetic resolution of secondary alcohols and synthesis of valuable acetates in non-aqueous reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 15-23, 2012.

DHAKE, K. P., THAKARE, D. D., & BHANAGE, B. M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 2, p. 71-83, 2013.

DOS SANTOS, P., MEIRELES, M. A. A. MARTÍNEZ, J. Production of isoamyl acetate by enzymatic reactions in batch and packed bed reactors with supercritical CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 127, n. 71-80, 2017.

FACIN, B. R., MELCHORS, M. S., VALÉRIO, A., OLIVEIRA, J. V., OLIVEIRA, D. D. Driving immobilized lipases as biocatalysts: 10 years state of the art and future prospects. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 14, p. 5358-5378, 2019.

FOOD FLAVORS MARKET BY TYPE (Chocolate, Vanilla, Fruits & Nuts, Others), Origin (Natural, Synthetic), Application (Beverages, Savory & Snacks, Bakery & Confectionery, Dairy & Frozen Products, Others), & by Region - Global Forecast to 2020. Disponível em <http://www.marketsandmarkets.com>. Acesso julho 2017.

GHAMGUI, H., KARRA-CHAÂBOUNI, M., BEZZINE, S., MILED, N. & GARGOURI, Y. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 38, p. 78-93, 2006.

IOFI - International organization of the flavor Industry. **Code of practice - definitions**. Disponível em <https://www.iofi.org>. Acesso em novembro de 2019

JASPER, E. A. **Benzoato de Benzila via Esterificação Enzimática**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSM, Florianópolis, SC. Disponível em [repositorio.ufsc.br](http://repositorio.ufsc.br). Acesso em novembro de 2019.

KHAN, N. R. RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1793-1806, 2015.

KIRDI, R., AKACHA, N. B., MESSAOUDI, Y. GARGOURI, M. Enhanced synthesis of isoamyl acetate using liquid-gas biphasic system by the transesterification reaction of isoamyl alcohol obtained from fusel oil. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 4, p. 413-422, 2017.

KUMARI, A., P. MAHAPATRA, V. K. GARLAPATI, R. BANERJEE, S. DASGUPTA A. Lipase mediated isoamyl acetate synthesis in solvent-free system using vinyl acetate as acyl donor. **Food Technology Biotechnology**, v. 47, p. 13-18, 2009.

KUPERKAR, V. V., LADE, V. G., PRAKASH, A. RATHOD, V. K. Synthesis of isobutyl propionate using immobilized lipase in a solvent free system: Optimization and kinetic studies. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 143-1492, 2014.

LEFFINGWELL AND ASSOCIATES, Flavor & Fragrance Industry Leaders. Disponível em [http://www.leffingwell.com/top\\_10.htm](http://www.leffingwell.com/top_10.htm). Acesso março de 2018.

LI, L., JI, F., WANG, J., LI, Y. & BAO, Y. Esterification degree of fructose laurate exerted by *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 69, p. 46-53, 2015.

LOZANO, P. BERNAL, J. M. & NAVARRO, A. A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases, **Green Chemistry**, v. 14, p. 3026–3033, 2012.

MACEDO, G. A.; PASTORE G. A. **Food Science and Technology** (Campinas), 1997.

MAHAPATRA, P., KUMARI, A., KUMAR, A., GARLAPATI, V., BANERJEE, R. NAG, A., Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 57-63, 2009.

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

MORENO-PEREZ, S., LUNA, P., SEÑORANS, F. J., GUISAN, J. M. & FERNANDEZ-LORENTE, G. Enzymatic synthesis of triacylglycerols of docosahexaenoic acid: transesterification of its ethyl esters with glycerol. **Food Chemistry**, 2015.

NARWAL, S. K. & GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 4, p. 479-490, 2013.

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

NOVAK, U., LAVRIC, D. ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P. Continuous lipase B-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a two-liquid phase system using corning® AFR™ module coupled with a membrane separator enabling biocatalyst recycle. **Journal of Flow Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 33-38, 2016.

NURHAZWANI, Y. A. Modeling and optimization of solvent-free Isoamyl Acetate production via enzymatic esterification. School of Chemical Engineering, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia, 2014.

NURHAZWANI, Y. A., MASHITAH, M. D. SYAMSUL, R. A. S. Reaction Synthesis and Kinetic Modeling of Isoamyl Acetate via Enzymatic Esterification in Solvent-Free System. **Journal of Engineering Science and Technology**, v. 10, p. 78-87, 2015.

NYARI N. L. D., FERNANDES I. A., BUSTAMANTE-VARGA C. E., STEFFENS C. D., ZENI J. & DALLAGO R. M. In Situ Immobilization of *Candida antarctica* B Lipase In

Polyurethane Foam Support. **Journal Molecular Catalysis B Enzyme**, v. 124, n. 1, p. 52-60, 2016.

NYARI N. L. D., ZABOT G. L., ZAMADEI R., PALUZZI A. R., TRES M. V. ...& DALLAGO, R. M. Of Isoamyl Acetate From Acetic Anhydride Using *Candida antarctica* Lipase B In A Solvent-Free System. **Journal of Food Quality**, v. 3, n. 6, p. 441-445, 2018a.

NYARI, N. L. D., ALESSANDRO, P. R., ZAMADEI, R. V., ZENI, J., DALLAGO, R. M. Esterification of Oleic Acid and Ethyl Alcohol for Synthesis of Ethyl Oleate Catalyzed by Lipase Immobilized in Polyurethane. **Revista Inova Ciência & Tecnologia/Innovative Science & Technology Journal**, p. 31-39, 2018b.

ORTIZ, C., FERREIRA, M. L., BARBOSA, O., DOS SANTOS, J. C., RODRIGUES, R. C., BERENQUER-MURCIA, Á., ... FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Novozym 435: the "perfect" lipase immobilized biocatalyst?. **Catalysis Science & Technology**, 2019.

PADILHA, G. S., TAMBOURGI, E. B. & ALEGRE, R. M. Evaluation of lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in alginate beads and application in the synthesis of banana flavor (isoamyl acetate). **Chemical Engineering Communications**, v. 205, n. 1, p. 23-33, 2018.

PALUDO, N., ALVES, J. S. ALTMANN, C., AYUB, M. A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. & RODRIGUES, R. C. The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. *Ultrasonics Sonochemistry*. Wohlgemuth, R.; **Current opinion in Biotechnology**, n. 1, p. 713- 720, 2014.

PALUDO, N., ALVES, J. S., ALTMANN, C., AYUB, M. A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., & RODRIGUES, R. C. The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Ultrasonics Sonochemistry** v. 22, p. 89-94, 2015.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts, **Curr. Opin. Chem. Biology**, v. 6, p. 145–150, 2002.

ROMERO, M. D., CALVO, L., ALBA, C. & DANESHFAR, A. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal Biotechnology** v. 127, p. 269-277, 2007.

SÁ, A. G. A. MENESES, A. C., ARAÚJO, P. H. H. & OLIVEIRA D. Biocatalysis of aromatic benzyl-propionate ester by different immobilized lipases. **Bioprocess and biosystems engineering**, p. 1-7, 2018.

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

SÁNCHEZ-CASTAÑEDA, A. K., ATHÈS, V., MOUSSA, M., LÓPEZ-MIRANDA, J., PÁEZ-LERMA, J. B., SOTO-CRUZ, N. Ó. & TRELEA, I. C. Modeling of isoamyl acetate production by fermentation with *Pichia fermentans* in an aerated system coupled to in situ extraction. **Process Biochemistry** 2017.

SBARDELOTTO, C. R., PIAZZA, S. P., NYARI, N. L., DALLAGO, R. M., OLIVEIRA, D. D., OLIVEIRA, V. D., ... & PAROUL, N. Optimization of solvent-free geranyl butanoate production using Novozyme 435 and homemade polyurethane immobilized Novozyme NZL-102-Iyo-Hq as catalysts. **Química Nova**, v. 41, n. 8, p. 905-911, 2018.

SCHMID, A. J. S., DORDICK, B. M., HAUER, A. & KIENER, M. Wubbolts and B. Witholt, Industrial biocatalysis today and tomorrow, **Nature**, v. 409, p. 258–268, 2001.

SIONG, L. S., AZUDIN, N. Y. & SHUKOR, S. R. A. Process Modelling of Isoamyl Acetate Synthesis Catalysed by Lipase from *Candida antarctica* in a Solvent-free System. **Journal of Engineering Science** v. 10, p. 59-63, 2014.

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

WOLFSON, A., ATYYA, A., DLUGY, C. & TAVOR D. Glycerol triacetate as solvent and acyl donor in the production of isoamyl acetate with *Candida antarctica* lipase B. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, p. 363–366, 2010.

WOODLEY J. M., New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener, **Trends Biotechnol**, v. 26, p. 321–327, 2008.

WORLD FLAVORS & FRAGRANCES: Industry Study with Forecasts for 2016 & 2021. Disponível em <http://www.freedoniagroup.com>. Acesso julho 2017.

XIAO, Z., HOU, X., LYU, X., ZHAO, J. Y., XI, L., LI, J. & LU, J. R., Enzymatic synthesis of aroma acetoin fatty acid esters by immobilized *Candida antarctica* lipase B. **Biotechnology Letters**, p. 1-7, 2015.

YANG, H. MU, Y. CHEN H., XIU, Z. & YANG T., Enzymatic synthesis of feruloylated lysophospholipid in a selected organic solvent medium, **Food Chemistry** v. 141, p. 3317–3322, 2013.

YANG, Z., CUI, X., JIE, H., YU, X., ZHANG, Y., FENG, T., ... & SONG, K. Kinetic study and process simulation of transesterification of methyl acetate and isoamyl alcohol catalyzed by ionic liquid. **Industrial & Engineering Chemistry Research** v. 54, n. 4, p. 1204-1215, 2015.

ZHAO X., BANSODE S. R., RIBEIRO A., ABREU A. S. & OLIVEIRA C. Ultrasound Enhances Lipase-Catalyzed Synthesis of Poly (Ethylene Glutarate). **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 31, n. 1, p. 506-510, 2016.

**Recebido:** 08 nov. 2018.

**Aprovado:** 22 nov. 2019.

**DOI:** 10.3895/rebrapa.v10n1.9037

**Como citar:**

NYARI, N. L. D. et al. Processo enzimático para produção de acetato de isoamila livre de solvente orgânico. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 10, n. 1, p. 129-148, jan./mar. 2019. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa>

**Correspondência:**

Nadia Ligianara D. Nyari

Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Av. Sete de Setembro 1621, Erechim, Rio Grande do Sul, CEP 99700-000, Brasil.

**Direito autoral:** Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

