

Síntese de ésteres de isoamila por diferentes lipases microbianas comerciais

Belkis Chalup Silveira Roesler¹, Daniele Colembergue da Cunha Vanzin², Carlos André Veiga Burkert³

¹Mestre em Engenharia Química, Doutoranda em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, belkisroesler@gmail.com

²Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, Professora, Instituto Federal do Rio Grande do Sul, IFRS, danielevanzin@gmail.com

³Doutor em Engenharia de Alimentos, Professor, Universidade Federal do Rio Grande, FURG, burkert@vetorial.net

Resumo – Ésteres de aroma são formados pela reação de esterificação direta de um ácido carboxílico com um álcool na presença de catalisador, com a opção de ser realizada na presença (ou não) de solvente orgânico. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes enzimas comerciais e ácidos carboxílicos para a síntese de ésteres de isoamila em presença de solvente orgânico (*n*-hexano). Para tal, foram testadas duas diferentes enzimas comerciais (Lipozyme® 435 e Lipozyme® RM IM) e ácidos de diferentes tamanhos de cadeia (acético, butírico, propiônico e láurico). Utilizou-se 0,06 mol.L⁻¹ de ácido carboxílico, razão molar álcool:ácido de 1:1, concentração de enzima de 3 g.L⁻¹ e temperatura de 30 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata. Todas as sínteses apresentaram percentuais de esterificação superiores a 80%, para ambas as enzimas testadas, indicando o potencial de uso destas enzimas na síntese de ésteres de aroma de importância comercial.

Palavras-chave: Éster de aroma, síntese enzimática, esterificação.

Abstract – Flavours esters are formed by the direct esterification reaction of a carboxylic acid with an alcohol in the presence of a catalyst, with the option to be performed in the presence (or not) of organic solvent. The aim of this study was to evaluate different commercial enzymes and carboxylic acids for the synthesis of isoamyl esters in the presence of organic solvent (*n*-hexane). Two different commercial enzymes (Lipozyme® 435 and Lipozyme® RM IM) and acids of different chain length (acetic, butyric, propionic and lauric acids) were tested. It was used 0.06 mol.L⁻¹ carboxylic acid, alcohol:acid molar ratio of 1:1, enzyme concentration of 3 g.L⁻¹ and 30 °C. Assays were performed in triplicate. All synthesis had percentage of esterification higher than 80 % for both enzymes tested, indicating the potential use of these enzymes in the synthesis of flavours esters of commercial importance.

Keywords: Flavours esters, enzymatic synthesis, esterification.

I. INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos de diversos processos, atuando em organizadas sequências, catalisando etapas de degradação das moléculas, reações

que conservam e transformam energia química e também as que constroem macromoléculas biológicas [1].

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem uma classe de enzimas hidrolíticas que compreendem um importante grupo de biocatalisadores aplicados em diversos processos biotecnológicos, dentre eles a síntese de ésteres. São capazes de catalisar a hidrólise de cadeias longas de triacilgliceróis a diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol na interface óleo-água. São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e de micro-organismos, sendo que as últimas merecem destaque devido a maior estabilidade e especificidade quando comparadas às demais fontes [2,3].

De maneira geral, as lipases não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH, são estáveis a altas temperaturas e possuem elevada especificidade e enantioselectividade. Elevam a velocidade de reação e são compatíveis com diversos substratos sintéticos [3,4].

A lipase Lipozyme® RM IM é uma enzima comercial imobilizada em resina de troca aniônica e produzida por cultivo submerso do fungo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado, onde o micro-organismo doador do gene que produz a lipase é *Rhizomucor miehei*. A síntese do éster butirato de etila foi avaliada com esta enzima por Aragão e colaboradores [5], utilizando um planejamento experimental para estabelecer a ótima condição de esterificação, em termos de temperatura, razão molar e concentração dos substratos. Uma percentagem de esterificação de 88 % foi obtida em 3 h de reação para um sistema a 45 °C, concentração da enzima Lipozyme RM IM de 7,7 g.L⁻¹, concentração de ácido butírico de 0,09 mol.L⁻¹ e razão molar ácido butírico:etanol de 1: 1.

Lipozyme® 435 trata-se de uma lipase de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica, recombinante, expressa em *Aspergillus niger*. A mesma foi utilizada no estudo de Lopresto et al. [6] sobre a reação enzimática entre ácido octanoico e hexanol, onde o produto gerado foi utilizado como aditivo de sabor em alimentos, caracterizando um sabor frutado. A conversão na síntese foi de 90%, alcançada em apenas 1 h. As concentrações de substrato foram de 0,2 mol.L⁻¹ e a quantidade de biocatalisador foi de 5 g.L⁻¹. Também esta lipase foi utilizada no estudo conduzido por Varma e Madras [7]

sobre o efeito do comprimento da cadeia alcoólica na esterificação com ácido propiônico em dióxido de carbono supercrítico.

As demais reações catalisadas pelas lipases (interesterificação, alcoólise, acidólise, dentre outras) não possuem tanto destaque quanto a esterificação e a transesterificação, sendo importantes industrialmente, em função das inúmeras aplicações. A partir da esterificação é possível obter aromas, enquanto que na transesterificação o crescente interesse está focado na produção de biodiesel [8].

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



O acúmulo de água na reação pode vir a deslocar o equilíbrio da reação para a hidrólise, isto é, provocar a reação inversa à esterificação, mas esta pode ser removida por processos como adsorção, destilação, uso de agentes secantes ou membranas seletivas à água. Entretanto, também se faz necessária uma pequena quantidade de água no processo para garantir a estabilidade e a hidratação da enzima. Por outro lado, a reação de esterificação é facilitada em presença de solventes orgânicos, tendo como vantagens a dissolução dos compostos hidrofóbicos e o deslocamento do equilíbrio termodinâmico para a síntese [9].

A síntese biotecnológica oferece um alto rendimento em comparação com a síntese química e acelera as reações em até 10^8 - 10^{15} vezes. Requer condições moderadas para reação, como meios de temperaturas entre 40 °C e 60 °C e pH entre 5 e 8. O produto, assim gerado, é classificado como “éster de aroma natural” [4,10]

Aromas são definidos como qualquer material perceptível principalmente pelos sentidos do paladar e do olfato [11]. Aromas em alimentos, fragrâncias em cosméticos e fármacos determinam suas propriedades sensoriais e com isso a sua aceitação por parte dos consumidores. Garantem a identidade de determinado produto e podem ser considerados como ingredientes críticos pelo simples motivo de que, sem a adição destes, os produtos não teriam aceitação. Novos métodos para produção de aromas naturais por rotas biotecnológicas foram desenvolvidos nos últimos anos, visto que são de grande importância para as indústrias de alimentos, cosmética, farmacêutica e química [12,13].

O mercado mundial que abrange aromas, sabores e fragrâncias espera uma aceleração no consumo motivada por tendências do mercado consumidor, em um segmento dito atraente e promissor, estimando-se um valor de mercado superior a 30 bilhões de dólares no ano de 2017. Este mercado é dominado principalmente

pelas indústrias de cosméticos e higiene pessoal, produtos de limpeza, alimentos e bebidas [14].

Altos custos de processo são envolvidos na obtenção de aromas naturais, onde sua extração depende de diversos fatores, como a concentração dos componentes ativos desejados e a existência deles ligados entre si, tornando difícil o isolamento, bem como também condições climáticas e a saúde da planta. Estes fatores tornam este procedimento de alto custo e insuficiente para a demanda do mercado atual. Frente a isso, a tendência é a produção de aromas utilizando-se de ferramentas biotecnológicas, com a vantagem da produção sob condições brandas e com um menor impacto ambiental [10,15].

O álcool isoamílico trata-se de um álcool precursor de ésteres de aroma, entre eles butirato de isoamila (aroma de pêra), acetato de isoamila (aroma de banana), propionato de isoamila (aroma de damasco, abacaxi, amêndoas) e laurato de isoamila (aroma de cervejas e vinhos) [5,16,17,18]. Tem aplicação em diversas indústrias como solvente na extração de compostos farmacológicos bem como para produção de ésteres para lubrificantes. Pode ser obtido de um resíduo denominado óleo fúsel. Óleo fúsel trata-se de um resíduo das destilarias de etanol, constituído por uma mistura de álcoois superiores, classificados como congêneres da fermentação alcoólica, retirados da coluna de retificação onde tende a se acumular. Também por estes álcoois serem obtidos da fermentação da cana-de-açúcar, podem ser considerados como naturais, garantindo alto valor agregado ao produto [19,20].

O objetivo deste trabalho foi avaliar a síntese de acetato, butirato, propionato e laurato de isoamila na presença de solvente orgânico (n-hexano) por diferentes enzimas comerciais (Lipozyme® 435 e Lipozyme® RM IM), verificando a potencialidade de uso das enzimas para a obtenção dos referidos ésteres de aroma.

II. MATERIAL E MÉTODOS

A. Sistema de síntese de ésteres de isoamila

Para este experimento foi utilizado o solvente n-hexano ($\log P = 3,5$) citado pela literatura na síntese de diversos ésteres [21,22,23].

Foram utilizados ácidos carboxílicos de diferentes tamanhos de cadeia. Os ácidos estudados foram: ácido acético, butírico, propiônico e láurico, a fim de obter acetato, butirato, propionato e laurato de isoamila, respectivamente. Todos os reagentes usados foram de grau analítico. Duas enzimas comerciais foram avaliadas: Lipozyme® 435 e Lipozyme® RM IM, fabricadas pela Novozymes, sendo gentilmente fornecidas pela LNF Latino Americana (Bento Gonçalves - RS - Brasil).

Foram utilizados frascos de vidro selados, com 40 mL de volume útil, contendo ácido carboxílico na concentração de $0,06 \text{ mol.L}^{-1}$, razão molar álcool:ácido de 1:1 e quantidade de enzima de 3 g.L^{-1} . A temperatura

de reação foi de 30 °C, controlada em banho agitado a 180 rpm, por um período que variou de 6 a 48 h, dependendo do éster a ser sintetizado. O acompanhamento da reação foi realizado com a coleta de alíquotas de 1 mL com pipeta volumétrica em intervalos de tempo pré-definidos para determinação do teor de ácido carboxílico [24].

B. Determinação do teor de ácido carboxílico residual e percentual de esterificação

O teor de ácido carboxílico foi determinado através da titulação de 1 mL de alíquota, previamente pesada, coletada em diferentes tempos de síntese, sendo diluída em 10 mL de etanol e fenolftaleína 0,1 % e titulada com KOH 0,02 N previamente padronizado [24]. A determinação do percentual de ácido carboxílico foi realizada a partir da Equação 1 [25].

$$C = \frac{V \cdot N \cdot M}{10 \cdot W} \quad (1)$$

onde C é o percentual de ácido carboxílico, V é o volume (mL) de KOH gasto na titulação, N é a normalidade do KOH, M é a massa molar do ácido carboxílico e W a massa (g) correspondente a 1 mL de amostra retirada para titulação, sendo pesada em balança analítica de 4 casas decimais (Marte científica, Modelo ATY224, Brasil).

O percentual de esterificação corresponde ao percentual do ácido consumido, conforme Equação 2 [26].

$$\% \text{ esterificação} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde C_0 é a concentração inicial do ácido carboxílico residual livre, no tempo 0 h; e C é a concentração do ácido carboxílico residual livre em um determinado tempo de reação.

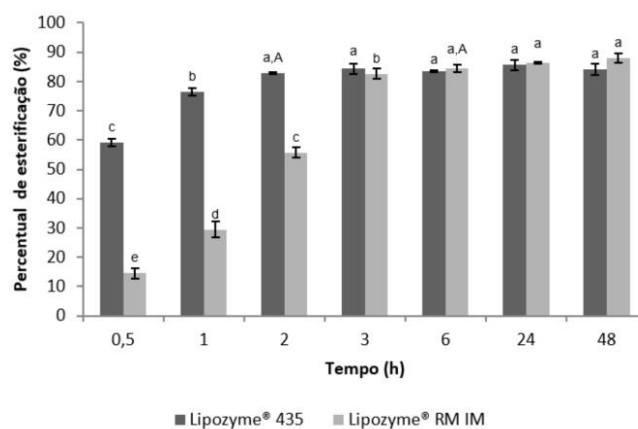
C. Tratamento estatístico dos dados

Os experimentos foram realizados em triplicata. Para comparar as diferentes enzimas quanto aos percentuais de esterificação máximos foi utilizado o Teste t, a 95 % de confiança. Para comparar os percentuais de esterificação obtidos com uma mesma enzima ao longo do tempo de reação foi utilizado o Teste de Tukey, a 95 % de confiança. Tais tratamentos foram realizados com o uso do “software” Statistica 5.0 (StatSoft Inc., EUA), verificando a existência de diferenças significativas entre os resultados a 95 % de confiança ($p < 0,05$).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos para o percentual de esterificação médio do butirato de isoamila em função do tempo para as enzimas Lipozyme® 435 e Lipozyme® RM IM.

Figura 1 – Percentual de esterificação (média ± desvio padrão) para o butirato de isoamila em função do tempo.



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

Fonte: Os autores.

Observa-se que o percentual de esterificação apresentou aumento no decorrer do tempo de reação. Assim, para a enzima Lipozyme® 435 não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para os tempos superiores a 2 h de reação, e para enzima Lipozyme® RM IM verificou-se que a partir das 6 h não houve mais variação do percentual de esterificação. Analisando os valores dos percentuais máximos de esterificação para as enzimas Lipozyme® 435 (82,9 % ± 0,4 em 2 h) e Lipozyme® RM IM (84,4 % ± 1,4 em 6 h), seus valores não se diferiram a 95 % de confiança ($p > 0,05$).

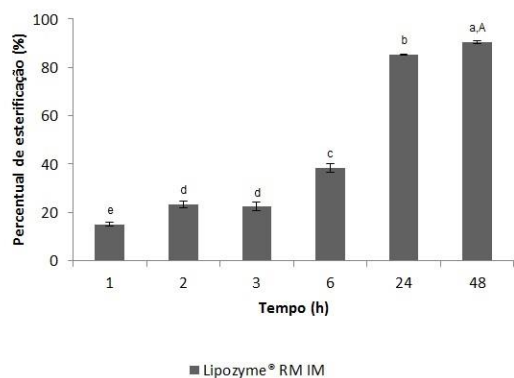
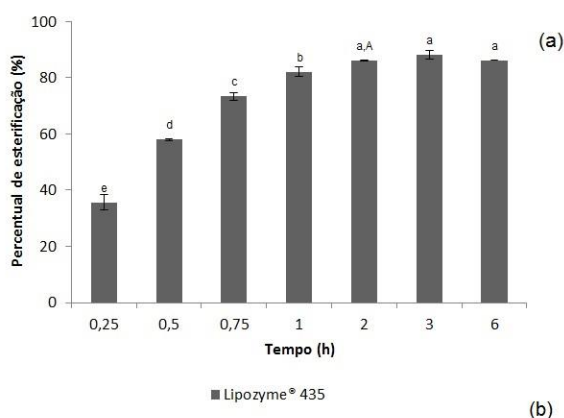
Anschau e colaboradores [28] desenvolveram um estudo sobre a síntese do éster butirato de isoamila (cujo álcool isoamílico utilizado foi obtido a partir da destilação do óleo fúsel), usando a enzima Lipozyme® TL IM com n-hexano como solvente. A partir de um planejamento fatorial estabeleceram como condições temperatura de 50 °C, com 0,1 mol.L⁻¹ de ácido butírico, concentração de 0,020 g.mL⁻¹ de enzima, razão molar álcool: ácido de 3:1, agitação de 180 rpm, atingindo 94 % de conversão após 18 h de reação. Para ensaios nos quais utilizaram baixa concentração de enzima (0,003 g.mL⁻¹) ou elevada concentração de ácido (0,5 mol.L⁻¹), os valores obtidos foram baixos, aproximando-se de 0 %. Esse fato foi atribuído à reversibilidade da reação, isto é, à hidrólise. Os mesmos autores observaram que, para baixa concentração de enzima (0,003 g.mL⁻¹), alta concentração de ácido (0,5 mol.L⁻¹) e razão molar de 3:1 (álcool:ácido), o percentual de esterificação máximo alcançou 69,6 % em 6 h, porém em 18 h de reação ele reduziu-se, atingindo 0 %. O excesso de álcool pode reduzir a formação do complexo acil-enzima, ou até mesmo distorcer a camada de água essencial das moléculas de enzima.

Macedo, Pastore e Rodrigues [29] otimizaram a síntese do éster butirato de isoamila com a lipase de *Rhizopus* sp. em um sistema livre de solvente. A melhor condição de esterificação foi na razão molar álcool:ácido de 1,5:1, uma concentração de enzima de 5,5 %, e temperatura de 40 °C, obtendo-se um percentual de esterificação de 75 % em 48 h de reação.

Na síntese do acetato de isoamila, conforme estudo realizado por Romero et al. [16] com a enzima comercial imobilizada Novozym® 435 usando hexano como solvente, na temperatura de 37 °C e 200 rpm, a máxima conversão de 100 % foi obtida nas primeiras 3 h de reação, onde a taxa de formação do éster foi elevada.

O percentual de esterificação médio obtido para o acetato de isoamila é apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Percentual de esterificação (média ± desvio padrão) para o acetato de isoamila em função do tempo.



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

Fonte: Os autores.

Para a enzima Lipozyme® 435 não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) a partir de 2 h de reação, atingindo-se neste tempo 86,0 % ± 0,1 de esterificação máxima. Para tempos superiores, não houve diferença significativa nos percentuais de

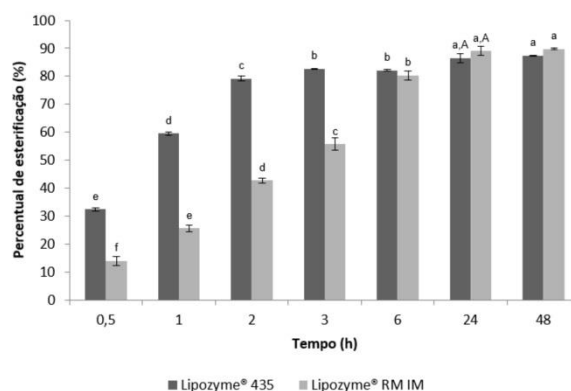
esterificação. Para a enzima Lipozyme® RM IM observou-se um incremento elevado no percentual de esterificação, de 6 h de reação até 24 h.

O percentual máximo correspondeu a 90,5 % ± 0,7 em 48 h de reação. Os valores máximos de percentual de esterificação para cada enzima não diferiram entre si a 95% de confiança ($p > 0,05$).

No estudo de Guvenç, Kapucu e Mehmetoglu [27], em um sistema livre de solvente para síntese do acetato de isoamila com a enzima Novozym® 435, a máxima conversão foi obtida em 6 h, com 80 % de conversão em uma concentração de 5 % de enzima. Também estudaram a enzima Lipozyme® RM IM, na presença de hexano como solvente, obtendo uma conversão máxima de 96 % em 72 h para concentrações enzimáticas de 7,5 – 10 %.

A síntese do éster propionato de isoamila é apresentada na Figura 3.

Figura 3 – Percentual de esterificação (média ± desvio padrão) para o propionato de isoamila em função do tempo.



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

Fonte: Os autores.

Para ambas as enzimas, o percentual de esterificação máximo foi observado após 24 h de reação, sendo de 86,5 % ± 1,6 e 89,0 % ± 1,6 para Lipozyme® 435 e Lipozyme® RM IM, respectivamente. Estes valores foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$) a 95 % de confiança.

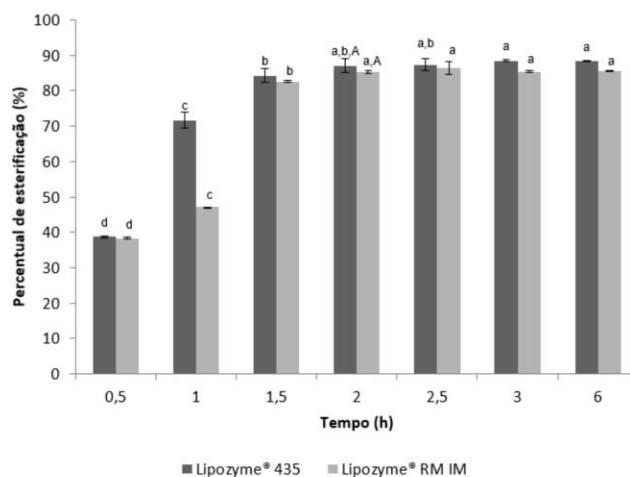
Em estudo da síntese de propionato de isoamila utilizando a lipase Lipozyme IM-20 conduzido por Krishna e Karanth [17], foi obtido um percentual de esterificação máximo de 93 %, atingido para uma razão enzima-substrato de 24 g.mol⁻¹, concentração de substrato de 1,5 mol.L⁻¹ (concentração considerada elevada) em um tempo razoavelmente curto (24 h).

A Figura 4 apresenta os resultados para a síntese do éster laurato de isoamila.

esterificação obtidos para cada éster, indicando a potencialidade de sua utilização na síntese de diferentes ésteres de aroma.

REFERÊNCIAS

Figura 4 – Percentual de esterificação (média ± desvio padrão) para o laurato de isoamila em função do tempo.



Letras minúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos de reação para uma mesma enzima; letras maiúsculas iguais representam que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre os percentuais de esterificação máximos.
Fonte: Os autores.

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

A síntese do éster laurato de isoamila foi estudada por Varma e Madras [18], em um sistema utilizando dióxido de carbono supercrítico, em substituição ao solvente, e a enzima Novozym® 435, encontrando 95 % de conversão em 4 h de reação.

IV. CONCLUSÃO

A síntese de ésteres de isoamila com diferentes tipos de ácidos e com dois tipos de enzimas provou ser eficiente, de modo a alcançar a formação dos produtos desejados. Os percentuais de esterificação máximos alcançados foram, respectivamente, para as enzimas Lipozyme® 435 e Lipozyme® RM IM: butirato de isoamila 82,9 % \pm 0,4 (2 h) e 84,4 % \pm 1,4 (6 h); acetato de isoamila 86,0 \pm 0,1 % (2 h) e 90,5 \pm 0,7 % (48 h); propionato de isoamila 86,5 \pm 1,6 % (24 h) e 89,0 \pm 1,6 % (24 h); laurato de isoamila 87,1% \pm 2,0 (2 h) e 85,4% \pm 0,4 % (2 h). Desta forma, os percentuais de esterificação para todas as sínteses foram superiores a 80 %, não havendo diferenças significativas entre as enzimas quanto aos percentuais máximos de

- [1] POTTER, N.N.; HOTCHKISS, J.H. **Ciência de los alimentos**. 5ª Edição. Zaragoza: Acribia, 2007.
- [2] VERMA, N.; THAKUR, S.; BHATT, A.K. Microbial lipases: industrial applications and properties (A review). *International Research Journal of Biological Sciences*, v. 1, p. 82-92, 2012.
- [3] MESSIAS, J.M.; COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G.; GIESE, E.C.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 32, p. 213-234, 2011.
- [4] GUMEL, A.M.; ANNUAR, M.S.M.; HEIDELBERG, T.; CHISTI, Y. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 2079-2090, 2011.
- [5] ARAGÃO, V.C.; PORTO, M.R.A.; BURKERT, C.A.V.; KALIL, S.J.; BURKERT, J.F.M. Response surface methodology approach for the synthesis of ethyl butyrate. *Food Technology and Biotechnology*, v. 49, p. 103-110, 2011.
- [6] LOPRESTO, C.G.; CALABRÒ, V.; WOODLEY, J.M.; TUFVESSON, P. Kinetic study on the enzymatic esterification of octanoic acid and hexanol by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 110, p. 64-71, 2014.
- [7] VARMA, M.N.; MADRAS, G. Effect of chain length of alcohol on the lipase – catalyzed esterification of propionic acid in supercritical carbon dioxide. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, p. 2342-2354, 2010.
- [8] FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 44, p. 8-13, 2007.
- [9] WANG, Y.; ZHANG, D-H.; ZHANG, J-Y.; CHEN, N.; ZHI, G-Y. High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. *Food Chemistry*, v. 190, p. 629-633, 2016.
- [10] AKACHA, N.B.; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: synthesis, recovery, modeling, and bioprocesses. *Food and Bioprocess Processing*, v. 94, p. 675-706, 2015.
- [11] IOFI- International organization of the flavor Industry. **Code of practice - definitions**. Disponível em: <<http://www.iofi.org/Home/Teaser-Code-of-Practice/IOFI-Code-of-Practice/page.aspx/103>>. Acesso em: 23 de ago. 2015.

- [12] BARÁNKOVÁ, E.; DOHNAL, V. Effect of additives on volatility of aroma compounds from dilute aqueous solution. *Fluid Phase Equilibria*, v. 407, p. 217-223, 2016.
- [13] DHAKE, K.P.; THAKARE, D.D.; BHANAGE, B. M. Lipase: a potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavor and fragrance ester compounds. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 28, p. 71-83, 2013.
- [14] BNDES – Banco Nacional do Desenvolvimento (2014). Potencial de diversificação da indústria Brasileira. Relatório 4 – Aromas, sabores e fragrâncias. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/produtos/download/aep_fep/chamada_publica_FEPprospec0311_Quimicos_Relat4_aromas.pdf>. Acesso em: 10 de jun. 2016.
- [15] BICAS, J.L.; SILVA, J.C.; DIONÍSIO, A.P.; PASTORE, G.M. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 7-18, 2010.
- [16] ROMERO, M.D.; CALVO L.; ALBA C.; HABULIN, M.; PRIMOZIC, M.; KNEZ, Z. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 33, p. 77-84, 2007.
- [17] KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. Response surface modeling of lipase-catalyzed isoamyl propionate synthesis. *Journal of Food Science*, v. 67, p. 32-36, 2002.
- [18] VARMA, M.N.; MADRAS, G. Synthesis of isoamyl laurate and isoamyl stearate in supercritical carbon dioxide. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136, p. 139-147, 2007.
- [19] DE TEVES, M.L.U. **Álcool isoamílico**. Ficha técnica. Faculdade Oswaldo Cruz, São Paulo, SP, 2013.
- [20] FERREIRA, M.C. **Estudo do processo de destilação do óleo fúsel**. 2012. 228f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- [21] CHOWDARY, G.V.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor mihei*: a multivariate analysis. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 331-339, 2000.
- [22] KRISHNA, S.H.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S.G.; KARANTH, N.G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of Biotechnology*, v. 87, p. 193-201, 2001.
- [23] SHIH, I.; HUNG, S.; CHEN, F.; JU, H.; SHIEH, C. Optimized synthesis of lipase catalyzed l- menthyl butyrate by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry*, v. 100, p. 1223-1228, 2007.
- [24] ARAGÃO, V.C.; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B.D.A.; THIESEN, C.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. *Química Nova*, v. 32, p. 2268-2272, 2009.
- [25] AOCS. Official and tentative methods of the American Oil Chemist's Society. Disponível em: <<http://www.aocs.org/Methods/content.cfm?ItemNumber=40798>>. Acesso em: 12 de mai. 2016.
- [26] OLIVEIRA, P.C.; ALVES, G.M.; CASTRO, H.F.; MEI, L.H.I. Síntese do butirato de nbutila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. *Química Nova*, v. 23, n. 5, p. 632-636, 2000.
- [27] GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; KAPUCU, H.; MEHMETOGLU, U. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 379-386, 2002.
- [28] ANSCHAU, A.; ARAGÃO, V.C.; PORCIUNCULA, B.D.A.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 2148-2156, 2011.
- [29] MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; RODRIGUES, M. I. Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus* sp. lipase with a central composite rotatable design. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 687-693, 2004.